

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

EVOLUCIÓN DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO
1 EN PACIENTES NO PROGRESORES
VIRÉMICOS.

TESIS DOCTORAL

TAMARA ÁLVARO CIFUENTES

Madrid, 2019

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



EVOLUCIÓN DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 EN
PACIENTES NO PROGRESORES VIRÉMICOS.

Tamara Álvaro Cifuentes, licenciada en Biología.

Directores de la Tesis:

Dr. Cecilio López Galíndez

Dra. Concepción Casado Herrero

Centro Nacional de Microbiología

Instituto de Salud Carlos III

Madrid.

A mi familia, cuyo apoyo
incondicional ha sido
imprescindible para llevar a cabo
este trabajo.

A mis hijas, que son la razón de
mi existencia.

A Andrés, por no permitir que me
rindiera. Por conseguir que
sonriese incluso en los peores
momentos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Cecilio López Galíndez, director de esta tesis, sin su ayuda y paciencia no hubiera sido posible este proyecto, por su valiosa ayuda científica pero sobre todo por su comprensión y apoyo en estos largos años de trabajo.

A la Dra Concepción Casado Herrero, codirectora y amiga, que ha colaborado activamente en esta tesis. Por su apoyo y disposición permanente, por sacar tiempo de donde no lo hay, por no darme por perdida.

A la Dra María Pernas, compañera del laboratorio y amiga, por tu ayuda científica y tus consejos.

A la Fundación FIPSE, sin cuyo apoyo no hubiese podido empezar esta tesis.

A Carmen Rodríguez, Soledad García y Jorge del Romero del centro de Salud Sandoval, sin los cuáles este trabajo no hubiera podido realizarse.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Virología Molecular, a los que continúan y a los que ya no están, a Isabel, María, Gonzalo, Víctor, Toni, Virginia Nunes, Virginia Sandonís, Rosa, Ramón y Dora. Muchas gracias a todos por el excelente ambiente de trabajo, tan difícil a veces de encontrar, por vuestro apoyo y ayuda. Por los buenos ratos.

Al antiguo biopolímeros, a Pablo, Aurora y Alicia por su excelente trabajo y la ayuda prestada durante todos estos años.

Al resto de compañeros y amigos del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda, en especial a Javi, Ester y Nuria, muchas gracias a todos por vuestro apoyo.

A Andrés Olmo, jefe actual y suegro, por permitirme compaginar ambos trabajos. Sin su apoyo, este estudio no hubiera sido posible.

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio del virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) en un grupo de pacientes no progresores a largo plazo (LTNP), virémicos, concretamente en un subgrupo que denominamos como modernos. Basándonos en el análisis de las secuencias nucleotídicas de la región C2-V5 del gen env de diferentes aislados en distintas zonas geográficas de España, establecimos una correlación entre la distancia genética de estas y la fecha de recogida de la muestra, lo cual nos permitía estimar la datación de las secuencias genéticas.

Con este estudio, fuimos capaces de determinar la existencia de dos grupos de individuos dentro del grupo de LTNP. Definimos un primer grupo de individuos LTNP “ancestrales”, los cuales se caracterizaban por presentar secuencias nucleotídicas ancestrales cercanas a la fecha de seroconversión del individuo; y un segundo grupo de LTNP, que denominamos “modernos”, que tenían secuencias cercanas a la fecha de extracción de la muestra.

La evolución viral se analizó utilizando el ADN extraído de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ocho LTNP “modernos” con más de diez años de infección en ausencia de tratamiento antirretroviral.

Los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (ML) mostraron dos patrones de evolución claramente diferenciados; uno caracterizado por presentar árboles filogenéticos similares a los que se encuentran en individuos con progresión crónica (PC), en los que hay un reemplazamiento de los linajes virales en el tiempo (evolución “temporal”). El segundo patrón evolutivo encontrado se caracterizaba por la pérdida de estructura temporal anteriormente descrita, es decir, las variantes virales que están circulando en un momento dado no son el origen de las variantes detectadas en momentos inmediatamente posteriores, y se distribuyen aleatoriamente a lo largo de todo árbol. Con este análisis encontramos que uno de los individuos LTNP “moderno” estaba doblemente infectado manteniendo su estatus de LTNP durante casi treinta años.

Realizamos un análisis de las características clínicas, virológicas e inmunológicas de los individuos LTNP modernos con el objetivo de determinar la influencia de estos patrones de evolución viral distintos en el curso clínico de la enfermedad, concluyendo que los individuos con un patrón de evolución “atemporal” parecen tener un mejor pronóstico de la enfermedad.

Por último, estudiamos la pérdida de control de la enfermedad en dos de los pacientes LTNP “modernos”. Analizamos los factores virológicos responsables de dicha pérdida del estatus LTNP y encontramos cambios en las subpoblaciones virales asociados a un aumento en la capacidad replicativa de los virus que produjeron cambios en la progresión de la enfermedad.

The main goal of the project was to study the evolution of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in a group of long-term non-progressor patients (LTNP), particularly in a sub-group classified as modern. Based on the analysis of the nucleotide sequence in C2-V5 region of *env* gene of the viruses from different isolates collected in different geographical areas of Spain, we established a correlation between the genetic distance and the date of the specimen collection.

Based on this technique, we were able to determine the existence of two groups within LTNP. We defined a group of “ancestral” LTNP who showed only ancestral nucleotide sequences close in the dating to the time of seroconversion; and a second group of LTNP, referred to as “modern” subjects, displaying modern viral dating, with the estimation time of the sequence close to the sampling date.

Viral evolution was analyzed using the viral DNA extracted from the PBMCs of eight HIV-1 modern LTNP with more than ten years of infection and who remain healthy in absence of antiretroviral therapy

The Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees showed in *env* gene sequences two different evolutionary patterns; one displayed a strong temporal structure similar to the pattern described in chronicles progressors, characterized by the continual replacement of viral variants with time (temporal evolution). The second evolutionary pattern found was characterized by the lack of temporal structure previously describe, meaning, viral variants present in one sample were not the origin of the viral variants detected immediately after, and were randomly distributed on the phylogenetic tree. Based on this study, we were able to determine the existence of one dual infected LTNP modern patient.

We carried out a clinical, virological and immunological analysis of “modern” LTNP to determine if different evolutionary pattern found were affecting the disease progression, concluding that subjects with “atemporal” evolutionary viral pattern seem to have better disease prognosis.

Finally, we studied the loss viral control in two of this LTNP subjects. We analyzed the role of viral factors in this loss finding that switch of HIV-1 subpopulation associated with enhanced viral replication capacity results in changes in the disease progression.

INDICE

ABREVIATURAS.....	4
1. INTRODUCCIÓN	- 6 -
1.1 El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).	7
1.1.1 <i>La pandemia de VIH/SIDA.</i>	7
1.1.2 <i>Clasificación del VIH.</i>	8
1.1.3 <i>Estructura del virión, organización genómica y proteínas del VIH-1</i>	8
1.2 Infección por el VIH-1.	10
1.2.1 <i>Ciclo biológico del VIH-1.</i>	10
1.2.2 <i>Historia natural de la infección por el VIH-1.</i>	14
1.2.3 <i>Patogénesis de la infección por el VIH-1.</i>	16
1.3. Variabilidad del VIH-1.....	18
1.3.1 <i>Generación de variabilidad.</i>	18
1.3.2 <i>Variabilidad del VIH-1 en la población humana.</i>	21
1.3.3 <i>Fuerzas modeladoras de la variabilidad del VIH-1 en la población.</i>	22
1.4. La cuasiespecie del VIH-1 en un individuo infectado.	23
1.4.1 <i>Diversificación del VIH-1 en el individuo.</i>	23
1.4.2 <i>Diversidad de la cuasiespecie viral durante el curso clínico de la infección.</i> ..	23
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Muestras de VIH-1 de individuos infectados.	30
3.2. Obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica (CMSP)..	30
3.3. Cultivos celulares.....	30
3.3.1 <i>Medios de cultivo.</i>	30
3.3.2 <i>Obtención de CMSP de donante sano.</i>	31
3.3.3 <i>Obtención de CMSP CD8- de donante sano.</i>	31
3.3.4 <i>Tratamiento de CMSP de donante sano con Mitomicina C.</i>	31
3.3.5 <i>Aislamiento del virus de individuos LTNP.</i>	31
3.3.6 <i>Medida del antígeno p24 en sobrenadante de cultivo.</i>	32
3.3.7 <i>Expansión del virus aislado de los individuos LTNP.</i>	32
3.4. Ensayo de neutralización.....	32
3.5. Ensayo de cinética de replicación viral.	33
3.6. Análisis de la respuesta inmune humoral anti-VIH-1.	34
3.7. Análisis de la concentración de β -2-Microglobulina en plasma.....	35
3.8. Separación de ácidos nucleicos.....	36
3.8.1 <i>ADN.</i>	36
3.8.2 <i>ARN.</i>	36
3.9. Amplificación y cuantificación del ADN viral asociado a CMSP.....	37
3.9.1 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN proviral.</i>	37
3.9.2 <i>Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ARN (RT-PCR)</i>	38
3.9.3 <i>Cuantificación del ADN viral asociado a CMSP.</i>	38

3.9.4. Cuantificación del ARN viral en plasma.....	39
3.10. Purificación y secuenciación de los productos de PCR.	39
3.10.1. Purificación de los productos de PCR.	39
3.10.2. Secuenciación automática.	39
3.11. Obtención de pseudovirus.	40
3.11.1. Obtención de los clones recombinantes.	40
3.11.2. Identificación de los clones recombinantes.	41
3.11.3. Purificación del ADN del plásmido recombinante.	41
3.11.4. Obtención de pseudovirus mediante transfección de células 293T.	41
3.12. Caracterización de las variantes virales.....	42
3.12.1. Titulación en células TZM-bl.	42
3.12.2. Infección con la misma cantidad de p24.	42
3.13. Análisis de las secuencias.	43
3.13.1. Edición y alineamiento de las secuencias.	43
3.13.2. Análisis filogenéticos.....	43
3.13.3. Cálculo de distancias genéticas.	44
3.13.4. Reconstrucción del ancestro común más reciente (ACMR).	44
3.13.5. Análisis de mutaciones.	44
3.13.6. Secuencias nucleotídicas utilizadas para la construcción de la curva de datación.....	45
3.14. Caracterización del genotipo CCR5Δ-32.	45
3.15. Determinación de marcadores genéticos. Tipado de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA).....	46
3.16. Análisis estadísticos.	46
4. RESULTADOS	47
4.1 INDIVIDUOS VIH ESTUDIADOS.....	48
4.1.1 Definición de los individuos estudiados.....	48
4.1.2 Datación de las secuencias virales.	48
4.1.3 Clasificación de los virus de los individuos LTNP según la datación de las secuencias nucleotídicas.	50
4.2. Estudio de los virus de individuos LTNP “modernos”.	51
4.2.1 Análisis filogenético de los virus de los individuos LTNP “modernos”.	51
4.2.2 Análisis filogenético de dos individuos con una potencial doble infección por el VIH-1.	61
4.2.3 Heterogeneidad y divergencia de las cuasiespecies virales.	65
4.2.4. Clasificación de los virus de los individuos LTNP “modernos”.	66
4.2.4.1 Individuos LTNP “modernos temporales”.	66
4.2.4.2 Individuos LTNP “modernos atemporales”.	67
4.2.6 Análisis de dN y dS.	75
4.3.1 Análisis de las características clínicas de los individuos LTNP “modernos”: carga viral, número de células T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺	75
4.4 Estudio Viroológico de los individuos LTNP “modernos”	81
4.4.1 Co-cultivo de los virus de los individuos LTNP “modernos”.	81
4.4.2 Cinética de replicación de los virus de los individuos LTNP “modernos”.	81
4.5 Estudio inmunológico de los individuos LTNP “modernos”.	83
4.5.1 Estudio de neutralización en los individuos LTNP “modernos”.	83
4.5.2 Factores genéticos asociados al huésped.....	85

4.5.3 Análisis de la concentración de $\beta 2$ microglobulina y título de anticuerpos específicos frente a la gp160 del HIV-1 en plasma.	86
4.6 Análisis de la pérdida de control en dos individuos LTNP.....	87
5. DISCUSIÓN	97
5.1 Datación de las secuencias virales.	98
5.2 Clasificación de los individuos LTNP “modernos”:	99
5.2.1 Análisis filogenético de los individuos LTNP “modernos”.	99
5.2.2 Heterogeneidad y divergencia de las cuasiespecies virales.	99
5.2.3 Estudio de dobles infecciones: individuos LTNP 12 y LTNP 64	100
5.2.4 Análisis de las mutaciones sinónimas y no-sinónimas sitio a sitio en el gen env de los individuos LTNP.	102
5.3 Estudio de las características clínicas de los individuos LTNP “modernos”: carga viral, número de células T CD4⁺ y CD8⁺.	104
5.4 Estudio virológico de los individuos LTNP “modernos”.	105
5.5 Estudio inmunológico de los individuos LTNP “modernos”.	106
5.5.1 Estudio de neutralización de los aislados primarios de los individuos LTNP “modernos”.	106
5.5.2 Estudio de los factores genéticos asociados al huésped.	107
5.5.3 Análisis de la concentración de $\beta 2$ microglobulina y del título de anticuerpos específicos frente a la gp160 del VIH-1 en plasma.	107
5.7 Análisis de la pérdida de control en dos individuos LTNP.....	108
6. CONCLUSIONES.	111
7. BIBLIOGRAFÍA.....	114
8. ANEXO I.....	129
9. PUBLICACIONES.....	152

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpos
ACMR	Ancestro común más reciente
ACMREsp	Ancestro común más reciente español
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Seroalbúmina
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
Cop/ml	Copias de ARN viral por mililitro de plasma
CRF	Formas recombinantes circulantes
CTL	Células T CD8 ⁺ citotóxicas
CV	Carga viral
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Deoxinucleótidos
ddNTPs	Dideoxinucleótidos
dN	Proporción de mutaciones no sinónimas por sitio no sinónimo
dS	Proporción de mutaciones sinónimas por sitio sinónimo
ECLIA	Electroquimioluminiscencia
EC	Individuos controladores de élite
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
HLA	Antígeno leucocitario humano
HMH	Hombres que tienen sexo con otros hombres
IC₅₀	La inversa de la dilución del plasma que confiere una inhibición al 50%
IL-2	Interleucina 2 recombinante humana
LEDGF	Factor de crecimiento derivado del epitelio lenticular
LTNP	Pacientes no progresores a largo plazo
LTNP-CV	Pacientes no progresores a largo plazo controladores virémicos
LTNP-EC	Pacientes no progresores a largo plazo controladores de élite
LTNP-NC	Pacientes no progresores a largo plazo no controladores
ML	Método de reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud
NJ	Método de reconstrucción filogenética del vecino más próximo
ONUSIDA	Programa de las naciones unidas para el SIDA

PBS	Tampón fosfato sódico-potásico
pb	Pares de bases
PC	Pacientes progresores crónicos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohematoglobulina
PIC	Complejo de preintegración
PR	Pacientes progresores rápidos
r.p.m	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell park memorial institute
RT	Enzima retrotranscriptasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ARN
SCEsp	Secuencia consenso española
SBF	Suero bobino fetal
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
TAR	Tratamiento antiretroviral
T CD4⁺	Linfocitos T que expresan la molécula CD4 en su membrana
T CD8⁺	Linfocitos T que expresan la molécula CD8 en su membrana
TCID₅₀	Dosis infecciosa en cultivo celular
t-test	Test de Student
UDIV	Usuario de drogas intravenosas
URL	Unidades relativas de luz
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia de tipo 1
VIH-2	Virus de la inmunodeficiencia de tipo 2
VR	Viremia residual

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).

1.1.1 La pandemia de VIH/SIDA.

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue reconocido como una nueva entidad clínica en el año 1981 [1, 2]. Se caracterizaba por la presencia de anomalías inmunológicas generalmente acompañadas por infecciones oportunistas, desórdenes neurológicos y formas inusuales de cáncer. En 1983, el VIH-1 fue aislado por vez primera a partir de nódulos linfáticos de un paciente con linfadenopatía [3], y en 1984 se demostró la presencia del virus en las muestras de suero de individuos con SIDA [4]. Los primeros estudios epidemiológicos que se realizaron demostraron que este nuevo patógeno podía ser transmitido a través de la sangre o derivados de la misma, a través de los fluidos genitales y verticalmente de madres a hijos. Estudios recientes demuestran que la pandemia del grupo M del VIH-1 se inició en Kinsasa (República democrática del Congo) alrededor del inicio de los años 20 y que la red de transporte que conectaba la población principal del país con otros países de la región del África subsahariana facilitó su expansión geográfica hacia el África central [5]. Este estudio sugiere que una combinación de diferentes acontecimientos durante un periodo histórico-social y espacial particular, permitió el establecimiento, la diseminación geográfica y el crecimiento epidémico de la pandemia del grupo M del VIH-1.

Globalmente, la pandemia de VIH/SIDA continúa expandiéndose por los cinco continentes. Según las estimaciones más recientes del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.unaids.org/en/resources/documents/2018/unaids-data-2018>) la epidemia de SIDA se cobró alrededor de 1 millón de vidas en 2017, se estima que 1.8 millones de personas contrajeron el VIH a lo largo del año, lo que eleva a 36.9 millones el número de personas que viven con el VIH en todo el mundo. La OMS se ha propuesto que en 2020 se llegue al objetivo de 90-90-90. Esto se refiere a que el 90% de personas que viven con el VIH conozca su estado serológico, que el 90% de las personas diagnosticadas reciban terapia antirretroviral continuada y que el 90% de las personas que reciben terapia antirretroviral tengan supresión viral. Con respecto a este objetivo en 2017, tres de cada cuatro personas que vivían con el VIH (75%) conocían su estado. Entre las personas que conocían su estado, cuatro de cada cinco (79%) tenían acceso al tratamiento. Y, entre las personas que tenían acceso al tratamiento, cuatro de cada cinco (81%) habían logrado la supresión viral. El 47% de todas las personas que viven con el VIH tienen carga viral indetectable. Desde el comienzo de la epidemia, 77.3 millones de personas contrajeron la

infección por el VIH y 35.4 millones de persona fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA.

En España, según estimaciones del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, desde que apareció el primer caso de SIDA en 1981 y hasta el 30 de Junio de 2018 se han notificado 87.369 casos de SIDA (<https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/home.htm>). España sigue siendo uno de los primeros países de Europa en número de casos notificados y en tasa de incidencia (<http://www.eurohiv.org>).

1.1.2 Clasificación del VIH.

Según las características genéticas, morfológicas y biológicas, el VIH es un retrovirus perteneciente a la familia *Retroviridae*, y al género *Lentivirus*. Los miembros de este género se diferencian del resto de retrovirus por presentar un fuerte poder citolítico y se caracterizan por la capacidad de infectar células del sistema inmunitario y por producir infecciones lentas. La familia *Retroviridae* engloba diferentes agentes virales que poseen una enzima, la retrotranscriptasa (RT), que es capaz de copiar el ácido ribonucleico (ARN) a ácido desoxirribonucleico (ADN).

Como todos los retrovirus, el genoma del VIH está codificado por ARN de polaridad positiva, el cual es retrotranscrito a ADN de doble cadena gracias a la enzima RT, se integra en el genoma de la célula que infecta formando el provirus y desde el genoma celular se transcribe utilizando la maquinaria celular y originando una nueva progenie vírica. Estos virus presentan en su genoma varias proteínas reguladoras que condicionan la interacción virus-célula y, por tanto, la patogenia de la enfermedad [6-8].

1.1.3 Estructura del virión, organización genómica y proteínas del VIH-1

El estudio por microscopía electrónica muestra que el virión del VIH-1 tiene una estructura esférica de 80 a 130 nm de diámetro, cuya envuelta externa es una bicapa lipídica en la que se insertan unas espículas formadas por glicoproteínas virales (la glicoproteína externa gp120 y la proteína transmembrana gp41), que están asociadas de forma no covalente en la superficie del virión. La proteína miristilada p17 forma la matriz y se localiza justo por debajo de la membrana lipídica del virus y más en el interior del nucleoide, se encuentra la cápsida o “core” en forma de cono truncado (ver Fig. 1.1). La cápsida está formada por la proteína p24 y en su interior se localiza un complejo ribonucleoproteico constituido por las proteínas RT, endonucleasa, proteínas de las

nucleocápsida (p6 y p7), y dos copias del ARN genómico de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 9800 pares de bases (pb) [9].

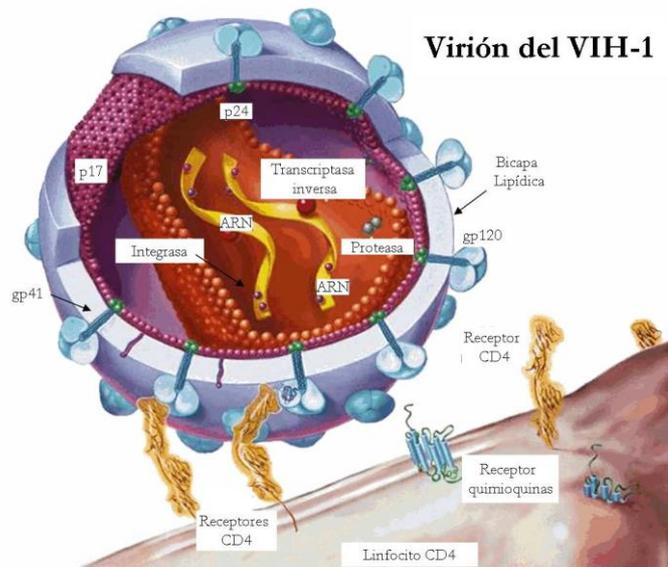


Figura 1.1: Representación esquemática de la estructura del virión del VIH-1. Tomado de www.rhodes.edu

En los primeros estadios de la infección, el ARN genómico se transforma en ADN lineal de doble banda por medio de la RT. La molécula de ADN sintetizada es colineal al molde de ARN, pero contiene repeticiones terminales en sus extremos (LTRs) que no están presentes en la molécula de ARN vírico. En ellas se localizan importantes regiones reguladoras, especialmente las relacionadas con el inicio de la transcripción y la poliadenilación. El ADN lineal se transporta al núcleo donde se integra en el genoma de la célula huésped en forma de provirus a partir del cual se transcriben los nueve genes virales (ver figura 1.2). Los genes *gag*, *pol* y *env* codifican las proteínas estructurales y enzimas virales, componentes esenciales de la partícula viral. El producto de la traducción del gen *gag* es la poliproteína precursora Gag que se procesa dando lugar a la proteína matriz (p17), la proteína de la cápsida (p24) y las proteínas de la nucleocápsida (p6 y p7). El producto del gen *pol* es la poliproteína Pol cuyo procesamiento da lugar a las tres enzimas víricas: la proteasa (p11), la RT (p66/51) y la integrasa (p32). La traducción del gen *env* resulta en la glicoproteína gp160, que es procesada por proteasas celulares dando lugar a las proteínas de la envuelta gp120 y gp41. Los genes *tat* y *rev* por su parte codifican las proteínas reguladoras, encargadas de modular las etapas transcripcional y postranscripcional de la expresión de los genes virales y esenciales para la propagación del virus. Por último, los genes *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* codifican las proteínas auxiliares o accesorias que, si bien en general no son necesarias para la propagación del virus en cultivo, su papel *in vivo* parece ser muy

importante participando en los procesos de localización nuclear del complejo de preintegración, así como en la maduración y liberación extracelular de los viriones [10, 11]

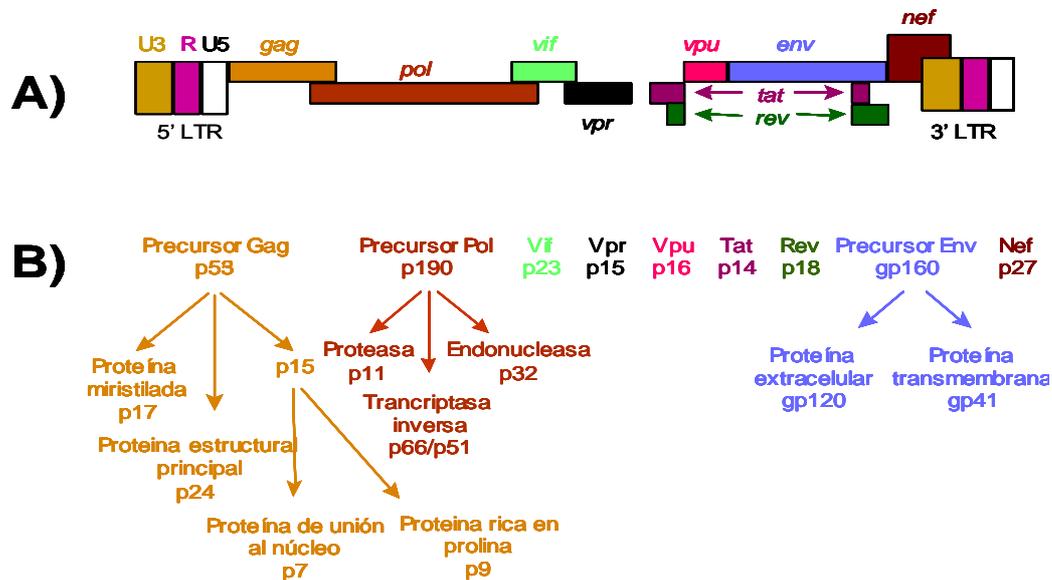


Figura 1.2. (A) Organización genómica del VIH-1. (B) Maduración de las proteínas víricas. Tomado de [12].

1.2 Infección por el VIH-1.

1.2.1 Ciclo biológico del VIH-1.

Las principales dianas celulares del VIH son las células T CD4⁺ y las células del linaje monocito-macrófago. Los macrófagos y células dendríticas juegan un papel muy importante en la presentación de antígenos a las células T CD4⁺, durante dicha presentación antigénica transmiten la infección a las células T CD4⁺. La infección de las células T CD4⁺ por el VIH-1 está estrechamente asociada al proceso de activación fisiológica normal de las células T [13]. Las células T CD4⁺ salen del timo como células “naive” y circulan hasta encontrarse con su antígeno específico. En ese momento se produce el proceso de activación y la célula comienza a proliferar. Una vez eliminado el antígeno, la mayor parte de las células activadas mueren por apoptosis, aunque algunas sobreviven y retornan a un estado G₀ de reposo en el cual persisten como células memoria. En este estado son capaces de responder frente a subsecuentes encuentros con el mismo antígeno.

El VIH-1 es capaz de infectar células T CD4⁺ en todos los estadios, sin embargo, la infección productiva solo se produce si hay una activación de la célula T infectada.

El ciclo biológico del VIH-1 comienza con la unión de la glicoproteína de la envuelta viral al receptor CD4⁺ y al co-receptor CCR5 en la célula diana, seguido de la fusión de la membrana viral y celular produciéndose la liberación del núcleo viral en el citoplasma. Allí, el genoma ARN del virus es retrotranscrito a ADN por la enzima viral RT. El ADN viral recién sintetizado forma un complejo de pre-integración (PIC), el cual comprende el ADN viral, la integrasa viral, proteínas de la cápside viral y algunas proteínas celulares. El PIC entra en el núcleo y media la integración del ADN viral en el genoma celular. La entrada al núcleo es un proceso activo dependiente de energía [14]. Aunque la integración del ADN viral puede darse, en principio, en cualquier región del genoma de la célula huésped, las regiones diana son, preferentemente, zonas de alta densidad de genes y de gran actividad transcripcional [15, 16]. Hay varios factores que influyen la selección de los sitios diana, incluyendo la entrada al núcleo, la fase del ciclo celular, la estructura de la cromatina, así como la interacción de la integrasa viral con los factores de anclaje a la cromatina como el LEDGF (del inglés lens-epithelium-derived growth factor). El LEDGF es, probablemente, el factor celular más importante en la integración, determinando tanto la eficiencia como la selección del sitio de integración [14, 17]. Los últimos hallazgos confirman que la arquitectura nuclear también tiene un papel central dirigiendo el PIC hacia un ambiente nuclear permisivo que pueda ayudar a la transcripción y replicación del genoma viral. En contraste con la transcripción activa del genoma viral que se da en células infectadas productivamente, los genomas virales están silenciados transcripcionalmente en células T CD4⁺ “resting”, siendo este el principal obstáculo para erradicar el VIH-1 [14].

Estudios recientes han proporcionado evidencias de que la integración en un gen particular puede producir la expansión clonal y la persistencia de la célula infectada [18]. En general, el VIH-1 se integra cerca de genes transcripcionalmente activos y en regiones abiertas de la cromatina. Dentro del espacio nuclear, no todos los genes activos son seleccionados de la misma forma, debido a que el VIH-1 tiene preferencia por genes activos cuya localización espacial se encuentre en la parte periférica del núcleo. A pesar de que la transcripción productiva, habitualmente, ocurre después de la integración, también puede darse un silenciamiento del genoma viral y, en consecuencia, generar el reservorio viral persistente [14].

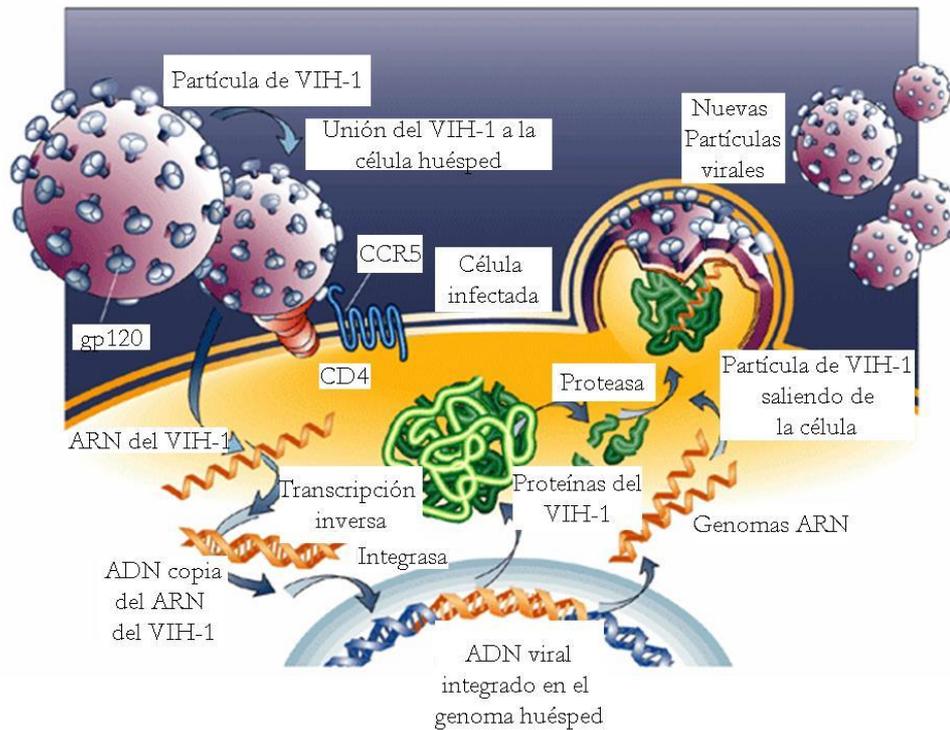


Figura 1.3. Ciclo biológico del VIH-1. Tomado de [19]

El tratamiento antirretroviral (TAR) contra la infección del VIH-1, que en la actualidad comprende la combinación de tres antiretrovirales, reduce los niveles de virus en plasma por debajo de los límites de detección de los ensayos clínicos. Sin embargo, a pesar de la supresión de la replicación viral prolongada con TAR, tras la interrupción de la terapia se produce un rápido repunte de la viremia. Por tanto, el TAR no es curativo. La principal barrera para curar el VIH-1 es el reservorio latente, notablemente estable, en células “resting” T CD4⁺ de memoria [20]. Las células que comprenden este reservorio tienen fenotipo de memoria ([21-23]). Las medidas directas del reservorio latente de individuos en TAR muestran una tasa de eliminación muy lenta, ya que la vida media de estas células es muy alta ($t_{1/2}$ 3.7 años) [20, 24]. Con este tiempo de vida media, la eliminación de un reservorio de 10^6 células requeriría 73 años, haciendo improbable la cura, incluso con TAR de por vida [20]. El comienzo temprano de la terapia, restringe el tamaño del reservorio, pero no bloquea su establecimiento. La latencia se explica como una consecuencia del tropismo viral por células T CD4⁺ activadas, las cuales pueden tener una transición hacia el estado “resting” de memoria [20]. El CCR5, co-receptor para la entrada de la mayoría de las formas de VIH-1 comúnmente transmitidos, se encuentra sobre expresado en células T CD4⁺ activadas.

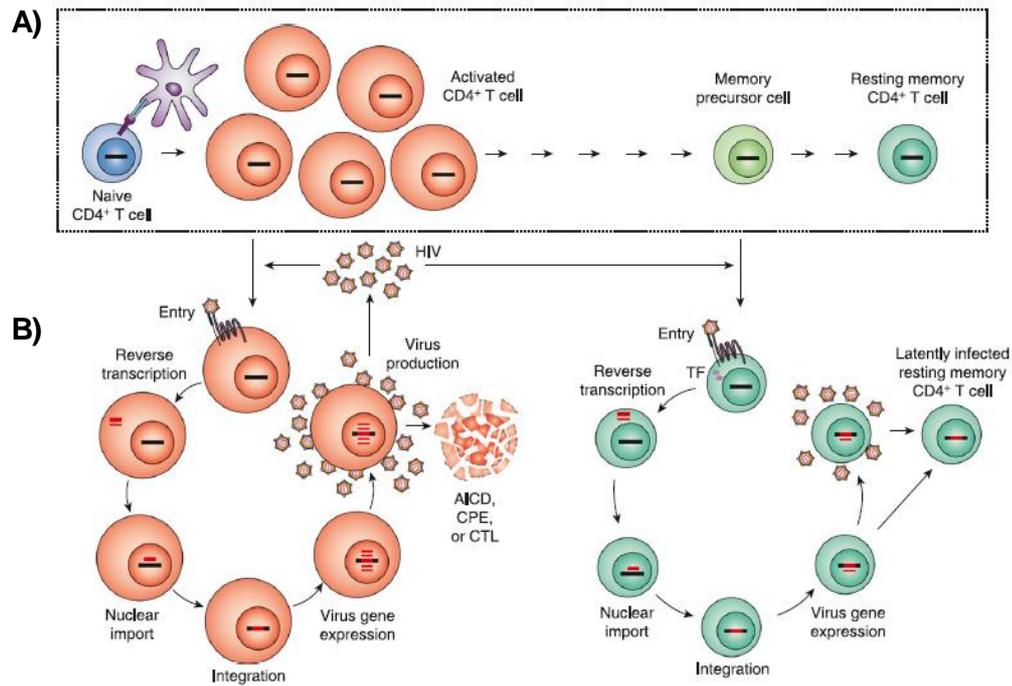


Figura 1.4. Modelo del establecimiento de la latencia en la infección por VIH-1 en células T CD4⁺ de memoria "resting". **A)** En el recuadro de arriba aparece el proceso normal de generación de células de memoria, desde la exposición de las células T CD4⁺ al Ag, el cual conduce a la transformación de los blastos, proliferación y diferenciación en células efectoras. Muchas células efectoras mueren durante la fase de contracción de la respuesta inmune, pero una fracción sobrevive y gradualmente retorna al estado quiescente como células T CD4⁺ "resting" de larga vida. La mayoría de células "resting" pierden la expresión del CCR5, co-receptor para la entrada del VIH-1. **B)** La activación de las células "resting" por el Ag, sobre regula la expresión del CCR5 y revierte otros bloqueos para la replicación del VIH-1 en las células "resting", permitiendo la infección productiva en este tipo de células. La mayoría de los linfoblastos infectados productivamente mueren rápidamente debido a la muerte celular inducida por activación, por los efectos citopáticos del virus o por lisis por los CTL. Como células transicionalmente activadas vuelven al estado "resting", donde las formas activas de los factores clave de transcripción del huésped necesarios para la expresión de los genes del VIH-1 están secuestrados. La infección en este estado puede conducir a una infección latente más que a la muerte celular. Tomado de [20]

En la mayoría de individuos en TAR se encuentran niveles residuales de virus libre (~ 1 copia/ml) [20]. El análisis de las secuencias de esta viremia residual (VR), revela que estos virus se parecen a los presentes en la infección temprana, son sensibles al régimen TAR del paciente y no muestran evolución. Estos hallazgos sugieren que la VR se origina a partir del reservorio estable. La presencia de la VR sugiere que se están activando constantemente células latentemente infectadas. Por lo tanto, la estabilidad del reservorio latente se debe, muy probablemente, al tiempo de vida media de las células T de memoria y al rápido recambio de estas células a través de proliferación [25-27].

La fracción de secuencias idénticas de VIH-1 en muestras secuenciales obtenidas de individuos en tratamiento, aumenta con el tiempo, siendo consistente con la proliferación de células infectadas [28]. Un estudio de Mandarelli y cols. (2014) muestra que se pueden obtener múltiples células con el mismo sitio de integración de una única muestra de sangre,

lo que refleja una gran expansión clonal “in vivo” [29]. Otros estudios reflejan un proceso post-integración que favorece el crecimiento y supervivencia “in vivo”, de forma que la integración en ciertos genes del huésped, contribuyen a la persistencia del VIH-1 estimulando la proliferación de las células infectadas de forma diferente a la proliferación homeostática [29-31].

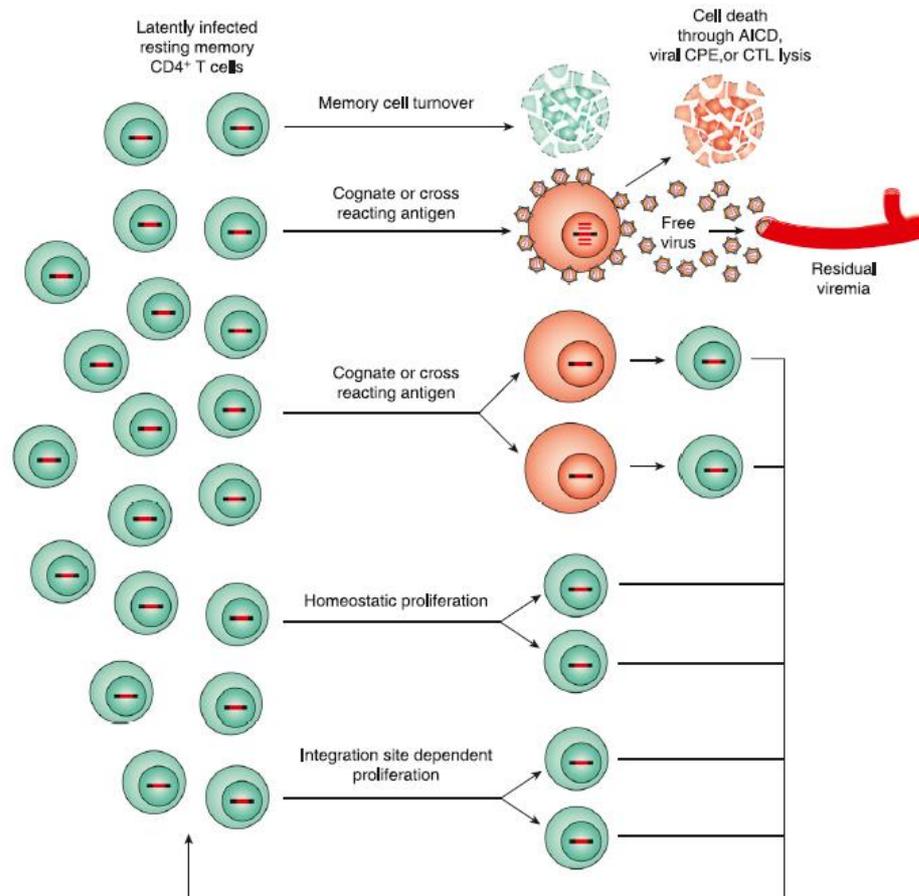


Figura 1.5. Dinámica del reservorio latente. El TAR bloquea, en gran parte, las nuevas infecciones de células susceptibles. En individuos con TAR a largo plazo, el “pool” de células latentemente infectadas es extremadamente estable ($t_{1/2}$ 3.7 años) por lo que el recambio de células de memoria debe estar en gran parte equilibrado por proliferación de las células infectadas previamente. Las células T CD4+ de memoria “resting” latentemente infectadas ocasionalmente encuentran su Ag relevante y se activan. La activación revierte la latencia, permitiendo la expresión de los genes virales y la producción de virus. En individuos en TAR, pero se pueden detectar niveles muy bajos en plasma que constituyen la viremia residual. La proliferación homeostática de las células de memoria puede también ocurrir sin la reactivación de la expresión de los genes virales. Para algunas células infectadas, la integración del provirus en genes asociados con el crecimiento celular pueden también estimular la proliferación celular. Tomado de [20]

1.2.2. Historia natural de la infección por el VIH-1.

Cuando el VIH infecta en un nuevo huésped se produce una replicación viral masiva, alcanzando niveles extremadamente altos del virus en plasma ($\geq 10^6$ copias de ARN/ml), lo cual produce una disminución en el número de células T CD4+ (fase aguda de

la infección) [32, 33](ver Fig. 1.6). La alta replicación viral inicial conduce a una rápida diseminación del virus en órganos linfoides y otros tejidos del paciente infectado [33].

Entre 2 ó 3 semanas post-infección se produce una drástica caída en los niveles de ARN vírico en plasma y un restablecimiento del número de células T CD4⁺ [34], asociado con el desarrollo de una fuerte respuesta celular T citotóxica, que precede a la aparición de anticuerpos específicos [35, 36],

Este nivel basal de la replicación se denomina **“set point”** y varía de un individuo a otro, constituyendo uno de los marcadores virológicos de progresión de la enfermedad más importantes [37, 38]. Después de la infección primaria, se inicia la fase clínicamente asintomática, de duración variable, entre la primoinfección y el desarrollo de SIDA. Durante el periodo asintomático de la infección, se establece un equilibrio entre la replicación continua del virus [39-41] y la respuesta inmune del huésped, alcanzando valores semejantes entre la producción y la eliminación del virus [42-45]. Como consecuencia, los niveles de ARN viral plasmático permanecen estables [46-49]. Con el tiempo, el número de células T CD4⁺ disminuye continuamente con una tasa estimada de 25-60 células/ μ l/año [50] y el virus invariablemente escapa al control inmune. La última etapa de la enfermedad, en ausencia de TAR, se caracteriza por un aumento de la replicación del VIH-1 que coincide con una marcada disminución de células T CD4⁺ (< 300 células/ μ l) [51-53] produciendo una profunda alteración del estado general del individuo, que se caracteriza por la aparición de infecciones oportunistas graves, ciertas neoplasias y alteraciones neurológicas. (Ver figura 1.6).

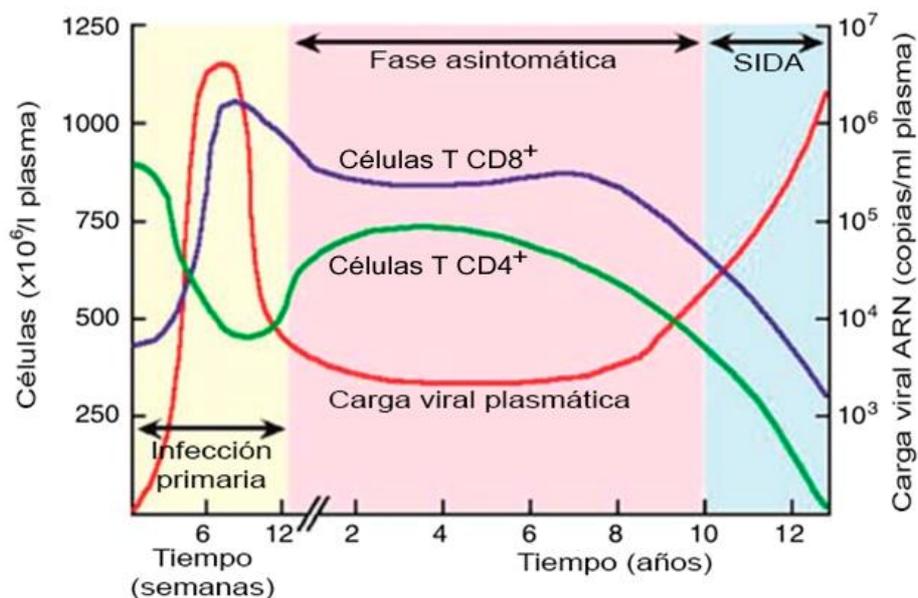


Figura 1.6. Curso clínico de la infección por VIH-1. Se muestra la carga viral y el recuento de células T CD4⁺ y CD8⁺ en las distintas fases de la infección en individuos progresores crónicos (PC) [54].

1.2.3. Patogénesis de la infección por el VIH-1.

A pesar de que el curso clínico de la infección por VIH-1 está bien definido, hay una gran variabilidad en el tiempo de progresión de la enfermedad entre individuos. La fase asintomática puede durar desde varios meses hasta más de 20 años en ausencia de TAR (revisión general en [55]). En la mayoría de los individuos (80-85%), denominados progresores crónicos (PC), el período asintomático dura entre 8 y 10 años, hasta presentar finalmente las enfermedades definitorias de SIDA en ausencia de TAR [56-58].

Existe un pequeño grupo de individuos infectados (1-5%), denominados progresores lentos o no progresores a largo plazo (PL o LTNP del inglés “Long-term non-progressor”), en los que el número de células T CD4⁺ se mantiene a niveles normales incluso después de 10 años de infección y suelen presentar un nivel de ARN vírico en plasma bajo en ausencia de TAR [59-64]. Dentro de este grupo de individuos, se ha descrito un subgrupo, denominado controladores de élite (del inglés Elite controllers) (EC), que mantienen cargas virales por debajo de las 50 copias/ml en ausencia de TAR [65-71]. A pesar del aparente control espontáneo de la enfermedad, se ha descrito que un porcentaje de estos individuos (tanto LTNP como EC) acaban evolucionando finalmente a SIDA [69, 72-75]

La variación en la duración del periodo asintomático parece estar determinado por la compleja interacción de factores virales, factores del huésped y factores externos. Determinar cuáles son estos factores y conocer la contribución relativa de los mismos resulta esencial para comprender y controlar la evolución de la enfermedad.

a) Factores virológicos.

Atenuación viral. Varios estudios sugieren que la infección con variantes atenuadas del VIH puede conducir a una progresión más lenta de la enfermedad. Se ha demostrado en algunos LTNP y controladores de élite (LTNP-EC) (individuos con carga viral \leq 50 copias/ml), la presencia de cepas del VIH con deleciones [71] y mutaciones atenuantes en los genes *nef* [76-80] *vpr* [81] *rev* [82] y *vpu* [83]. También se ha descrito una asociación entre la longitud de la región hipervariable V1-V2 del gen *env* y una tasa de progresión más lenta [84, 85].

Escape viral. También ha sido implicada en la inmunopatogénesis de la infección por el VIH-1 la aparición de mutantes capaces de eludir la respuesta inmune celular y humoral del huésped. En un trabajo pionero, Phillips *y cols.* [86] demostraron la aparición *in vivo* de mutaciones en *gag* que reducían o eliminaban el reconocimiento *in vitro* de dichas

variantes virales por parte de las células T CD8+ citotóxicas (CTL) autólogas. Estudios posteriores han confirmado estos resultados, demostrando una relación directa entre la respuesta CTL del huésped y la rápida emergencia de mutaciones de escape en *env* [87, 88], *gag* [89] o *nef* [90-92], tanto durante la primoinfección [87, 88, 91, 93, 94] como durante la fase asintomática [89, 90, 92, 95, 96]. La emergencia de dichos mutantes se ha visto asociada, en algunos casos, a un aumento en los niveles de replicación viral y a una progresión de la enfermedad [89, 90]. Sin embargo, otros estudios sugieren que los mutantes de escape a CTL pueden suponer un coste lo suficientemente alto en capacidad replicativa viral [96, 97].

Los aislados del VIH-1 se distinguen, también, por su diferente sensibilidad a la neutralización por anticuerpos específicos. La mayoría de los Ac neutralizan los viriones libres impidiendo su unión al receptor o interfiriendo con el proceso de fusión [98]. Se ha descrito la emergencia de mutantes de escape resistentes a la neutralización por Ac autólogos, que en algunos casos se ha visto asociada a una progresión de la enfermedad [99-102].

En la mayoría de los individuos, se desarrolla una rápida y potente respuesta humoral durante la infección primaria, inicialmente frente a la variante que está circulando en ese momento y después contra los subsiguientes escapes virales que se van seleccionando [98, 103, 104]. En un trabajo publicado en 2006 se asoció la pérdida de respuesta de Ac neutralizantes con una predisposición a la superinfección [105]. También se ha demostrado que cuanto mayor es la amplitud de neutralización, mayor es la diversidad viral de las cuasiespecies [106].

b) Factores del huésped.

La observación de que individuos infectados a partir de un mismo virus experimentaron cursos clínicos muy variables puso en evidencia la importancia de los factores del huésped en la modulación de la velocidad de progresión a SIDA [84].

Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La respuesta inmune específica del huésped está condicionada por los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del individuo. Cada alelo puede unir un repertorio diferente de péptidos virales, esto permite un reconocimiento eficaz y la subsiguiente eliminación del virus. Se ha demostrado que los individuos infectados por VIH-1 que son homocigotos para cualquiera de los tres alelos del MHC de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) tiene una progresión más rápida de la enfermedad [96]. Por tanto, la heterocigosis en todos los *loci* del HLA de clase I parece tener un papel protector [107]. Distintos estudios han sugerido

que alelos específicos en los *loci* HLA estarían asociados a diferentes tasas de progresión; lo cual podría explicarse por la diferente habilidad de los distintos alelos para presentar eficientemente epítomos virales inmunodominantes. Los alelos B27, B51, B57 y B58 han sido asociados a una progresión lenta a SIDA [108-110]. Uno de los estudios más amplios sobre la asociación entre haplotipos del HLA y progresión, describe una clara asociación de los alelos HLA antes mencionados con la no progresión a largo plazo [111, 112].

Receptores de quimioquinas. Los receptores de quimioquinas (CCR5 y CXCR4) son utilizados por el VIH como co-receptores para entrar en la célula. Existen mutaciones en dichos receptores que afectan a la susceptibilidad de las células T CD4⁺ y macrófagos a la infección por el VIH y pueden, por tanto, afectar la velocidad de progresión de la infección (revisiones generales en [109, 110]). La alteración mejor caracterizada es una delección de 32 pares de bases (pb) en el gen que codifica para el co-receptor CCR5 (CCR5-Δ32). Esta mutación fue identificada en 1996 asociada a una reducción en la susceptibilidad de infección cuando estaba presente en homocigosis, y a una reducción en la velocidad de progresión cuando está presente en heterocigosis [113]. Estudios posteriores han confirmado estos resultados sugiriendo que la heterocigosis para la mutación en CCR5 disminuye el número de co-receptores en la superficie celular disponibles para la entrada del VIH [110, 114, 115]. La densidad del co-receptor CCR5 en la superficie de las células T CD4⁺ se ha correlacionado con la carga viral en individuos no tratados [116]. Además, estos datos se ven corroborados por los resultados obtenidos en los dos únicos casos de curación del VIH-1, gracias al trasplante de células madre con la alteración CCR5-Δ32 en homocigosis [117, 118].

1.3. Variabilidad del VIH-1.

1.3.1. Generación de variabilidad.

Una de las características fundamentales del VIH-1, común al resto de los virus ARN, es su alta variabilidad genética. Los mecanismos responsables de la generación de variabilidad en el VIH-1 son dos: la introducción de mutaciones durante el proceso de retrotranscripción debido a la ausencia de mecanismos de corrección de la RT, y la recombinación.

Tasa de mutación de la RT del VIH-1. Durante el proceso de replicación del VIH-1, al igual que en el resto de los retrovirus, intervienen tres sistemas enzimáticos, cada

uno con su propio potencial para introducir errores. Mientras que la tasa de mutación es baja para la ADN polimerasa celular, la RT se caracteriza por tener altas tasas de error, debido a la falta de actividad enzimática 3' exonucleasa que permite corregir las bases mal incorporadas.

La tasa de mutación puntual *in vivo* para el VIH-1 ha sido estimada entre 0.3 – 0.4 por genoma por ciclo de replicación [119, 120]; esto implica que tras una ronda de replicación por cada 10 copias del genoma progenitor entre 3 y 4 copias de media, llevarán una nueva mutación puntual.

Recombinación. La tasa de recombinación homóloga para el VIH-1 ha sido estimada en 2 a 3 eventos de recombinación por genoma y por ciclo de replicación [121]. Este valor es unas 10 veces superior a la tasa de mutación. La alta frecuencia de recombinación homóloga observada en los retrovirus, se debe a la naturaleza diploide del genoma vírico. Para que la recombinación homóloga genere variabilidad, sin embargo, se requiere la co-infección o re-infección de una célula por dos o más virus distintos y el empaquetamiento de dos genomas víricos distintos en una misma partícula (heterocigoto) [122, 123]. El proceso de retrotranscripción de tales partículas heterocigóticas puede producir moléculas recombinantes que contengan fragmentos de ambas secuencias genómicas progenitoras. La recombinación entre virus de distintos grupos y subtipos del VIH-1 ha sido ampliamente descrita [11]. Aunque es más difícil de detectar, también se ha descrito la recombinación entre virus del mismo subtipo genético [124-128].

Doble infección. Una doble infección por el VIH-1 ocurre cuando un individuo es infectado con dos virus diferentes. Las infecciones dobles pueden dividirse en co-infecciones y superinfecciones. Una co-infección se define como una infección con dos virus heterólogos simultáneamente o dentro de un breve periodo de tiempo, antes de que la infección por el primer virus se haya establecido y, por tanto, se haya desarrollado una respuesta inmune. La superinfección es definida como la infección con un segundo virus después de que la infección inicial y la respuesta inmune esté establecida [124, 129].

El primer caso de superinfección en VIH fue descrito en 1987, en un modelo de chimpancé [130]. Quince años después, Ramos y *cols.* describieron un caso en humanos [131]. Los artículos inicialmente publicados describían individuos que habían sido reinfectados con un virus que pertenecía a otro subtipo diferente del virus inicial (superinfección intersubtipo)[131, 132]. Estas dobles infecciones han producido numerosas cepas virales recombinantes (llamadas formas recombinantes circulantes (CRF)) [133, 134]. Dado que la distancia genética entre subtipos del VIH-1 es superior al 30% en el gen de la

envuelta, este tipo de superinfecciones intersubtipo son las más fáciles de detectar. Además, la respuesta inmune a la infección inicial es menos probable que pueda proteger frente a una superinfección con un virus tan divergente. Sin embargo, reinfecciones con virus pertenecientes al mismo subtipo que el virus inicial también se han descrito [124, 135, 136]. Hasta la fecha, hay publicaciones de superinfecciones intrasubtipo [135-138], intersubtipo [131, 132, 139-142] e intergrupo [143]. Además, se ha descrito el reemplazo de un virus resistente a drogas antivirales por una superinfección con un virus tipo salvaje [136]. La mayoría de los estudios anteriormente mencionados describen un aumento de la carga viral y una disminución de las células T CD4⁺ en el momento de la superinfección.

Hay autores que asocian una progresión rápida de la enfermedad con la superinfección [144], pero las dobles infecciones también han sido descritas en individuos no progresores a largo plazo e incluso en controladores de élite que mantienen su estatus a pesar de estar doblemente infectados [106, 129, 145]. Actualmente se estima que entre el 10-20% de individuos infectados por el VIH-1 estarían doblemente infectados dependiendo del grupo de riesgo y de la procedencia geográfica [106, 145].

Tasa de evolución del VIH-1. La velocidad de evolución del VIH-1 (número de cambios fijados por unidad de tiempo) *in vivo* es unas 10⁶ veces mayor que la de los genomas ADN de organismos superiores [146, 147] y se encuentra fundamentalmente determinada por la elevada tasa de mutación por generación (resultante de los errores de la RT y de la recombinación anteriormente mencionados), y por el alto recambio poblacional. En ausencia de TAR, se estima que cada día se generan del orden de 10⁹ a 10¹⁰ partículas víricas a la vez que se destruyen entre 10⁷ y 10⁸ células T CD4⁺ [44, 148]. Las estimaciones de la tasa de evolución para el gen *env* del VIH-1 oscilan aproximadamente entre un 0.24% [149] y un 1% por año [150, 151]. Esta velocidad de evolución sin embargo puede variar según distintas consideraciones:

- 1- de una región genómica a otra, siendo *pol* la más conservada y *env* la que muestra un mayor grado de variabilidad [149, 150, 152];
- 2- entre diferentes subpoblaciones del virus dentro de un individuo [153, 154];
- 3- durante las diferentes fases de la infección dentro de un individuo [151];
- 4- entre distintos individuos [155-157].

Por lo tanto, las estimaciones de la velocidad de evolución del VIH-1 son altamente dependientes del contexto.

1.3.2. Variabilidad del VIH-1 en la población humana.

La variabilidad genética descrita para el VIH en la población humana es muy amplia [158]. Mientras que los aislados del VIH-1 y del VIH-2 difieren un 50% en su secuencia nucleotídica, esta divergencia se reduce al 35% entre aislados de distintos grupos del VIH-1 (ver Fig. 1.6). Para aislados de distintos subtipos del grupo M la divergencia oscila entre el 20% y el 35%, y dentro de un mismo subtipo alcanza valores entre el 5% y el 20%. Por último, dentro de un mismo individuo, se han descrito valores de divergencia entre los miembros de la cuasiespecie que alcanzan valores entre el 2% y el 10% (ver más adelante).

Diversificación del VIH-1 en la especie humana. El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de los aislados del VIH-1 ha permitido identificar tres grandes grupos denominados M (“main”), O (“outlier”) y N (“non M, non O”) [159] (ver Fig. 1.7).

El grupo M es el más importante desde un punto de vista epidemiológico ya que incluye la inmensa mayoría de los VIH-1 aislados en todo el mundo. Dentro de este grupo, se distinguen 8 subtipos: A, B, C, D, F, G, H y J. La clasificación en subtipos dentro del VIH-1 se realizó sobre la base de los datos de secuencias nucleotídicas disponibles de los genes *gag* y *env* (160). Los subtipos más abundantes son el C, el B y el A. El análisis filogenético de un amplio número de aislados naturales del VIH-1 ha puesto de manifiesto además la existencia de genomas “mosaicos” originados por recombinación entre diferentes subtipos que infectan simultáneamente un mismo individuo. Se calcula que éstos representan más del 10% de los aislados del VIH-1 [159, 160]. Por su parte el grupo O incluye un pequeño, aunque creciente, número de aislados altamente divergentes del M obtenidos a partir de individuos procedentes de Camerún, Gabón y Guinea Ecuatorial. Dentro de este grupo se observan agrupamientos filogenéticos similares a los que se establecen entre los diferentes subtipos dentro del grupo M [161].

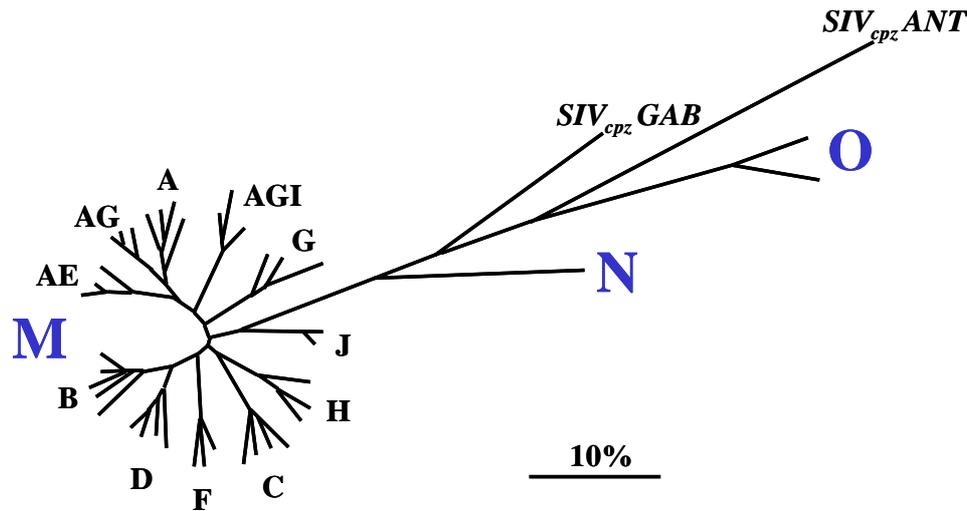


Figura 1.7. Análisis filogenético de los diferentes grupos y subtipos genéticos del VIH-1. Con letras azules se indican los tres grupos del VIH-1. Las letras A hasta J indican los subtipos genéticos dentro del grupo M. En itálicas se señalan los lentivirus de chimpancés más cercanos al VIH-1.

1.3.3. Fuerzas modeladoras de la variabilidad del VIH-1 en la población.

Las elevadas tasas de mutación y recambio poblacional del VIH-1, permiten al virus generar una amplia variabilidad genética. Sin embargo, las fuerzas que fijan las mutaciones y en última instancia modelan la evolución del virus, no están totalmente bien definidas. Definir cuáles son las contribuciones relativas de estas fuerzas (selección, azar) es un tema de gran controversia en la evolución del VIH-1, y en evolución molecular en general. **La selección** tanto **negativa**, que elimina o mantiene en baja proporción a las variantes que presentan una menor eficacia biológica, como **positiva** que permite la imposición de variantes víricas con mayor eficacia biológica. **El azar** por el que una variante de la población puede ser amplificada y llegar a ser dominante, independientemente de su eficacia biológica.

Las primeras comparaciones de las tasas de acumulación de mutaciones sinónimas y no-sinónimas para los genes *gag*, *pol* y *env* del VIH-1 a lo largo de la epidemia, demostraron un cociente $dN/dS < 1$ [146, 147, 162, 163], indicando el predominio de los cambios neutrales (cambios sinónimos) en la proteína global. Por otra parte, la existencia de un reloj molecular a nivel poblacional ha sido ampliamente demostrada para los genes *gag*, *pol* o *env* del VIH-1 [146, 150, 164]. Este reloj molecular ha sido utilizado para estimar el tiempo de divergencia entre los aislados del VIH con el objetivo de datar el probable origen de la epidemia mundial [165], así como el origen de epidemias locales [166-168].

1.4. La cuasiespecie del VIH-1 en un individuo infectado.

1.4.1. Diversificación del VIH-1 en el individuo.

Los primeros análisis de aislados virales procedentes de un mismo individuo revelaron una gran variación biológica [169] y genética [156, 170-174], que en algunos casos podía incluso acercarse a la distancia genética entre aislados virales de distintos individuos [152]. Aunque a nivel poblacional un aislado viral puede definirse mediante una **secuencia consenso o promedio**, en realidad está compuesto por una mezcla compleja de mutantes relacionados que se diferencian entre sí en uno o más nucleótidos y que se denomina espectro de mutantes. Esta distribución de mutantes recibe el nombre de **cuasiespecie vírica** por analogía con el modelo teórico descrito por Eigen [175]. Su aplicación a los virus ha sido un hecho clave para entender la dinámica de las poblaciones víricas (revisiones generales en [176-180]). La distribución de secuencias nucleotídicas presente en una cuasiespecie no es arbitraria, sino que se centra en torno a una **secuencia maestra**, la de mayor eficacia biológica en esas condiciones ambientales, que puede coincidir o no con la secuencia consenso de la población. La proporción de cada variante en la población global viene determinada por la **eficacia biológica** de cada una de ellas. Una cuasiespecie replicante se halla en **equilibrio poblacional** cuando mantiene su secuencia consenso invariable, aunque el espectro de mutantes sufra alteraciones por la generación estocástica de mutaciones. En condiciones ambientales constantes, una cuasiespecie vírica bien adaptada al ambiente estará en equilibrio poblacional dinámico a pesar de presentar heterogeneidad genética. Este equilibrio puede alterarse por la generación de mutantes con mayor ventaja selectiva o por un cambio ambiental que confiera una ventaja selectiva a alguna variante hasta entonces minoritaria. Es decir, a menos que las condiciones ambientales permanezcan controladas y constantes, la superioridad o inferioridad de una variante en particular es transitoria. Durante las infecciones naturales las perturbaciones del equilibrio poblacional ocurren frecuentemente, por lo que la estructura en forma de cuasiespecie suministra a los virus ARN la capacidad de responder y adaptarse rápidamente a los cambios ambientales, asegurando así su supervivencia [181].

1.4.2. Diversidad de la cuasiespecie viral durante el curso clínico de la infección.

El grado de heterogeneidad de la población viral en un individuo infectado varía a lo largo de la enfermedad. Está ampliamente descrito que, durante la primoinfección, la diversidad genética de la población vírica en el gen *env* es muy baja [155, 182-187].

Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que muy pocas variantes son transmitidas. El periodo de infección asintomática está caracterizado por una continua diversificación de las poblaciones víricas, lo que refleja la replicación constante del virus en el individuo infectado [186]. En un amplio análisis longitudinal de individuos PC, Shankarappa y *cols.* describieron la existencia de tres fases distintas de diversificación genética durante el período asintomático (*modelo de Mullins*, ver Fig. 1.8) [151].

- 1) Una fase temprana, de duración variable, durante la cual se observa un incremento lineal (~1% por año) tanto de la divergencia (distancia al virus original) como de la heterogeneidad (distancia entre secuencias en un momento dado) de la cuasiespecie viral.
- 2) Una fase intermedia caracterizada por una estabilización o reducción de la heterogeneidad viral a pesar del continuo incremento de la divergencia.
- 3) Una fase tardía en la que la tasa de divergencia se estabiliza o disminuye mientras que la diversidad continua con su tendencia a la reducción.

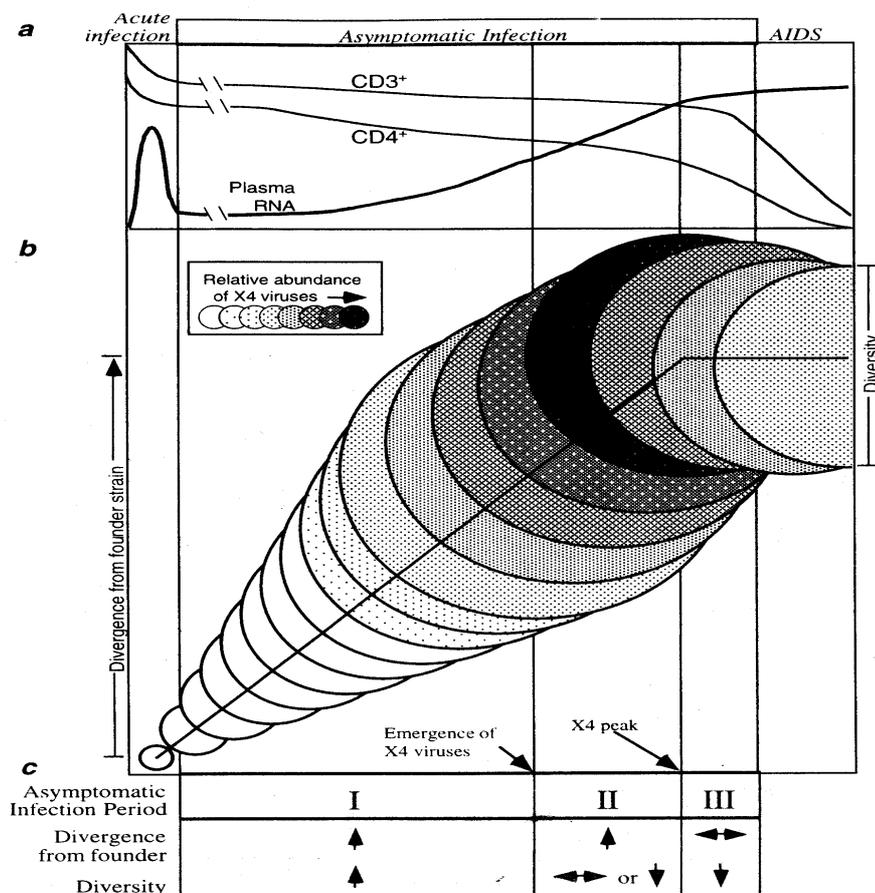


Figura 1.8. Variación de la heterogeneidad y la divergencia genética de la cuasiespecie viral durante el curso clínico de la infección por el VIH-1, tomado de [151].

La transición de la fase temprana a la intermedia se asocia con la emergencia de virus sincitiales, que alcanzan su máxima representación en la cuasiespecie en torno a la transición de la fase intermedia a la fase tardía. La transición a la fase tardía también se asocia a una importante reducción del número de células T CD4⁺ ≤ 200 células/ μ l. Aunque este modelo parece ser un patrón bastante consistente para los individuos PC, no está claro que se pueda generalizar a individuos con distintas tasas de progresión. Por último, la fase sintomática de la infección se caracteriza por una homogeneización de la población vírica (que se había iniciado al final del período asintomático), probablemente debido a la replicación masiva de una variante con mayor eficacia biológica y del colapso del sistema inmune [188].

2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

1. Estudio de la evolución del virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) en un grupo de individuos LTNP virémicos.
2. Analizar los factores del hospedador, así como de la respuesta inmune que influyen en la progresión clínica de la enfermedad.
3. Analizar qué características virológicas y de evolución viral contribuyen a la progresión clínica de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras de VIH-1 de individuos infectados.

Los estudios de evolución genética se realizaron en muestras de individuos españoles infectados por VIH-1. Las muestras fueron obtenidas en el Centro Sanitario Sandoval, perteneciente a la Fundación Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), de la Comunidad de Madrid. Todos los individuos estudiados eran LTNP, con infección asintomática durante más de 10 años.

Los individuos analizados en el presente trabajo mostraban distintas prácticas de riesgo (hombres que tienen sexo con hombres y/o usuario de drogas intravenosas), y nunca habían recibido tratamiento antirretroviral.

3.2. Obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Las muestras de sangre de los individuos se obtuvieron en presencia de anticoagulante (heparina o ácido etilendiamintetraacético (EDTA)), a partir de la cual se separaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por centrifugación a 800 g durante 45 minutos en gradiente de Ficoll-Hypaque. Tras la centrifugación se recogieron las CMSP, se lavaron en PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 1.47mM pH 7.4). Para su congelación, se resuspendieron en suero bovino fetal (SBF) suplementado con 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma), y se almacenaron en N₂ líquido (-120°C). También se recogió el plasma de cada muestra y se almacenó a -70°C.

3.3. Cultivos celulares.

3.3.1. Medios de cultivo.

El medio de cultivo utilizado en el caso de CMSP fue RPMI 1640 (Bio-Whittaker) suplementado con SBF al 10% (PAN), L-glutamina (2mM), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomicina (100 mg/ml) (RPMI completo).

Para las células TZM-bl se utilizó DMEM (Bio-Whittaker) suplementado con suero bovino fetal al 10% (PAN), L-glutamina (2mM), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomicina (100 mg/ml) (DMEM completo).

3.3.2. Obtención de CMSP de donante sano.

Las CMSP de donante sano fueron obtenidas como se explica en el apartado 3.2. A continuación, se resuspendieron en RPMI completo a una densidad celular de 10^6 células/ml y se estimularon con fitohematoglutinina (PHA) a $2 \mu\text{g/ml}$ durante tres días en una estufa a 37°C , con un 90% de humedad relativa y 5% de CO_2 .

3.3.3. Obtención de CMSP CD8- de donante sano.

Una vez fueron estimuladas las CMSP, se eliminó la población de células T CD8^+ mediante su marcaje con anticuerpos monoclonales frente a CD8 unidos a micropartículas magnéticas y su posterior selección positiva a través de columnas de separación magnética (Miltenyi Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente fueron almacenadas en N_2 líquido como se explica en el apartado 3.2 hasta su uso.

3.3.4. Tratamiento de CMSP de donante sano con Mitomicina C.

En los casos donde las células presentadoras de antígeno se utilizaron para inducir el crecimiento y la expansión de las células T, fue necesario estimularlas para su proliferación. Esto se realizó de la siguiente forma: las CMSP se incubaron durante 30 minutos a 4°C con Mitomicina C a una concentración final de $50 \mu\text{g/ml}$. Posteriormente, se lavaron tres veces con 50 ml de PBS y se centrifugaron a 450 g durante 10 minutos. Posteriormente, se resuspendieron las células en medio RPMI a una densidad celular de 10^7 células/ml, directamente para su utilización en los co-cultivos celulares, o bien se congelaron en N_2 líquido como se explica en el apartado 3.2 hasta su uso.

3.3.5. Aislamiento del virus de individuos LTNP.

Las CMSP de paciente fueron obtenidas como se explica en el apartado 3.2. Aproximadamente 10^7 CMSP se resuspendieron a una densidad celular de 10^6 células/ml en RPMI completo y se incubaron durante toda la noche en estufa a 37°C , con un 90% de humedad relativa y 5% de CO_2 .

A continuación, se eliminó la población de células T CD8^+ como se explica en el apartado 3.3.3. Las CMSP CD8^- se resuspendieron en RPMI completo con interleuquina 2 humana recombinante (IL-2) a 2.5 ng/ml y se estimularon con fitohemaglutinina (PHA) a $2 \mu\text{g/ml}$. Estas células se co-cultivaron con 10^7 CMSP de donante sano tratadas con mitomicina (ver apartado 3.3.4) para producir una activación heteróloga.

Al día siguiente se añadieron 1×10^6 CMSP CD8- de donante sano previamente estimuladas con PHA resuspendidas en 1 ml de RPMI completo con IL-2. El medio se cambió dos veces por semana y se añadieron 1×10^6 CMSP CD8- de donante sano una vez por semana. Los cultivos se siguieron mediante la medida de antígeno p24 en el sobrenadante de cultivo cada tres días. Si al cabo de un mes esta medida era negativa, ese cultivo era descartado. Los sobrenadantes de los cultivos positivos se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

3.3.6. Medida del antígeno p24 en sobrenadante de cultivo.

La medida del antígeno (Ag) p24 se realizó mediante un test inmunológico *in vitro* para su determinación cualitativa en suero o plasma humanos, así como en sobrenadantes de cultivo celular. Este inmunoensayo de electroquimioluminiscencia “ECLIA” está concebido para su empleo en los analizadores automáticos Roche Elecsys 2010 y en el módulo Elecsys Modular Analytics E170 (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.7. Expansión del virus aislado de los individuos LTNP.

Para poder trabajar con los virus aislados de los individuos LTNP fue necesario la expansión de estos mediante su crecimiento en CMSP de donante sano. Se infectaron 10^6 CMSP con 1 ml del sobrenadante del co-cultivo y se incubó durante 1 hora a 37°C . A continuación, se centrifugó a 450 g durante 10 minutos. Las células se resuspendieron a una densidad celular de 10^6 células/ml en RPMI completo con IL-2. El medio se cambió dos veces por semana. Cuando la medida del antígeno p24 era positiva, se añadieron 5×10^6 CMSP, y así sucesivamente hasta llegar a 10^7 CMSP. Los sobrenadantes de estos cultivos se almacenaron a -70°C hasta su uso.

3.4. Ensayo de neutralización.

La mejor forma para detectar la neutralización del VIH mediada por anticuerpos es medir la reducción de la infectividad viral en células que expresen el receptor y co-receptor apropiado.

En nuestro caso usamos las células TZM-bl. Estas son células adherentes derivadas de las células HeLa (línea celular JC53BL-13) (NIH AIDS Research and Referente Program, número de catálogo 8129, TZM-bl).

Las células TZM-bl están genéticamente modificadas para expresar constitutivamente CD4⁺, CCR5⁺, CXCR4⁺. Estas células contienen integrados los genes de la luciferasa y β-galactosidasa bajo el promotor de la proteína TAT del VIH-1. Por todo esto son comparables a las CMSP humanas en cuanto a la susceptibilidad de infección tanto por virus R5 como X4.

El ensayo de neutralización se realizó según el método descrito por Montefiori [189]. Brevemente, los plasmas obtenidos de los individuos infectados fueron inactivados a 56°C durante 1 hora. A continuación, se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos para clarificarlos. El ensayo de neutralización se realizó en placas de 96 pocillos. El medio utilizado para el ensayo fue DMEM completo (ver apartado 3.3.1) al que se le añadió DEAE-dextrano a una concentración final de 75 µg/ml. Se partió de una dilución 1/16 de plasma y a partir de ésta, se hicieron siete diluciones seriadas 1/2. Se incubaron 100 µg de p24 de cada virus con las diluciones de plasma correspondiente durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se añadieron 10⁴ TZM-bl por pocillo, y se incubó durante 48 horas. Finalmente, se eliminó el medio de cultivo, se lisaron las células y se cuantificó la actividad luciferasa en unidades relativas de luz (URL) con el equipo comercial Luciferase Cell Lysis Reagent, Luciferase Assay System (Promega Corporation, Madison, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, en un luminómetro de placa.

El porcentaje de neutralización se determinó calculando la diferencia en media de RLU entre los pocillos en estudio (plasma más células más virus) y los pocillos control (células sólo), y dividiendo este resultado entre la diferencia en media de los pocillos de control de virus (virus más células) y los pocillos control (células sólo). Este resultado se le resta a 1 y se multiplica por 100.

Para calcular los títulos de anticuerpos neutralizantes, construimos una recta con los porcentajes de neutralización obtenidos de cada muestra a distintas diluciones, e interpolamos la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀). La IC₅₀ se define como la inversa de la dilución del plasma que confiere una inhibición del 50%.

3.5. Ensayo de cinética de replicación viral.

La eficacia biológica es un parámetro que define la adaptación replicativa de un organismo a su ambiente [190, 191]. Existen diferentes métodos para medir *in vitro* la

eficacia biológica del VIH como, por ejemplo, infecciones de un solo ciclo de replicación, cinéticas de replicación y competiciones duales.

En nuestro caso elegimos cinéticas de replicación. Esta técnica utilizaba un marcador bioquímico, la concentración del antígeno p24, para medir el crecimiento viral en mono-infecciones [192]. Diferencias en la cinética de replicación de distintos aislados primarios de LTNP, fueron comparadas en infecciones paralelas, usando como control un grupo de individuos PC.

En nuestro ensayo se infectaron 10^6 CMSP con la misma cantidad de p24 (20.000 pg de p24) para todos los virus y se incubó a 37°C durante 1 hora. A continuación, se centrifugó a 450 g durante 10 minutos. Las células se dejaron a una densidad celular de 10^6 células/ml en RPMI completo con IL-2 (ver apartado 3.3.1). El medio se cambió dos veces por semana.

Se recogió una alícuota de sobrenadante cada dos días para cuantificar la concentración de p24 (ver apartado 3.3.6) durante los 8-10 días que dura el ensayo.

3.6. Análisis de la respuesta inmune humoral anti-VIH-1.

La presencia de anticuerpos anti-VIH-1 en el plasma de los individuos fue medida con el equipo comercial “Genscreen HIV 1/2 Version 2”, (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. “Genscreen HIV 1/2 Version 2” es una prueba de enzimo-inmunoensayo indirecto para la detección de antígenos purificados (proteína gp-160/p25 recombinante y péptidos de los epítomos inmunodominantes de las glicoproteínas de la envuelta).

El procedimiento del ensayo incluye los siguientes pasos:

- 1) Las muestras de suero y una serie de sueros controles se distribuyeron en los pocillos de la microplaca recubierta de antígenos. Si existían en el suero Ac anti-HIV-1 se fijarían al antígeno inmovilizado en la fase sólida.
- 2) Después de 30 minutos de incubación a 40°C, se lavaron los pocillos y se añadieron Ac anti-IgG e IgM humanas conjugados con la peroxidasa.
- 3) Al cabo de otros 30 minutos de incubación a 40°C, la presencia de la enzima inmovilizada a la fase sólida se detectó mediante la adición del sustrato correspondiente.

- 4) Al cabo de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción enzimática se paró mediante la adición del ácido sulfúrico 4N, y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 492/620 nm.

Con las absorbancias obtenidas en la lectura de una muestra a distintas diluciones, construimos una curva e interpolamos el título de Ac el cual fue definido como el inverso de la dilución más alta del suero que da un resultado positivo. En nuestros análisis se hizo una dilución inicial 1/64 del suero y a partir de esta, se hicieron siete diluciones seriadas 1/4.

3.7. Análisis de la concentración de β -2-Microglobulina en plasma.

La presencia de β -2-Microglobulina en el plasma de los individuos fue medida con el equipo comercial “Beta-2-Microglobulina EIA” (DRG International, Inc., USA), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. “Beta-2-Microglobulina EIA” es una prueba de enzimo-inmunoensayo indirecto para la detección de β -2-Microglobulina. El procedimiento del ensayo incluye los siguientes pasos:

- 1) Las muestras de suero y una serie de controles y el estándar se distribuyeron en los pocillos de la microplaca recubierta de Ac anti- Beta-2-Microglobulina humana. La Beta-2-Microglobulina presente en el plasma se fijó al Ac inmovilizado en la fase sólida.
- 2) Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos y se añadieron Ac anti- Beta-2-Microglobulina humanas conjugados con la peroxidasa.
- 3) Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se detectó la presencia de la enzima inmovilizada a la fase sólida mediante la reacción por la adición del sustrato correspondiente.
- 4) Al cabo de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción enzimática se paró mediante la adición de ácido clorhídrico 1M, y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 450/620 nm.

Con las absorbancias obtenidas de la lectura de los estándar de concentración conocida, construimos una curva patrón e interpolamos las concentraciones de Beta-2-Microglobulina de las muestras de los individuos.

3.8. Separación de ácidos nucleicos.

3.8.1. ADN.

La obtención del ADN de las CMSP se realizó a partir de aproximadamente 10^7 células que fueron resuspendidas en PBS para eliminar el medio de congelación (DMSO) y centrifugadas a 450 g. durante 5 minutos.

Las células se resuspendieron en 1 volumen de solución Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, NaCl 0.15 M, con proteinasa K (200µg/ml) y SDS 0.4%. Tras una incubación de 1 hora a 65°C y toda la noche a 37°C, se añadió 1 volumen Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM, NaCl 0.65 M.

Después se realizaron 3 extracciones con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y a continuación con 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con etanol absoluto y se centrifugó a alta velocidad. Posteriormente el ADN se resuspendió en Tris-HCl 10 mM-EDTA a una concentración de 0,3µg/µl equivalente a 5×10^4 células/µl.

3.8.2. ARN.

La obtención del ARN plasmático se realizó mediante el método descrito por R. Boom y *cols.* [193].

Soluciones utilizadas:

Solución de lisis: 120 g de isotiocianato de guanidina (Fluka), 100 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 6.4, 22 ml de EDTA 0.2 M pH 8.0, 2.6 g de Tritón X 100

Solución de lavado: 120 g de isotiocianato de guanidina, 100 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 6.4

Solución de sílica: preparada según Boom y *cols.*

Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente una mezcla de 200 µl de plasma, 900 µl de solución de lisis y 40 µl de sílica. Se centrifugó la mezcla a alta velocidad durante 15 segundos y se obtuvo un sedimento de partículas de sílica que se lavó dos veces

con 1 ml de solución de lavado, dos veces con 1 ml de etanol al 70% y una vez con 1 ml de acetona. Tras el último lavado se incubó la preparación durante 10 minutos a 56°C (para secar la sílica) y se eluyó el ARN en 50 µl de H₂O mediante su incubación a 56°C. Por último, se centrifugó a alta velocidad durante 2 minutos y se recogió el sobrenadante.

3.9. Amplificación y cuantificación del ADN viral asociado a CMSP.

3.9.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN proviral.

Para amplificar el ADN se realizaron dos PCR consecutivas a dilución límite de un fragmento de 614 pares de bases (pb) desde la región constante C2 hasta la región variable V5 (C2-V5) de la proteína gp120 codificada por el gen *env* del VIH-1 (nucleótidos 7068-7682 en el clon HXB2).

Para la primera PCR se utilizaron los iniciadores: 169U (5'-AATGTCAGCACAGTACAATGTACAC-3' nucleótidos 6945-6969 en el clon HXB2) y 96ED (5'-GCGTCTAGACAATAATTGTCTGGCCTGTACCGT-3' nucleótidos 7862-7836 en el clon HXB2).

Para la segunda PCR fueron utilizados los iniciadores 27ECU (5'-ATAAGCTTGCAGTCTAGCAGAAGAAGA-3' nucleótidos 7862-7836 en el clon HXB2) y 167ED (5'-TTCTCCAATTGTCCCTCATACTCCTCCTC-3' nucleótidos 7314-7339 en el clon HXB2).

La concentración de desoxinucleótidos (dNTPs) (Pharmacia) fue de 0.125 mM, empleándose 100 ng de cada iniciador y 1.5 unidades de enzima Expand High Fidelity (Roche Diagnostics) por ensayo.

El volumen de reacción fue de 50 µL. Para la PCR externa (fragmento de unas 900 pb) se realizaron 35 ciclos de amplificación: desnaturalización a 94°C 5 minutos, 94°C 30 segundos, hibridación de los iniciadores al ADN molde durante 30 segundos a 55°C y elongación de las cadenas de ADN durante 2 minutos a 72°C. Para la segunda PCR (fragmento interno de la primera PCR de unos 630 pb), los ciclos de elongación fueron los mismos excepto que la elongación de las cadenas de ADN se llevó a cabo durante 1 minuto a 72°C, para ambos casos las amplificaciones se finalizaron con una elongación de 10 minutos a 72°C. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MJ Research modelo PTC-200.

Los productos obtenidos se analizaron en gel de agarosa 1% en tampón Tris-acetato 45 mM, EDTA 10 mM (TAE). Los iniciadores utilizados fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis de Biopolímeros del ISCIII.

Para la amplificación del ADN proviral obtenido a partir de co-cultivo se siguió el mismo procedimiento arriba descrito.

3.9.2. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ARN (RT-PCR)

En todos aquellos casos en los que el material de partida fue ARN se realizó una transcripción inversa para obtener el ADN complementario. La reacción de síntesis se realizó a partir de 10.000-40.000 copias de ARN viral, obtenido según el apartado 3.8.2, con el equipo comercial One Step RT-PCR Kit (Quiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los iniciadores utilizados son los descritos en el apartado 3.9.1 para la primera PCR. El volumen de reacción fue de 50µl. La transcripción inversa del ARN se realizó en un primer paso a 50°C durante 30 min, seguido de 35 ciclos de amplificación: desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 segundos, hibridación de los iniciadores al ADN molde a 55°C durante 30 segundos y elongación de las cadenas del ADN a 72°C durante 1 minuto. La amplificación se terminó con una elongación de 10 minutos a 72°C. El producto obtenido de esta reacción fue el que se utilizó posteriormente en la segunda amplificación por PCR, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.9.1.

3.9.3. Cuantificación del ADN viral asociado a CMSP.

Para evitar que la heterogeneidad de las poblaciones virales fuera sesgada por un bajo número de copias de ADN molde, la carga viral en cada muestra fue cuidadosamente determinada siguiendo el protocolo descrito por Rodrigo y cols. (Rodrigo A. G., P.C. Goracke, K Rowhanian, and J. I. Mullins. 1997 Quantification of target Molecules from polymerase Chain Reaction-Based Limiting Dilution Assays. AIDS Res. Hum. Retroviruses 13: 737-742). Para ello se utilizó el programa QUALITY (<http://ubik.microbiol.washington.edu/download/cbu/quality/>) el cual está basado en el método de dilución límite de PCR. Con este método, réplicas de diluciones seriadas de la muestra fueron amplificadas por la PCR y sobre la base de la frecuencia relativa de amplificaciones positivas en cada dilución, se hizo una estimación del número de copias de molde en una unidad de volumen de la muestra original. En nuestro estudio, se amplificaron por triplicado al menos cuatro diluciones seriadas de cada una de las muestras.

Para la cuantificación se utilizaron los mismos iniciadores que luego se emplearon en la amplificación del ADN viral total (tanto integrado como no integrado) que está asociado a las CMSP.

Para evitar los errores en el muestreo las cuasiespecies virales se realizaron por dilución límite a partir del ADN total, utilizando la dilución del ADN a la cual el número de PCRs positivas obtenidas era inferior al 30%. Estas amplificaciones son posteriormente purificadas y secuenciadas.

3.9.4. Cuantificación del ARN viral en plasma.

La viremia o carga viral plasmática fue determinada en el Centro de Salud Sandoval utilizando el equipo comercial Amplicor HIV-1 MonitorTM Test (Roche Diagnostic System, Somerville, NJ), y Versant RNA 3.0 Assay (bDNA), Siemens, siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. El límite de detección de este equipo era de 50 copias/ml. Con este método se cuantificó la carga viral libre, no asociada a células, en el plasma.

3.10. Purificación y secuenciación de los productos de PCR.

3.10.1. Purificación de los productos de PCR.

Antes de ser secuenciados, los productos de PCR seleccionados fueron purificados para eliminar los restos de iniciadores, sales, nucleótidos no incorporados y restos de la polimerasa Expand High Fidelity que podrían afectar a las reacciones enzimáticas subsiguientes. Para la purificación de los fragmentos amplificados se utilizó el equipo comercial “High Pure PCR Product Purification” (Boehringer Mannheim), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

El método consistió en la adhesión del ADN por puentes de hidrógeno a una columna de sílica, el ADN retenido en la columna es lavado y esto permite eliminar distintas sustancias, como sales, proteínas y otros contaminantes celulares. Por último este ADN retenido en la columna fue lavado y finalmente eluido por la adición de un tampón estéril de baja concentración de sales.

3.10.2. Secuenciación automática.

Después de purificados, los productos de PCR provenientes de los fragmentos amplificados fueron directamente secuenciados con el primer 27ECU empleando el equipo comercial “Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing v2.0” (Applied Biosystems,

Perkin Elmer, Norwalk, Conn.), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. La secuenciación se realizó mediante amplificación por PCR asimétrica en presencia de los cuatro dideoxinucleótidos (ddNTPs), marcados cada uno con un colorante fluorescente distinto. Las reacciones de secuenciación se realizaron en un termociclador MJ Research modelo PTC-200.

Los productos obtenidos fueron analizados en un secuenciador automático ABI PRISM™ modelo 377 (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Norwalk, Conn.) por la Unidad Genómica del ISCIII.

3.11. Obtención de pseudovirus.

3.11.1. Obtención de los clones recombinantes.

Para el clonaje molecular se amplificó por PCR la región gp160 de la envuelta viral, se realizó una primera PCR con los oligonucleótidos 166 (5'-TGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCT-3') y 167 (5'-TTCTCCAATTGTCCCTCATATCTCCTCCTCCA-3') y una segunda PCR con los oligonucleótidos 576 (5'-GTCTCGAGATGCTGCTCCCACC-3') y 577 (5'-CACCTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3'), el cuál contenía los extremos adecuados para poder insertarlos en un vector de expresión lineal PC3.1. La reacción de PCR se realizó con el kit "Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer" (Thermo Scientific). Para la primera PCR se realizaron 35 ciclos de amplificación: desnaturalización a 98°C durante 2 minutos, 98°C 15 segundos, hibridación de los iniciadores al ADN molde durante 20 segundos a 70°C y elongación de las cadenas de ADN durante 2 minutos y 30 segundos. Para la segunda PCR se utilizó el fragmento interno de la primera PCR y los ciclos fueron los mismos excepto que la hibridación de los iniciadores se realizó durante 20 segundos a 65°C. Para ambos casos, las amplificaciones se finalizaron con una elongación de 10 minutos a 72°C.

Posteriormente, los fragmentos de ADN amplificados se purificaron mediante el Kit comercial "Quick Gel Extraction Kit" (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La ligación del producto de PCR al vector PC3.1 del Kit "pcDNA™ 3.1 Directional TOPO Expression Kit" (Invitrogen) se realizó durante 5 minutos a temperatura ambiente, con una proporción molar vector:inserto 2:1.

Para la transformación de bacterias competentes, se añadió la mezcla de ligación a un eppendorf con bacterias competentes y se incubaron durante 30 minutos en hielo. A continuación, se sometieron a un choque térmico (90 segundos a 42°C y 1 minuto en hielo), se les añadió 800 µl de medio LB y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación a 190 rpm. Por último, se centrifugaron 8 minutos a 4000 rpm, y se retiraron 750 µl del sobrenadante. Para la selección de clones recombinantes, se sembraron en placas de medio LB-agar con ampicilina.

3.11.2. Identificación de los clones recombinantes.

Las colonias obtenidas fueron posteriormente analizadas por PCR utilizando el oligonucleótido 52 (5'- TTGAGCCAATTCCCATACATTA -3'), cuya secuencia se encontraba contenida en el inserto para poder diferenciar aquellas colonias que lo habían incorporado, y el oligonucleótido T7 (5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3') que hibridaba en la secuencia del plásmido. Posteriormente se amplificó siguiendo un protocolo de 30 ciclos: desnaturalización a 95°C 5 minutos, 94°C 30 segundos, hibridación de los oligonucleótidos durante 30 segundos a 55°C y elongación de las cadenas de ADN durante 45 segundos a 72°C. Solo aquellas colonias que dieron un producto de PCR del tamaño esperado (entre 750-1000pb) fueron tenidas en cuenta.

3.11.3. Purificación del ADN del plásmido recombinante.

A partir del cultivo de bacterias, se purificó el ADN del plásmido recombinante mediante el kit "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche Diagnostic), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos recombinantes se secuenciaron utilizando los siguientes oligonucleótidos T7 (ver apartado 3.15.2), 60 (5'- GCCACACATGCCTGTGTACCCACA -3'), 114 (5'- TCCTCAGGAGGGGACCCAGAAATT -3'), 169 (ver apartado 3.15.1), 214 (5'- AATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCAAT-3'), 279 (5'- TCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACT-3'), para comprobar la correcta orientación del inserto y que no presentaban codones de parada.

3.11.4. Obtención de pseudovirus mediante transfección de células 293T.

24 horas antes de realizar la transfección se sembraron 3×10^6 células 293T en placas de Petri (P100) con 6 ml de medio de cultivo DMEM completo para conseguir al día siguiente una monocapa confluyente en el 50-80%.

La transfección se realizó con 1,5 µg del ADN plasmídico clonado y 1,5 µg del ADN plasmídico que iba a expresar todas las proteínas del VIH-1 excepto la envuelta (pNL 4.3Δenv). Se empleó el método del CaCl₂ [194]. La producción de pseudovirus se midió a las 48 y 72 horas mediante la medida del antígeno p24 en el sobrenadante de las transfecciones como se explica en el apartado 3.3.7. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y almacenaron a -70°C hasta su uso.

3.12. Caracterización de las variantes virales.

3.12.1. Titulación en células TZM-bl.

El título del sobrenadante de los co-cultivos, así como de los pseudovirus obtenidos mediante transfección, se realizó siguiendo el protocolo de Montefiori, 2014 disponible en <http://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/Protocol-for-Neutralizing-Antibody-Screening-Assay-for-HIV-1-in-TZMbl-cells-December-2014.pdf>.

En una placa de ELISA de 96 pocillos se añadió 100µl de DMEM-C en cada uno de ellos, seguido por 25µl de virus o pseudovirus en la primera columna y se realizaron diez diluciones seriadas en las siguientes columnas. Posteriormente se añadieron 1x10⁶ células TZM-bl por placa, añadiéndoles DEAE-dextrano (4mg/ml), en la última columna sólo se añadieron células como control. Se incubaron a 37°C. A las 48 horas se lisaron las células y se midió la producción de luciferasa “Luciferasa assay system” (Promega). A partir de las URL se calcularía posteriormente la dosis infecciosa en cultivo celular (TCID₅₀) utilizando la herramienta disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm>. El experimento se realizó por duplicado y con cuatro réplicas de cada pocillo ensayado.

3.12.2. Infección con la misma cantidad de p24.

24 horas antes de realizar la infección se sembraron 100.000 células TZM-bl en 0,5ml de DMEM completo por pocillo en una placa de 48 pocillos. La infección se realizó con 30 unidades (15 ng) de p24 del sobrenadante de los co-cultivos. Posteriormente se añadió 2,5µl de DEAE-dextrano (4mg/ml) y se incubaron durante 48 horas. Por último, se lisaron las células y se midió la actividad luciferasa mediante el equipo “Luciferasa assay system” (Promega).

3.13. Análisis de las secuencias.

3.13.1. Edición y alineamiento de las secuencias.

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas se utilizó una región de 614-pb desde la porción distal de C2 hasta la porción proximal de C5 (nucleótidos 7068 a 7682 en el clon HXB2). Las secuencias nucleotídicas obtenidas por dilución límite fueron inicialmente editadas utilizando el programa SeqMan versión 3.61 (Dnastar Inc, Madison, Wis.) y alineadas con el programa CLUSTAL X versión 1.8. Los alineamientos fueron posteriormente editados y corregidos a mano para asegurar un marco correcto de lectura. Toda posición en la que no existía información completa para el conjunto de secuencias que formaban el alineamiento (“gaps”) se excluyeron de todos los análisis posteriores. Todas las secuencias defectivas que presentaban codones de parada producidos por hipermutación o pérdida de fase, fueron también eliminadas.

3.13.2. Análisis filogenéticos.

Para realizar los primeros análisis y a modo de “screening”, los árboles filogenéticos se reconstruyeron por el método del vecino más próximo (Neighbor-Joining, NJ), utilizando el programa MEGA 6.0 [195]. Las matrices de distancia se calcularon mediante el modelo Kimura-2 parámetros, y la robustez estadística de los árboles generados se probó mediante un remuestreo de 1000 réplicas. Una vez fueron analizadas todas las secuencias y excluidas las posibles contaminaciones, los árboles filogenéticos se reconstruyeron por el método de máxima verosimilitud (“Maximun- Likelihood”, ML).

Para cada individuo, se seleccionó el mejor modelo de sustitución nucleotídica de acuerdo con el “Akaike information criterion (AIC) [196] en Modeltest 3.6 [197, 198] Los árboles de máxima verosimilitud fueron construidos utilizando el modelo de sustitución nucleotídica elegido mediante el programa Phyml v.2.4.1 [199], empezando la búsqueda a partir de un árbol BIONJ [200]. La robustez estadística de los árboles generados se probó mediante un remuestreo de 1000 réplicas.

Todos los árboles fueron generados sin raíz, por lo que se utilizaron como grupos externos las cepas de referencia HXB2-LAI (IIIB) y el aislado de referencia del laboratorio S61 (89ES061) del VIH-1 (<http://www.hiv.lanl.gov>).

3.13.3. Cálculo de distancias genéticas.

Las distancias nucleotídicas entre secuencias fueron estimadas por el método de ML en el programa PAUP v 4.0b10, utilizando la media ponderada de los parámetros obtenidos por el Modeltest v 3.6 [198].

La heterogeneidad de una cuasiespecie viral se definió como la distancia genética media entre todas las posibles comparaciones de pares de secuencias dentro de una misma muestra. La divergencia de una cuasiespecie se definió como la distancia genética media entre todas las secuencias obtenidas en una muestra y el ancestro común más reciente del virus (ACMR). La divergencia anual se definió como el incremento medio por año de la distancia genética de las secuencias de la cuasiespecie al ACMR del virus.

3.13.4. Reconstrucción del ancestro común más reciente (ACMR).

El ACMR para todas las secuencias nucleotídicas pertenecientes a un mismo paciente, fue inferido utilizando el programa PAUP v4.0b10, a partir del árbol filogenético reconstruido por el método de ML en el programa PhyML, utilizando los modelos de sustitución seleccionados por el programa Modeltest. Este ACMR representa el nodo a partir del cual se originan todas las secuencias nucleotídicas de cada virus.

3.13.5. Análisis de mutaciones.

Para determinar las posiciones aminoacídicas sometidas a selección positiva (acumulación de mutaciones no sinónimas) o negativa (acumulación de mutaciones sinónimas) mutaciones en la región C2-V5 del gen *env* de los virus de los individuos LTNP, se fueron calculadas por el método “REL”, “FEL” y “SLAC” [201] utilizando el programa HYPHY que se encuentra disponible en www.datamonkey.org. Sólo se tuvieron en cuenta aquellas posiciones que fueron identificadas por al menos dos de los métodos de análisis utilizados.

La proporción de mutaciones sinónimas por sitio sinónimo (dS) y no sinónimas por sitio no sinónimo (dN), así como la diferencia $dN-dS$ entre secuencias de una misma muestra o de muestras distintas dentro de cada individuo se calcularon por el método “p-distance” (1000 réplicas) modificado de Nei y Gojobori, utilizando el programa MEGA 6.0 [202]

3.13.6. Secuencias nucleotídicas utilizadas para la construcción de la curva de datación.

Las secuencias nucleotídicas de la región variable V3 del gen *env* de 171 muestras españolas del subtipo B del HIV-1 fueron obtenidas en nuestro laboratorio desde 1989 hasta 2003. Las muestras provenían de individuos que eran hombres que tenían sexo con hombres (HSH) y/o usuarios de drogas intravenosas (UDIV) del Centro de Salud Sandoval, (IdISSC, CAM, Madrid), del Hospital Ramón y Cajal (Madrid) y del Hospital General de Navarra.

A partir del alineamiento de dichas secuencias, se generó una secuencia consenso española (SCEsp) que incluía el nucleótido más frecuente en cada posición como se describió anteriormente [166]. Al mismo tiempo fue inferido el ACMR de las secuencias españolas analizadas (ACMREsp) como se describe en el apartado 3.13.4.

Las muestras fueron luego agrupadas por su año de aislamiento y las distancias genéticas de cada secuencia a la SCEsp o al ACMREsp fueron estimadas por el método de 2-parámetros de Kimura (apartado 3.13.3) y por el método de ML. Para estos cálculos de distancia genética se utilizó el programa MEGA 6.0 [202].

Por último, se representó la distancia genética de cada secuencia nucleotídica (eje de ordenadas), con respecto al año de obtención de la muestra (eje de abscisas) (Fig). De esta forma se obtuvieron dos ecuaciones de la recta, una respecto a la SCEsp y otra con respecto al ACMREsp, con las cuales podíamos estimar el año de una secuencia española conociendo su distancia a la SCEsp o al ACMREsp. Para la datación de las muestras de cada virus se utilizó la secuencia nucleotídica global.

3.14. Caracterización del genotipo CCR5 Δ -32.

El análisis del genotipo CCR5 Δ -32 se realizó mediante PCR en el ADN obtenido a partir de CMSP [203]. La reacción de amplificación produjo un fragmento génico de 225 nucleótidos para el alelo salvaje, y uno de 193 para el alelo CCR5 Δ -32, los cuales fueron separados sobre un gel de poliacrilamida al 8% en Tris borato 45 mM, EDTA 10 mM (TBE).

3.15. Determinación de marcadores genéticos. Tipado de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA).

El tipado de los HLA que presentan los LTNP “modernos” fue tomado de un trabajo previo del grupo en el que se analizaron las asociaciones descritas de los alelos *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C* con la progresión o protección de la enfermedad, la asociación del alelo *HCP5* rs2395029, la variante del alelo *HLA-C* (rs9264942), así como los polimorfismos *CCR5Δ32* (rs333), *CCR2 V64I* (rs1799864), *CCR5 A29G* (rs285675), *CCR5 G208T* (rs2734648), *CCR5 G303A* (rs1799987), *CCR5 C627T* (rs1799988), *CCR5 C927T* (rs1800024) que definen los haplotipos humanos (HH), así como el número de copias de *CCL3L1*. El tipado se realizó en el Instituto de Microbiología del Centre Hospitalier Universitaire Baudios (Lausanne-Suiza), en colaboración con el laboratorio del Dr. Amalio Telenti [204].

3.16. Análisis estadísticos.

Los cálculos estadísticos sobre los datos obtenidos se realizaron con los programas Graph Pad PRISM versión 2.01 (Graph Pad Software Incorporated). La prueba estadística utilizada se indica en cada caso.

4. RESULTADOS

4.1 INDIVIDUOS VIH ESTUDIADOS.

4.1.1 Definición de los individuos estudiados.

El presente estudio se va a centrar en un grupo de individuos VIH-1 LTNP. Los individuos que pertenecen al grupo de LTNP se caracterizan por tener baja carga viral, un número de células CD4⁺ estables por encima de 500 células/ μ l, manteniéndose asintomáticos durante más de 10 años sin recibir terapia antirretroviral. Estos sujetos son una minoría dentro de los individuos infectados por VIH (1-5%) [205] [106]. Dentro del grupo de LTNP y en función de la carga viral plasmática (CV), podemos diferenciar tres grupos de individuos: los LTNP no controladores (LTNP-NC), que tienen una CV superior a las 2.000 copias/ml; los LTNP controladores virémicos (LTNP-CV) con una CV comprendida entre las 50 copias/ml y las 2.000 copias/ml, y los LTNP controladores de élite (EC) con una CV por debajo de las 50 copias/ml es decir, indetectable [204].

Dado que estudios previos ya demostraban que el grupo de individuos LTNP incluía individuos con distintas características clínicas y distinta evolución de sus cuasiespecies virales [206], lo primero que nos propusimos fue intentar clasificar los individuos de la cohorte de LTNP establecida en el laboratorio de virología molecular del Centro Nacional de Microbiología del ISCIII.

4.1.2 Datación de las secuencias virales.

La datación de las secuencias virales, es una metodología descrita previamente por nuestro grupo de investigación [206], que nos permite datar las secuencias nucleotídicas presentes en las cuasiespecies de los individuos infectados. Este método de datación, se basa en la existencia de un reloj molecular en la evolución del VIH-1. Esta aproximación se ha utilizado para datar el origen de la pandemia [207], el origen de epidemias locales [166, 167], o el momento de transmisión entre individuos [129, 150].

Este análisis se realizó con las secuencias nucleotídicas de muestras obtenidas desde el año 1989 hasta el año 2003. A partir del alineamiento de estas secuencias, se generó una SCEsp (ver apartado 3.13.6) que incluye el nucleótido más frecuente en cada posición [166]. Se calculó no solo la distancia genética de las muestras a la SCEsp sino también al ACMREsp como se describe en el apartado 3.13.4 Con este conjunto de secuencias,

utilizando un análisis de regresión lineal, nuestro grupo detectó una correlación positiva entre el año de obtención de la muestra y la distancia genética a la SCEsp o al ACMREsp. [206]

Como se observa en la figura 4.1, aunque existe una gran dispersión de los valores, se confirma una correlación positiva entre el año de obtención de la muestra y la distancia genética tanto a la SCEsp ($r^2 = 0,1933$; pendiente = $0,005473$, $P < 0,0001$) como al ACMREsp ($r^2 = 0,1912$; pendiente = $0,005766$; $P < 0,0001$). En ambas regresiones, la pendiente de la curva representa la tasa media de divergencia anual de las muestras españolas para la región V3 del gen *env*. La intersección con el eje X estima el inicio de la epidemia en España en el año 1977 (1968-1981) para la secuencia consenso y en 1975 (1968-1980) para el ACMREsp. Estas fechas están en concordancia con los datos epidemiológicos disponibles ya que el primer caso de SIDA en España se diagnosticó en 1981 (<https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/home.htm>).

Basándonos en los análisis de las distancias genéticas a la SCEsp o al ACMREsp, pudimos datar las secuencias de los individuos LTNP como se describe en el apartado 3.13.6.

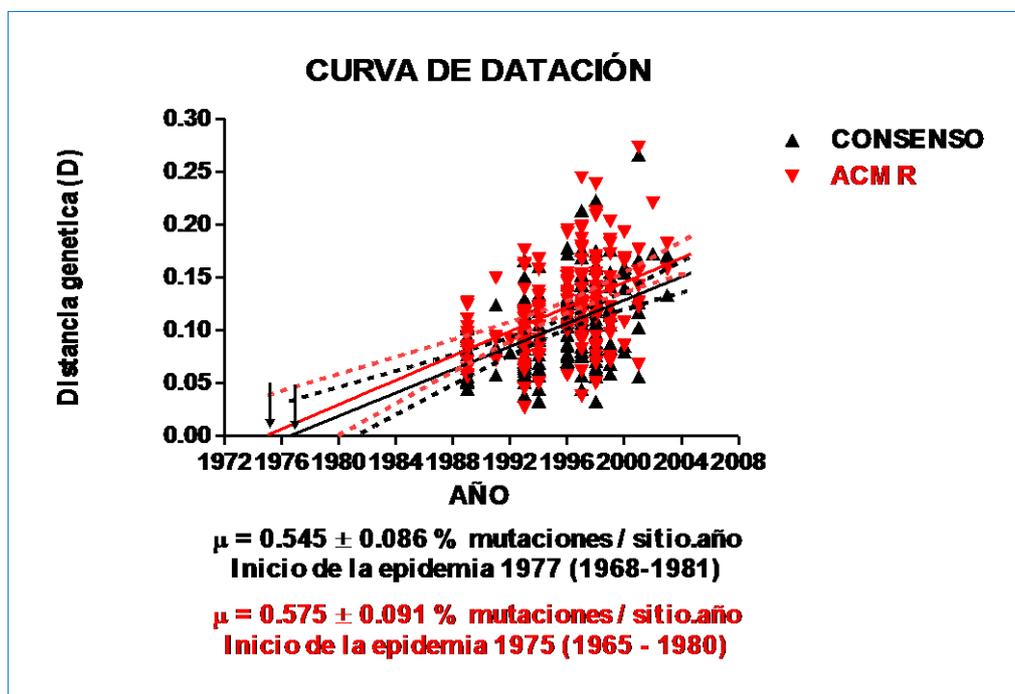


Figura 4.1 Divergencia genética en la región V3 del gen *env* en función del año de obtención de la muestra. Este estudio se realizó para un conjunto de 171 secuencias españolas del subtipo B de individuos con distintas prácticas de riesgo y origen geográfico. La distancia nucleotídica (D) a la SCEsp y la distancia al ACMREsp fue calculado por el método de ML. Las muestras fueron tomadas entre los años 1989 y 2003, y cada punto en la regresión representa la secuencia nucleotídica obtenida de un virus. Las flechas señalan la intersección con el eje de abscisas que indica el año de origen de la epidemia en España, 1977 para la SCEsp y 1975 para el ACMREsp [206].

4.1.3 Clasificación de los virus de los individuos LTNP según la datación de las secuencias nucleotídicas.

Teniendo en cuenta la datación de las secuencias virales presentes en las cuasiespecies, descrita en el apartado anterior, hemos podido clasificar los individuos LTNP en “ancestrales” y “modernos” (ver tablas 4.1 A y 4.1 B). Hemos definido los individuos LTNP “ancestrales”, como aquellos individuos donde solo se detectaron secuencias de ADN proviral que se encontraban próximas a la fecha de seroconversión del individuo. El grupo de individuos LTNP “modernos” es aquel en el cual la fecha de datación de las secuencias nucleotídicas coincidía o era cercana a la fecha de obtención de la muestra [59]. Como se puede observar en las tablas 4.1A y 4.1B, entre ambos grupos hay diferencias también a nivel de carga viral. El grupo de LTNP “modernos” tiene cargas virales bastante más elevadas que el de LTNP “ancestrales”.

Tabla 4.1 A. Individuos LTNP “ancestrales”.

Individuos	Año de Obtención de la muestra	Año Seroconversión	Datación ^a	Carga Viral (copias/ml) ^b
LTNP 1	2001-2005	<1990	1981	248
LTNP 2	2001-2003	1987	1984	118
LTNP 3	2002-2007	1988	1982	<50
LTNP 5	2002-2006	1986	1983	241
LTNP 17	2004-2006	1997	1998	<50
LTNP 20	2004-2005	1988	1984	69
LTNP 21	2005-2006	1992	1987	<50
LTNP 56	1998-2006	1989	1982	621

Tabla 4.1 B. Individuos LTNP “modernos”.

Individuos	Año de Obtención de la muestra	Año Seroconversión	Datación ^a	Carga Viral (copias/ml) ^b
LTNP 7	2001	1987	2001	727
LTNP 10	2003	1991	2003	5181
LTNP 12	2003	1986	2000	2463
LTNP 14	2003	1991	2003	19102
LTNP 19	2004	1988	2004	8640
LTNP 30	2000	1988	1999	14875
LTNP 45	1998	1990	2000	616
LTNP 64	2002	1986	1999	24558

Tabla 4.1 A y B Clasificación de los virus de los individuos LTNP en función de la datación. a) Año de datación de las secuencias globales mediante el cálculo de la distancia a la SCesp descrita en el apartado anterior, b) Carga viral a lo largo del seguimiento calculada a partir de las determinaciones de carga viral positiva según el límite de detección del equipo comercial disponible Amplicor HIV-1 Monitor™ Test (Roche Diagnostic Systems, Somerville, NJ) y Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA), Siemens, (<500 copias/ml y <50 copias/ml respectivamente).

4.2. Estudio de los virus de individuos LTNP “modernos”.

Esta tesis se ha centrado en analizar la evolución del VIH-1, en un grupo de ocho individuos LTNP “modernos” descritos en el apartado anterior. Dos de los individuos eran LTNP-CV (LTNP 7 y LTNP 45) y los seis restantes LTNP-NC. Las muestras fueron obtenidas en el Centro Sanitario Sandoval, perteneciente a la Fundación Hospital Clínico San Carlos (IdiSSC) de la Comunidad de Madrid. Los individuos analizados en el presente trabajo eran HSH y/o UDIV. Analizaremos las características virológicas, inmunológicas y genéticas de los individuos, así como la posible correlación de estas características con el estatus clínico y qué características los diferencian del resto de individuos LTNP.

4.2.1 Análisis filogenético de los virus de los individuos LTNP “modernos”.

Para estudiar la evolución viral en los individuos LTNP “modernos”, se llevó a cabo un análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas a dilución límite (ver apartado 3.13.2). Se intentó analizar al menos 20 secuencias nucleotídicas individuales en cada muestra de cada individuo, como se describe en el apartado 3.9.1. Las secuencias fueron editadas y alineadas según se describe en el apartado 3.12.1. Se emplearon distintos métodos filogenéticos (N-J y ML) para la reconstrucción de los árboles con resultados concordantes.

A continuación, se presentan los árboles filogenéticos reconstruidos por el método de ML (ver apartado 3.13.2) (Los alineamientos de las secuencias se encuentran disponibles en el anexo I). Todos los árboles fueron generados sin raíz, por lo que se utilizaron como grupos externos las cepas de referencia HXB2-LAI (IIB) y 89ES061 (S61) del VIH-1, (<http://www.hiv.lanl.gov>), (ver figuras 4.2 A - 4.2 H).

En el análisis todas las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada individuo forman grupos monofiléticos con altos valores de remuestreo (>90%), con excepción de los individuos LTNP 12 y LTNP 64 donde el valor de remuestreo, al utilizar como grupo externo las cepas de referencia del subtipo B, es del 49% y 69% respectivamente (figuras

4.2 B y 4.2 H). Además, en ambos casos se detectan clados independientes con alto valor de remuestreo, e incluso en el caso del virus del LTNP 12 una de las cepas de referencia se incluye entre ambos clados. Estos datos podrían estar indicando que estos individuos están infectados por dos virus.

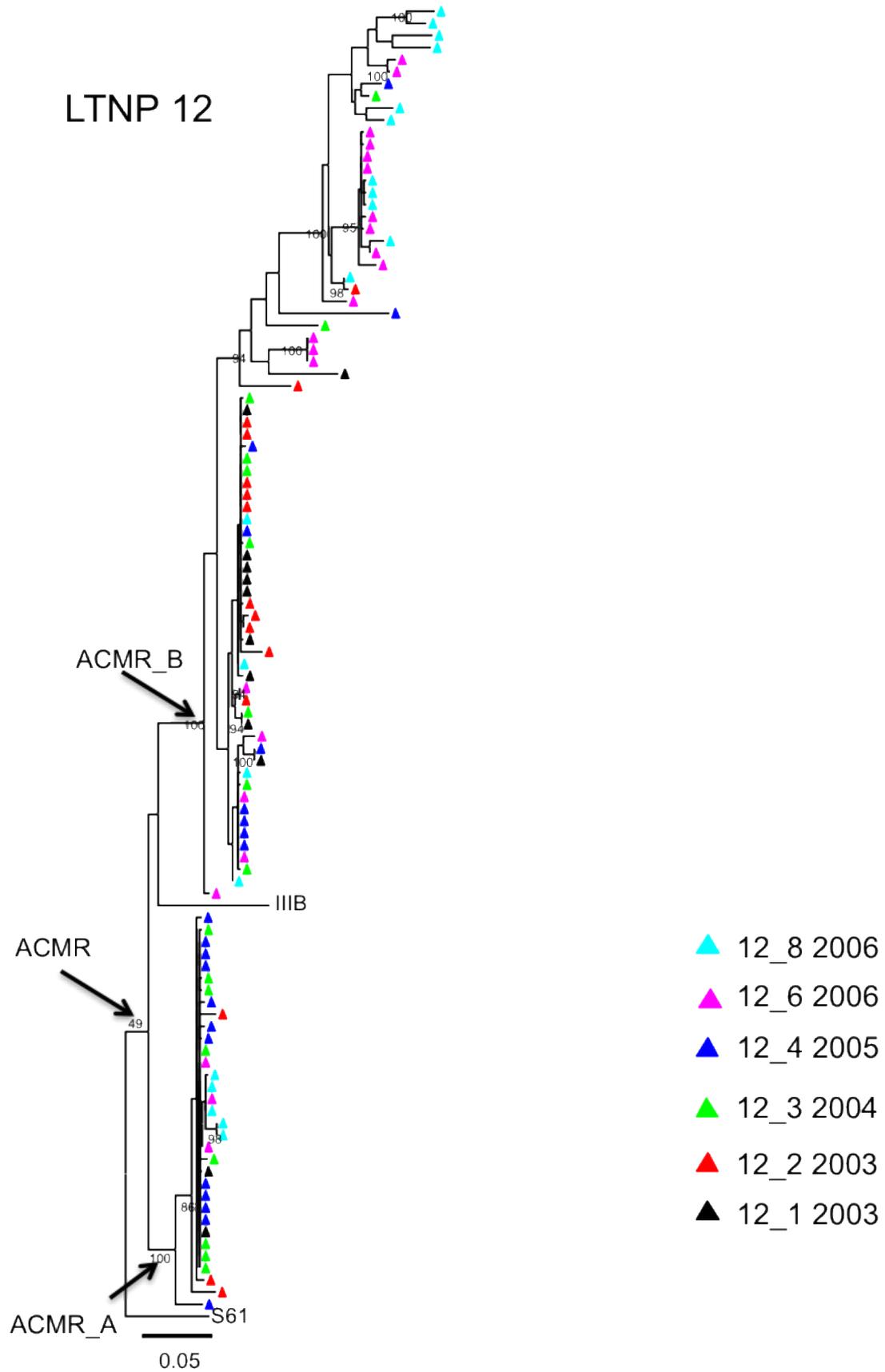


Figura 4.2 B: Evolución de la cuasispecie viral del paciente LTNP 12 entre los años 2003 y 2006. (Evolución “Temporal”)

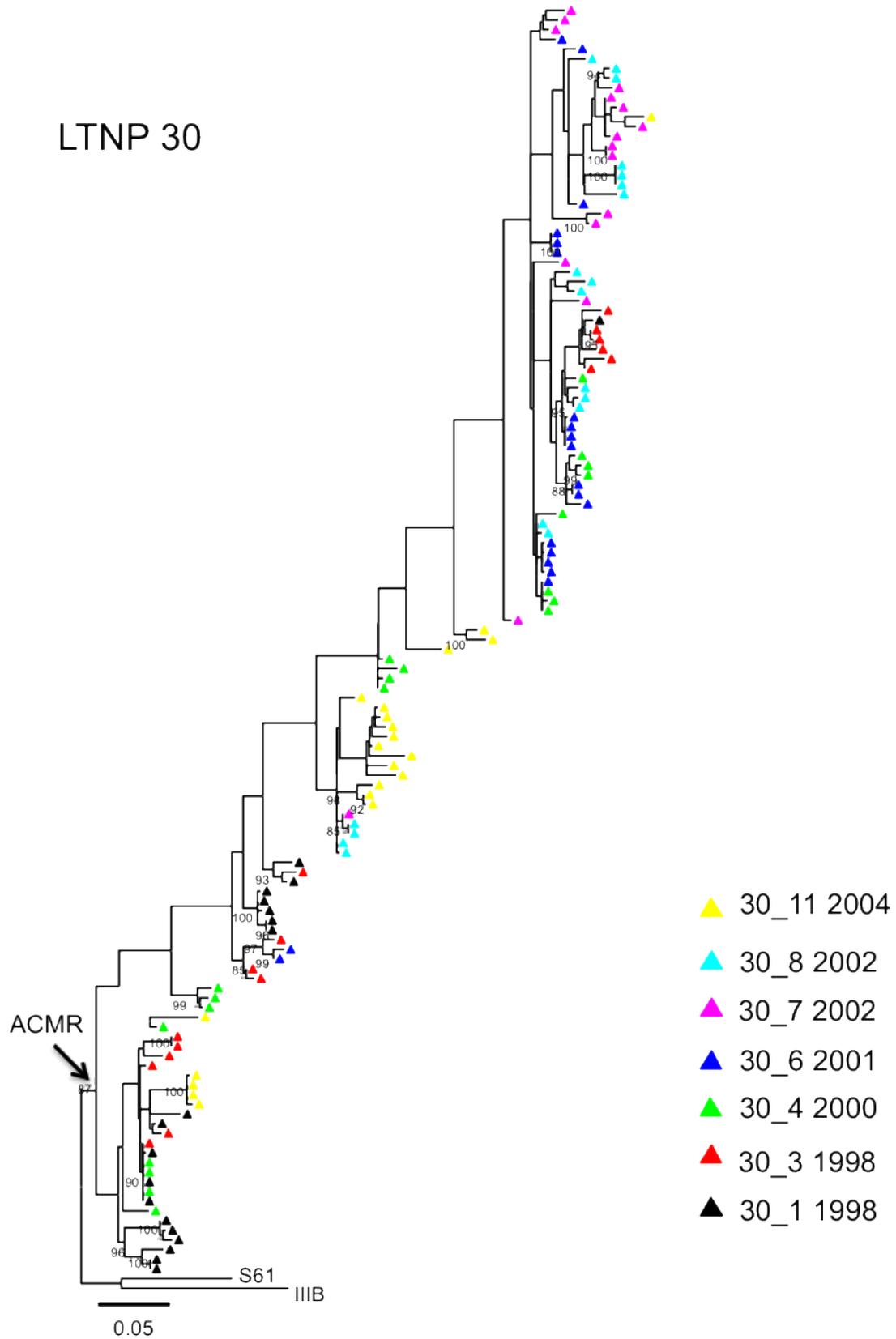


Figura 4.2 C: Evolución de la cuasispecie viral del paciente LTNP 30 entre los años 1998 y 2004. (Evolución “Temporal”).

LTNP 14

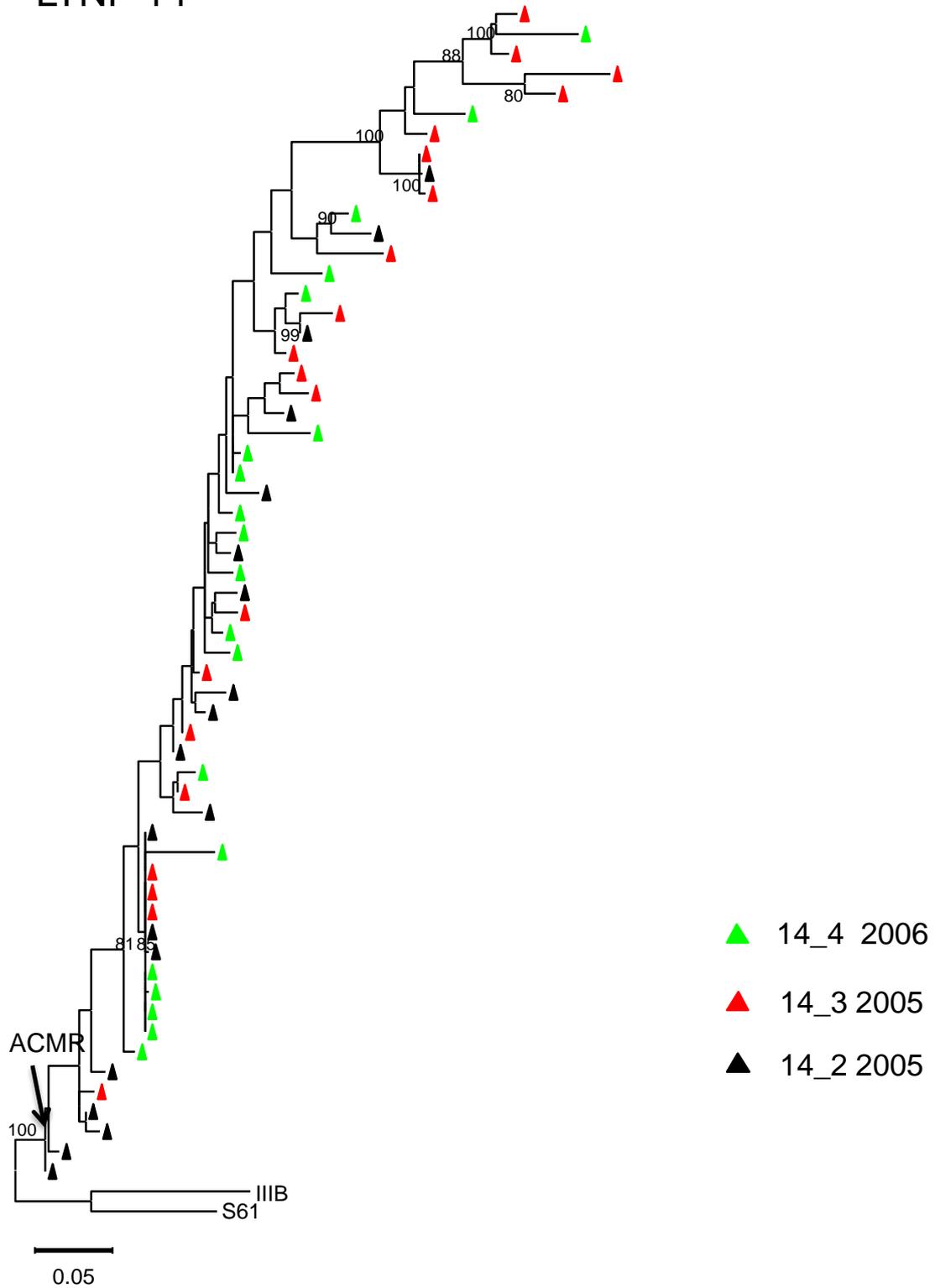


Figura 4.2 E: Evolución de la cuasispecie viral del paciente LTNP 14 entre los años 2005 y 2006. (Evolución “Atemporal”).

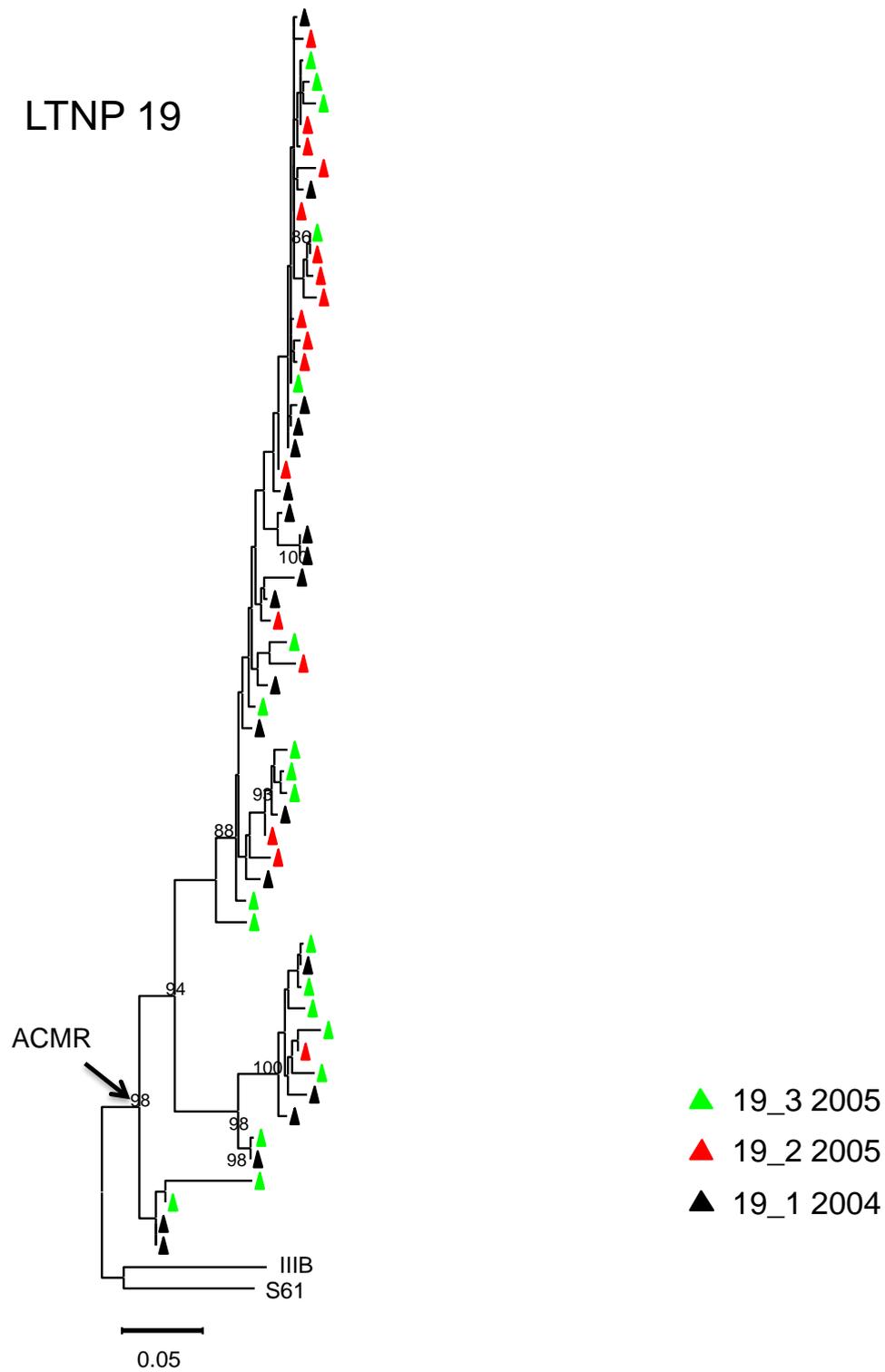


Figura 4.2 F: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 19 entre los años 2004 y 2005. (Evolución “Atemporal”).

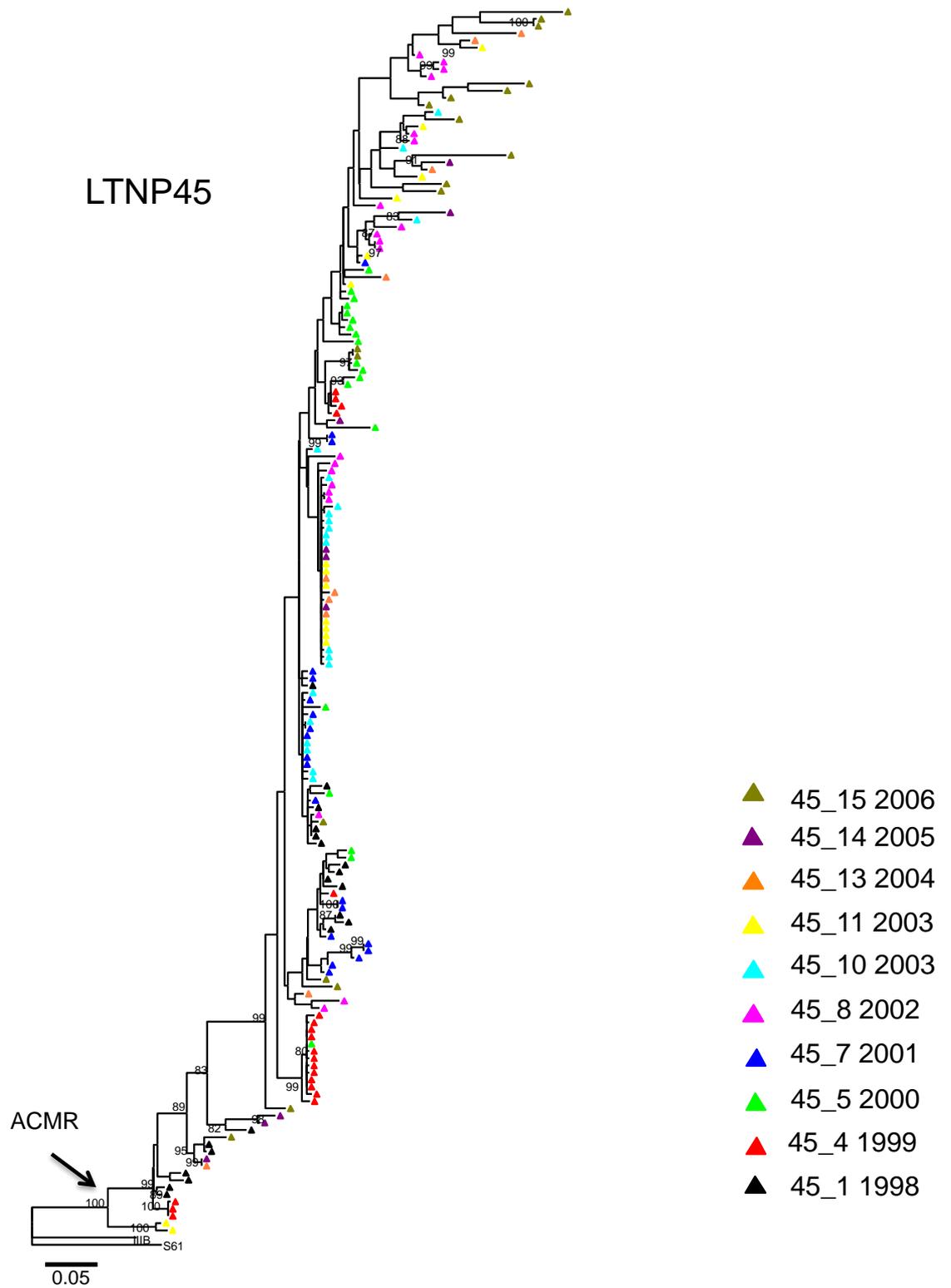


Figura 4.2 G: Evolución de la cuasispecie viral del paciente LTNP 45 entre los años 1998 y 2006. (Evolución “Atemporal”).

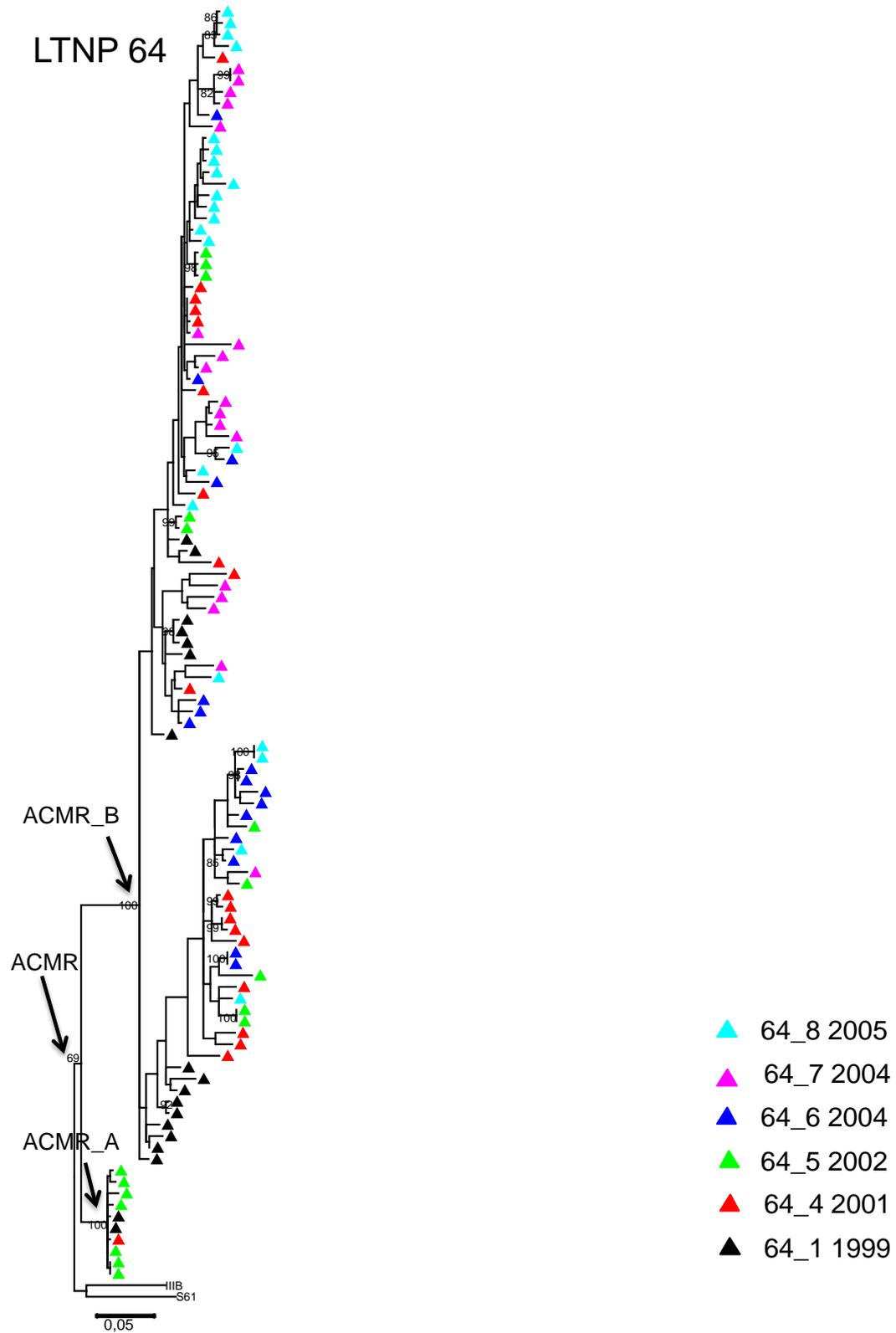


Figura 4.2 H: Evolución de la cuasispecie viral del paciente LTNP 64 entre los años 1999 y 2005. (Evolución “Atemporal”).

4.2.2 Análisis filogenético de dos individuos con una potencial doble infección por el VIH-1.

Para intentar investigar si los individuos LTNP 12 y LTNP 64 estaban infectados por más de un virus, decidimos volver a reconstruir el árbol filogenético incluyendo en el análisis cepas de referencia del subtipo A y D como grupos externos. Como se puede observar en la figura 4.3, el valor de remuestreo para el nodo que agrupa todas las secuencias virales de un individuo sigue siendo excesivamente bajo (49%) en el caso del LTNP 12. Sin embargo, en el caso del LTNP 64, aunque las secuencias agrupan todas juntas con un valor de remuestreo del 100%, los dos virus de referencia del subtipo B se introducen dentro del clado menos evolucionado del individuo LTNP 64. Estos datos podrían indicar que estos individuos podían estar doblemente infectados.

Para confirmar la doble infección en estos individuos, se reconstruyó un árbol filogenético por ML a partir de secuencias nucleotídicas derivadas del gen de la envuelta completo. Se incluyeron secuencias obtenidas de individuos españoles, europeos, canadienses y estadounidenses con distintos tipos de progresión. También se incluyeron cepas de referencia de distintos subtipos (figura 4.5). Como se puede observar en la figura 4.5, todas las secuencias correspondientes a un mismo individuo formaron clados únicos (incluidas las obtenidas del paciente LTNP 64), sólo las secuencias obtenidas del paciente LTNP 12 forman dos clados independientes (A y B). La distancia genética media entre los clados A y B (5.4%) es mayor que la distancia genética de cualquiera de estos dos clados a otros aislados españoles no relacionados epidemiológicamente. El rango de distancias genéticas entre cada clado y los aislados españoles VIH-1 analizados, fue de entre 2.2%-17.8% para el clado A y de 2.0%-18.3% para el clado B.

La presencia de dos clados independientes en la cuasiespecie viral del paciente LTNP 12 junto con una mayor distancia genética entre los clados A y B que con aislados virales no relacionados epidemiológicamente, indica que este paciente está doblemente infectado con dos virus del subtipo B. A partir de que confirmamos la presencia de la doble infección, se analizaron de forma independiente las dos poblaciones virales.

En el caso del paciente LTNP 64, su cuasiespecie formó un clado único por lo que no podemos confirmar la existencia de una doble infección. La presencia de dos poblaciones virales claramente diferenciadas, donde una población se encuentra más alejada del ACMR (población B), y otra población mucho más próxima al ACMR (población A) indica distinto grado de evolución en ambas poblaciones que podría estar relacionada con compartimentalización de la infección en este paciente.

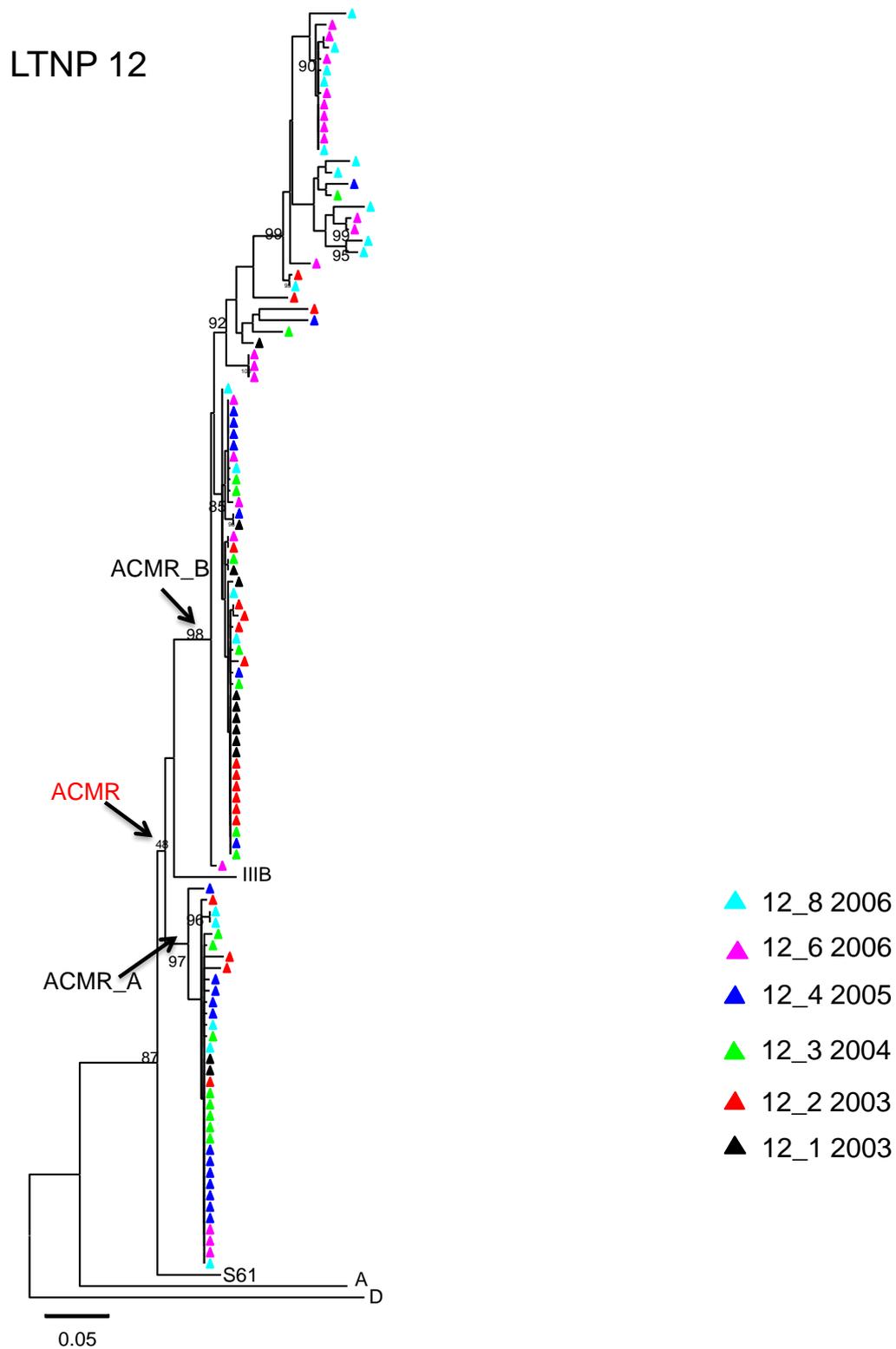


Figura 4.3: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 12 entre los años 2003 y 2006. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en el apartado 3.13.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia S61 y III B del subtipo B así como una secuencia del subtipo A y del subtipo D como grupos externos. Los números de los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos con 1000 réplicas y solo se representan valores mayores del 75%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. La barra representa un 5% de distancia genética.

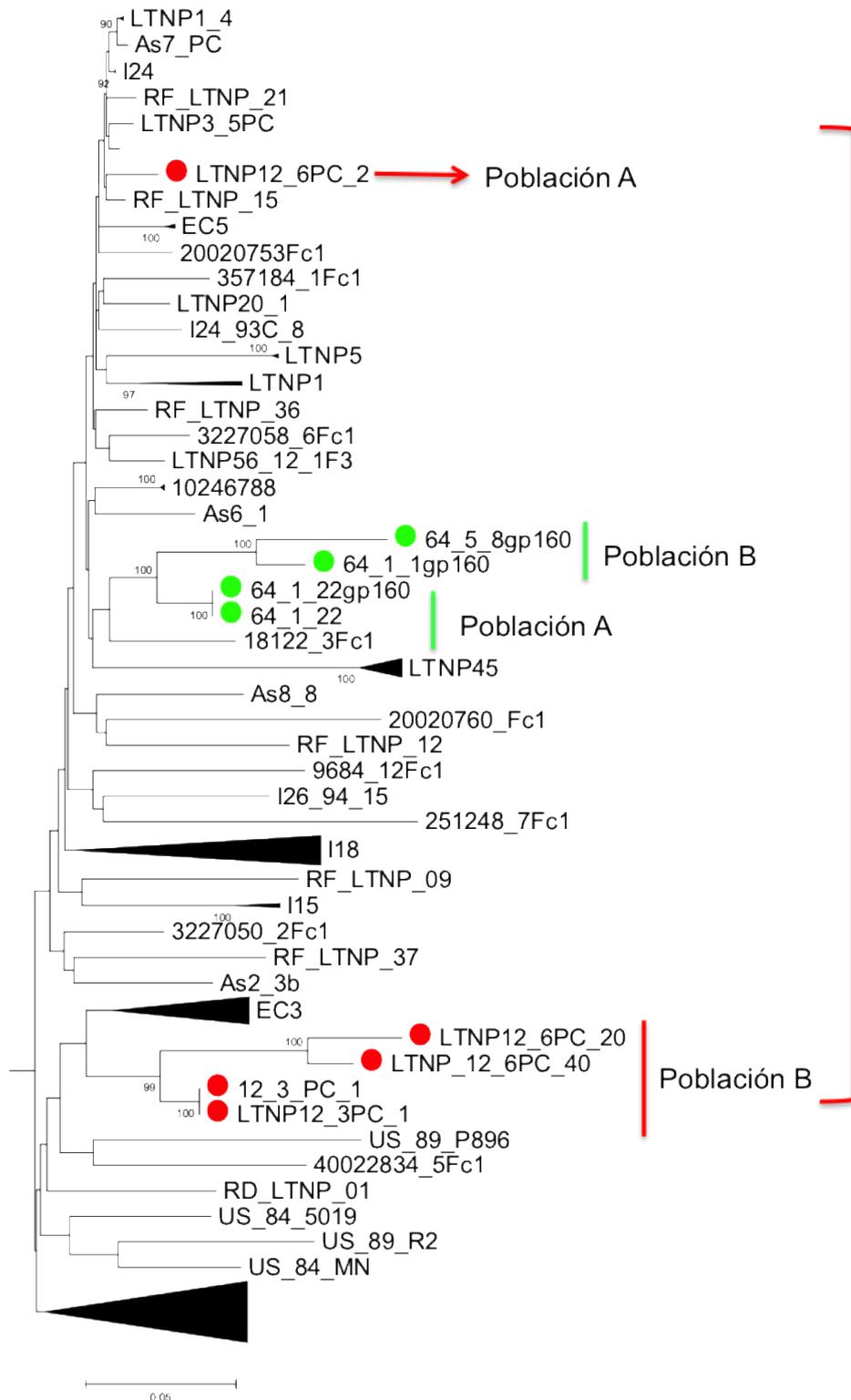


Figura 4.5: Reconstrucción filogenética de secuencias nucleotídicas únicas obtenidas de individuos con distintos tipos de progresión, a partir del gen de la envuelta completo. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en el apartado 3.13.2, utilizando secuencias del gen completo de la envuelta de distintos tipos de individuos VIH-1 subtipo B pertenecientes a distintos grupos de riesgo y distintos países. Las cuasiespecies obtenidas de los individuos españoles que no eran objeto del estudio se colapsaron para visualizar mejor el árbol. La cuasiespecie obtenida del paciente LTNP 12 se muestra en color rojo y la del paciente LTNP 64 en color verde.

4.2.3 Heterogeneidad y divergencia de las cuasiespecies virales.

Tras la reconstrucción filogenética, analizamos la variabilidad genética en los virus de los individuos mediante el cálculo de heterogeneidad y divergencia virales, para determinar si eran concordantes con los modelos de evolución previamente descritos por el grupo [208].

La heterogeneidad de la cuasiespecie viral, se definió como la distancia genética media entre todas las posibles comparaciones de pares de secuencias dentro de una misma muestra. Esta heterogeneidad fue analizada en el ADN viral proveniente de CMSP según se describe en el apartado 3.13.3.

La divergencia de una cuasiespecie viral, se definió la distancia genética entre todas las secuencias obtenidas en una muestra y el ACMR del individuo, según se describe en el apartado 3.13.3 y 3.13.4. La divergencia anual se definió como el incremento medio por año de la distancia genética de las secuencias de la cuasiespecie al ACMR (ver apartado 3.13.4).

La heterogeneidad media obtenida en las cuasiespecies virales de los individuos analizados oscila entre el 5.4 y el 8.6% y la divergencia anual media de los virus de estos individuos oscila entre el 0.84 y el 1.5% (ver tabla 4.2 ,4.3, 4.4 y la figura 4.6).

Tabla 4.2. Características virológicas de los individuos LTNP “modernos”.

Modelo	Paciente	Año de VIH+	Año muestra	Datación ^a	VIH RNA ^b Copias/ml	VIH DNA ^c Copias/10 ⁶	Heterogeneidad media ^d	Divergencia ^e
Temporal	LTNP 10	1991	2003	2003	5154	36.4	8.2±0.9	1.5±0.13
	LTNP 12	1986	2003	2000	2463	5.6	A=0.73±0.3 B=6.4±0.7	A=NS B=1.2±0.28
	LTNP 30	1988	2000	1999	14875	47	7.3±1.3	1.2±0.28
Atemporal	LTNP 7	1987	2001	2001	727.4	11.4	8.6±1.6	NS
	LTNP 14	1991	2003	2003	19102	21.6	6.7±0.8	NS
	LTNP 19	1988	2004	2004	8640	10.2	6.0±1.3	NS
	LTNP 45	1990	1998	2000	616.2	5	5.4±0.6	NS
	LTNP 64	1986	2000	1999	24558	47	6.6±0.5	NS

Tabla 4.2: Características virológicas de los individuos LTNP “modernos”. a) año de datación de las secuencias virales mediante la ecuación de la figura 4.1, b) carga viral media durante el seguimiento que incluye al menos tres muestras, c) carga proviral media durante el seguimiento que incluye al menos tres muestras, d) los valores de heterogeneidad media se corresponden al valor promedio de los valores de heterogeneidad obtenidos en cada una de las muestras analizadas del paciente tal y como se indica en el apartado 3.13.3 ± el error estándar, e) divergencia promedio anual (en %) estimada como se describe en el apartado 3.13.4 ± el error estándar. Los casos en los que el cálculo de la divergencia media anual no alcanzó un valor estadísticamente significativo se muestran como NS.

4.2.4. Clasificación de los virus de los individuos LTNP “modernos”.

En función de los resultados obtenidos en el apartado 4.2.1 y 4.2.3, los individuos fueron clasificados según su modelo de evolución en “temporales” o en “atemporales” siguiendo la clasificación descrita por Bello et al. [208] (ver tabla 4.2).

La topología correspondiente al modelo “temporal”, representada por los individuos 10, 12B y 30 (ver figuras 4.2 A, B y C), se caracteriza por una continuidad en la evolución del virus, pues a partir de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la cuasiespecie más antigua se originaban las secuencias nucleotídicas que constituían las cuasiespecies posteriores. Además, se observa como en general, las secuencias aisladas más tardíamente se encontraban más lejos del nodo del árbol filogenético (ACMR del paciente) que las secuencias más tempranas.

En la topología del modelo “atemporal”, representada por los individuos 7, 14, 12A, 19, 45 y 64 (ver figuras de la 4.2 D a la H), no se observa una continuidad en la evolución viral y las variantes que circulaban en un momento dado no siempre daban origen a las variantes inmediatamente posteriores. Por su parte, las secuencias nucleotídicas de las muestras más tardías tampoco se hallaban necesariamente más distantes del ACMR del paciente que las variantes más tempranas.

El patrón “temporal”, característico de los individuos 10, 12B y 30, coincidía perfectamente con el modelo descrito por Mullins para individuos crónicos [151], que se caracterizaba por un incremento constante tanto de la heterogeneidad como de la divergencia de las cuasiespecies a lo largo del tiempo. El patrón “atemporal”, característico de los individuos 7, 10, 12A, 19, 45 y 64 no sigue este modelo y se caracterizaba por una falta de estructura temporal en la diversificación de las cuasiespecies. En este patrón de evolución no hay un aumento de la divergencia anual media.

4.2.4.1 Individuos LTNP “modernos temporales”.

Como se puede observar en la tabla 4.3 los virus de los individuos LTNP “modernos temporales” (LTNP 10, LTNP 12B Y LTNP 30) presentan una heterogeneidad que oscila entre un 4.2% y un 11.2%. La divergencia presenta unos valores que oscilan entre 6.8 % y 16.47%. En los árboles filogenéticos mostrados en las figuras 4.2 A a la 4.2 C se observa que, los individuos “temporales” muestran una sustitución constante de los linajes virales y, por lo tanto, un incremento lineal tanto de la divergencia como de la heterogeneidad de las cuasiespecies virales en el tiempo (ver figura 4.6), que no se observa en los individuos “atemporales”.

Tabla 4.3 Heterogeneidad y divergencia de los virus de los individuos LTNP “modernos temporales”.

PACIENTE	MUESTRA	HETROGENEIDAD	DIVERGENCIA
LTNP 10	10-1	7.0±0.36	10.7±0.83
	10-4	6.3±0.36	12.98±0.45
	10-6	10.0±0.40	14.36±0.68
	10-7	9.7±0.50	16.47±0.81
LTNP 12B	12-1	4.2±0.66	6.8±0.80
	12-2	5.8±0.61	7.4±0.79
	12-3	5.1±0.83	7.3±0.80
	12-4	6.4±1.0	7.5±1.00
	12-6	8.1±0.38	10.9±0.70
	12-8	8.6±0.44	12.1±1.00
LTNP 30	30-1	9.2±0.45	7.0±0.7
	30-3	11.0±0.45	8.6±0.8
	30-4	11.2±0.43	10.0±1.1
	30-6	5.0±0.38	14.0±3.2
	30-7	5.5±0.35	14.7±1.6
	30-8	7.6±0.40	13.9±2.9
	30-11	11.1±0.46	13.3±1.0

4.2.4.2 Individuos LTNP “modernos atemporales”.

Los virus de los individuos LTNP “modernos atemporales” son un grupo más heterogéneo en cuanto a diversidad genética y divergencia se refiere. Los valores de heterogeneidad oscilan entre un 0.12% a un 11.3% y los de divergencia entre un 1.8% a un 17.1% (ver tabla 4.4). El virus del paciente LTNP 12A es el que presenta unos valores de heterogeneidad y divergencia más bajos, siendo un virus poco evolucionado, pareciéndose a los virus de los individuos LTNP “ancestrales”. En el paciente LTNP 14 podemos observar un aumento tanto de heterogeneidad como de divergencia en la segunda muestra. Esto se debe a la aparición de variantes virales CXCR4 que no aparecen ni en la primera ni en la tercera muestra. En el virus del paciente LTNP 45 se puede observar un aumento lineal de la heterogeneidad en las últimas muestras, no visible en las primeras, que no se corresponde con un aumento en la divergencia, que permanece más o menos constante a lo largo del seguimiento excepto en la última muestra.

Estas variaciones en la heterogeneidad y divergencia se deben a que en estos individuos no hay un reemplazamiento temporal de los linajes virales (ver figuras 4.2 D-4.2 H). Estos datos sugieren que en estos individuos se van activando distintos reservorios virales de forma aleatoria a lo largo del tiempo, observándose fluctuaciones en las subpoblaciones virales.

A pesar de la gran diferencia a nivel de la estructura filogenética hallada en estos dos grupos de individuos, no pudimos encontrar diferencias estadísticamente significativas (t-test $p > 0.05$) a nivel de heterogeneidad o divergencia.

Tabla 4.4. Heterogeneidad y divergencia de los individuos LTNP “modernos atemporales”.

PACIENTE	MUESTRA	HETROGENEIDAD	DIVERGENCIA
LTNP 7	7-1	5.8±0.26	4.7±0.74
	7-2	8.7±0.49	6.1±1.18
	7-3	11.3±0.33	9.55±1.36
LLTNP 12	12-1	NA	1.8±0.00
	12-2	2.0±0.32	3.7±1.20
	12-3	0.2±0.04	1.8±0.07
	12-4	0.8±0.14	1.8±0.04
	12-6	0.12±0.12	1.8±0.24
	12-8	0.53±0.12	2.4±0.09
LTNP 14	14-2	5.7±0.26	6.4±1.00
	14-3	8.3±0.29	10.6±1.00
	14-4	6.2±0.32	8.9±0.80
LTNP 19	19-1	5.8±0.28	6.2±0.5
	19-2	3.7±0.30	7.4±0.20
	19-3	8.4±0.35	7.4±0.20
LTNP 45	45-1	5-9±0.27	9.1±0.80
	45-4	5.1±0.36	10.5±0.70
	45-5	4.1±0.13	12.8±0.20
	45-7	3.2±0.13	11.4±0.20
	45-8	4.4±0.13	12.1±0.20
	45-10	2.4±0.15	11.1±0.20
	45-11	6.3±0.48	10.8±0.90
	45-13	6.6±0.51	12.2±1.10
	45-14	7.1±0.60	10.4±0.90
LTNP 64	64-1	5.0±0.20	12.9±0.60
	64-4	6.8±0.20	16.5±0.60
	64-5	9.3±0.40	13.3±1.30
	64-6	6.8±0.30	17.1±0.40
	64-7	6.1±0.20	16.9±0.40
	64-8	6.0±0.20	17.0±0.30

NA: no aplicable. En esta muestra sólo se encontró una secuencia correspondiente al virus A del paciente LTNP 12.

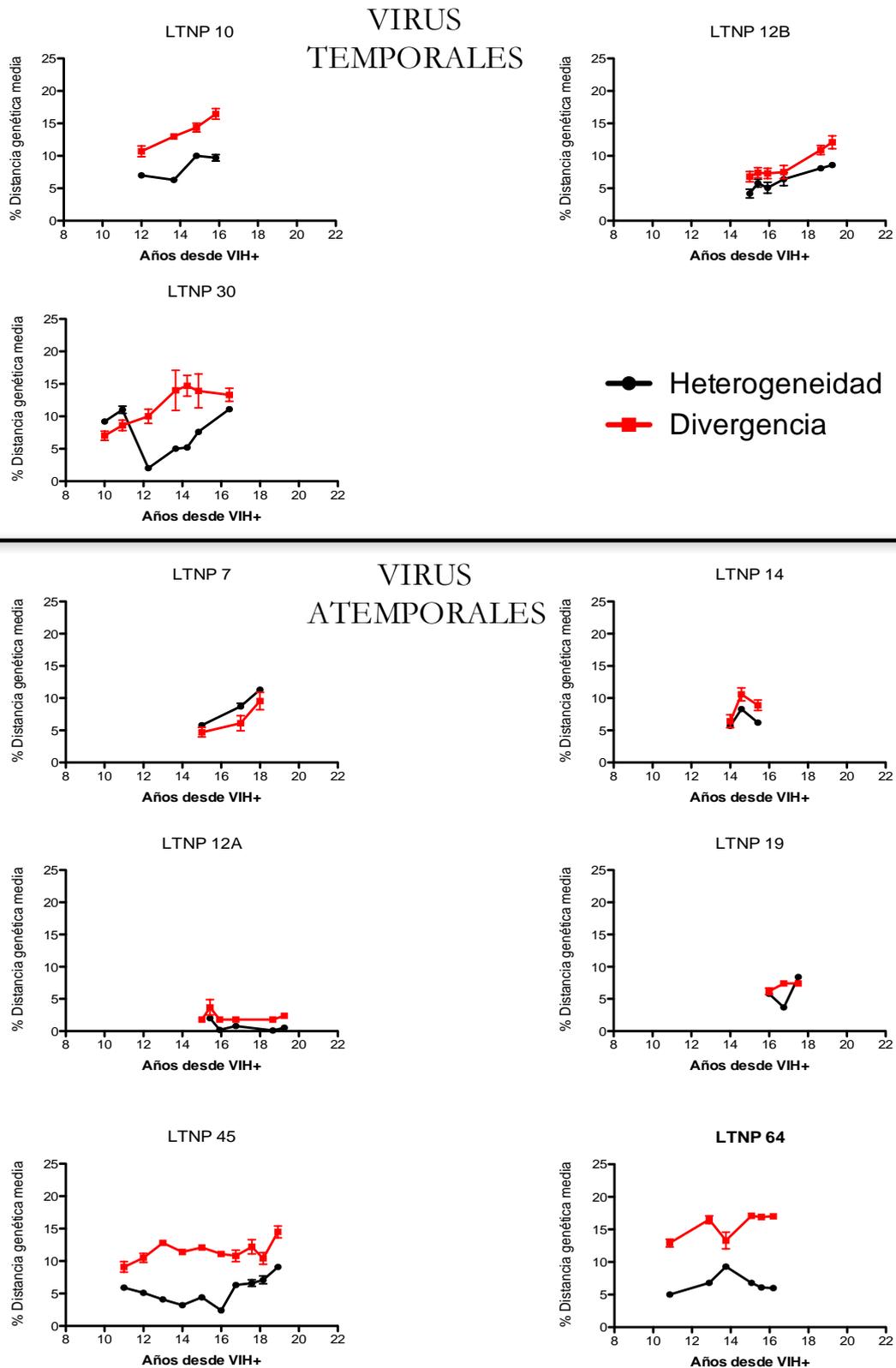


Figura 4.6. Evolución de la heterogeneidad y la divergencia viral (respecto al ACMR) durante el periodo de seguimiento de los individuos LTNP “modernos”. En la parte superior se muestran los virus con un patrón de evolución “temporal” y en la inferior los virus con patrón de evolución “atemporal”. En el eje de ordenadas se representa la distancia genética media, y en el de abscisas se representa el tiempo transcurrido en años desde el primer VIH positivo.

4.2.5 Análisis de las mutaciones sinónimas y no-sinónimas sitio a sitio en el gen *env* de los virus de los individuos LTNP.

Para tratar de investigar las causas que están promoviendo las diferencias encontradas a nivel filogenético entre los virus, nos propusimos analizar si existían diferencias en las fuerzas selectivas que podían estar influenciando la evolución de los virus en estos individuos. Para ello intentamos analizar si existían diferencias en las posiciones aminoacídicas en las que se estaban acumulando las mutaciones sinónimas y no sinónimas en las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante el programa HyPhy que se encuentra disponible en el servidor web www.datamonkey.org/. Este análisis se realizó en la región C2-V5 del gen *env*, utilizando un análisis integrativo de los resultados obtenidos con los métodos SLAC, FEL y REL. De esta forma pudimos testar las fuerzas selectivas que estaban operando en nuestro alineamiento sitio a sitio. Las posiciones sujetas tanto a selección positiva como a selección negativa fueron tenidas en cuenta cuando fueron identificadas por al menos dos de los métodos de análisis (ver apartado 3.13.5).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.7 y en la tabla 4.5 A (selección positiva) y B (selección negativa). Todas las posiciones están referidas a la secuencia consenso del subtipo B de la base de datos de Los Álamos (<https://www.hiv.lanl.gov/>).

Si observamos las gráficas de la figura 4.7, podemos ver que la distribución de los sitios de selección no es homogénea en todas las regiones estudiadas. Aunque vemos alguna posición seleccionada positivamente al final de la región C4, en las regiones V3 y C4 prácticamente sólo hay selección negativa. Que ocurra esto en las regiones V3 y C4, puede deberse a que son zonas estructuralmente muy importantes, que no se alteran fácilmente ya que en ellas se encuentran los sitios de reconocimiento del co-receptor (CCR5) y del receptor (CD4) respectivamente [209, 210].

En el resto de regiones nos encontramos con ambos tipos de selección, no existiendo una diferencia clara, ni por regiones ni por tipo de selección, entre los dos patrones de evolución viral.

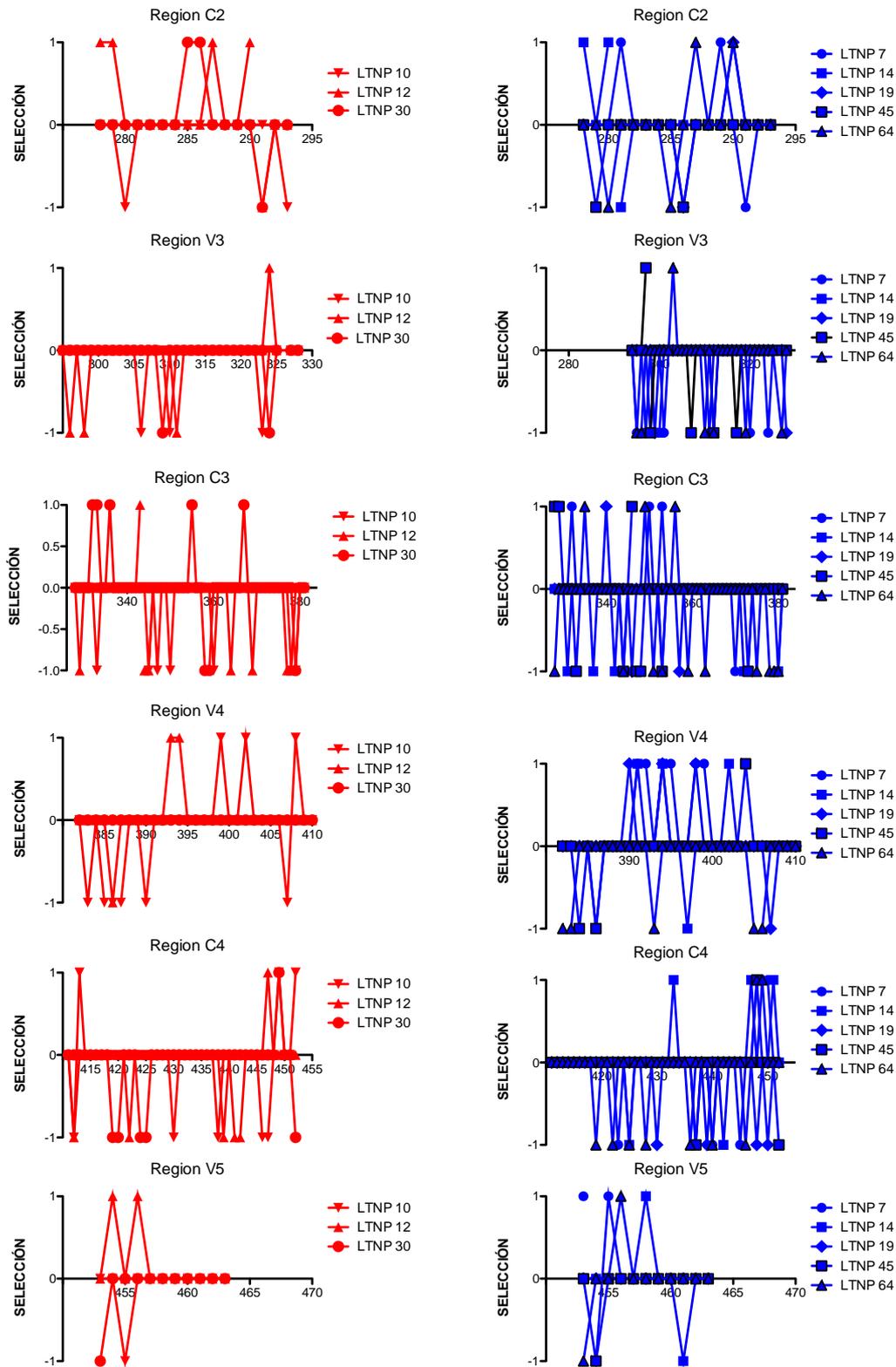


Figura 4.7. Gráfico por regiones de las posiciones encontradas bajo selección positiva o negativa. En estos gráficos se muestran los sitios bajo selección positiva encontrados en al menos dos de los análisis con un valor arbitrario de 1, los sitios que se encuentran bajo selección negativa encontrados en al menos dos de los análisis se muestran con un valor arbitrario de -1. En rojo se muestran los sitios de selección tanto positiva como negativa de los individuos LTNP Temporales y en azul los individuos LTNP Atemporales.

Si consideramos las posiciones encontradas globalmente, se observa que en ambos grupos hay una mayor acumulación de posiciones seleccionadas negativamente (mutaciones sinónimas, 39 en el grupo de los temporales y 92 en los atemporales). Teniendo en cuenta el número de individuos en cada grupo, tres en los temporales y cinco en el grupo de los atemporales, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ellos, ni en selección positiva ni en negativa (ver tabla 4.6).

A pesar de que hay una gran variabilidad en los sitios que se encuentran bajo selección positiva o negativa en cada virus, hay determinadas posiciones que aparecen seleccionadas en varios de ellos. Estas posiciones se muestran en la tabla 4.5A para las posiciones seleccionadas positivamente y en la tabla 4.5B para las seleccionadas negativamente.

Tabla 4.5A: Posiciones aminoacídicas seleccionadas positivamente en más de un virus

REGIÓN	POSICIÓN	LTNP TEMPORALES	LTNP ATEMPORALES
C2	278A	+	+
	280T		+
	290S	+	+
C3	332S	+	+
V4	391T	+	+
	394N	+	+
	398G		+
	399T	+	+
	402N	+	+
C4	447T	+	+
	448G		+
	449L		+

Aparecen sombreadas en amarillo las posiciones aminoacídicas encontradas en ambas topologías de virus.

Centrándonos en la selección positiva, observamos que hay doce posiciones que aparecen en más de un virus. De estas posiciones, cuatro son exclusivas de individuos atemporales, y el resto aparecen en ambos tipos de individuos.

Cuando observamos los sitios que aparecen sometidos a presión negativa vemos que el número de posiciones seleccionadas es bastante mayor. En este caso hay cuarenta posiciones que aparecen en más de un virus, de las cuales una es exclusiva de virus temporales (0.4%), otras diez sólo aparecen en virus atemporales (25%) y los veintinueve restantes aparecen en ambos tipos de virus (72.5%). Como era de esperar, estas posiciones son sitios muy conservados dentro de las cuasiespecies obtenidas de cada virus y en la

mayoría de los casos, el aminoácido coincide con el de la secuencia consenso del subtipo B, pudiendo estar relacionadas estas posiciones con el mantenimiento de la estructura de la glicoproteína gp120 y por tanto de la capacidad replicativa del virus.

Tabla 4.5B: Posiciones aminoacídicas seleccionadas negativamente en más de un virus

REGIÓN	POSICIÓN	LTNP TEMPORALES	LTNP ATEMPORALES
C2	280T	+	+
	286N		+
	291I	+	+
V3	295R	+	+
	297N	+	+
	298N		+
	299N		+
	309G	+	+
	311A	+	+
	312F		+
	324Q	+	+
C3	328N		+
	333K	+	+
	344K	+	+
	345L	+	
	347E	+	+
	353T		+
	359S	+	+
	373C		+
	378F	+	+
379Y	+	+	
V4	380C		+
	383T	+	+
	386F	+	+
	407I	+	+
C4	412N	+	+
	419K	+	+
	422Y	+	+
	425P	+	+
	430I	+	+
	437T	+	+
	439L	+	+
	441L	+	+
	442T	+	+
	446G	+	+
V5	452I	+	+
	453F	+	+
	454R		+
	459D	+	+
	461R		+

Aparecen sombreadas en amarillo las posiciones encontradas en ambas topologías de virus.

También se encontraron posiciones aminoacídicas en los dos tipos de virus, bajo selección positiva, que en la mayoría de los casos (9/11), se corresponden con inserciones de aminoácidos con respecto a la secuencia consenso B ubicadas en las regiones variables, por este motivo no se han podido numerar.

Tabla 4.6. Resumen del análisis de selección en los virus de los individuos LTNP Temporales y Atemporales

REGIÓN	SELECCIÓN POSITIVA		SELECCIÓN NEGATIVA	
	Individuos Temporales	Individuos Atemporales	Individuos Temporales	Individuos Atemporales
C2	6	7	4	7
V3	1	2	8	19
C3	6	9	17	26
V4	6	12	7	11
C4	2	7	14	19
V5	2	2	5	10
TOTAL	23	39	55	92
Total/nº individuos	7.6	7.8	18.3	18.4

Comparando los sitios bajo selección positiva hallados en las distintas regiones en los virus de los dos grupos de individuos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en las regiones analizadas. Si comparamos el número de posiciones globales bajo presión positiva o negativa entre los dos grupos de virus, teniendo en cuenta el número de individuos en cada uno de ellos, no se observan diferencias en función del patrón de evolución.

Si observamos en la tabla 4.6, parece que la selección negativa es la que está dirigiendo la evolución en ambos grupos de virus ya que hay más del doble de posiciones seleccionadas negativamente. A pesar de esto, las diferencias entre selección positiva y negativa no tienen apoyo estadístico.

En resumen, en las secuencias virales obtenidas de los individuos en seguimiento, hemos comprobado que existe una mayor presencia de sitios bajo selección negativa que bajo selección positiva. Esto indicaría que la evolución de esta proteína está más condicionada por el mantenimiento de su estructura que por presiones selectivas (como la presión inmune).

4.2.6 Análisis de dN y dS.

Si en lugar de analizar las posiciones sometidas a presión sitio a sitio, analizamos globalmente la acumulación de mutaciones sinónimas o no sinónimas en la cuasiespecie, mediante la diferencia entre dN-dS, encontramos que la mayoría de los individuos temporales tienen una $dN-dS > 1$ y los atemporales $dN-dS < 1$. Los resultados se muestran en la tabla 4.7 (ver apartado 3.13.5).

Tabla 4.7. Resultados del análisis dN-dS en los dos grupos de virus.

dN-dS Temporales	dN-dS Atemporales
LTNP 10 = -0.025	LTNP 7 = 0.013
LTNP 12 = 0.014	LTNP 14 = 0.024
LTNP 30 = 0.029	LTNP 19 = -0.012
	LTNP 45 = -0.018
	LTNP 64 = -0.033

Estos resultados están en concordancia con un trabajo previo realizado en el laboratorio, en el que se estudiaba la evolución viral en cuatro individuos (dos LTNP y dos PC) [208]. Como se puede observar en la tabla 4.7, la evolución de los virus con estructura “temporal”, en los que el tiempo de estudio fue mayor (LTNP 12 y 30), está asociada con selección positiva. Sin embargo, la estructura “atemporal” está asociada en mayor medida con la selección negativa. Las discrepancias en estos grupos aparecen en los individuos con un tiempo de estudio menor, mientras que los individuos en los que se estudió su evolución a largo plazo concuerdan con lo observado previamente en el laboratorio [208]. Estas diferencias podrían deberse a una distinta presión selectiva por parte del sistema inmune del huésped.

4.3.1 Análisis de las características clínicas de los individuos LTNP “modernos”: carga viral, número de células $T CD4^+$ y $T CD8^+$.

La carga viral plasmática, así como el número de linfocitos $T CD4^+$ y $T CD8^+$ se analizaron a lo largo de todo el seguimiento de los individuos “modernos” (ver tabla 4.8 y figura 4.10).

Este grupo de individuos es muy heterogéneo en cuanto a la carga viral se refiere. Hay individuos como el LTNP 45 o el LTNP 7 con CV por debajo de las 2.000 copias/ml, otros como el LTNP 10 o el LTNP 12 mantienen la carga por debajo de las 8.000

copias/ml. El resto de los individuos tienen una CV comprendida entre 14.000 – 85.000 copias/ml.

No pudimos encontrar diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados entre los dos grupos de individuos (ver figura 4.9).

Tabla 4.8. Características clínicas de los individuos LTNP “modernos”.

Paciente	Carga Viral ^a	LT CD4 ^{+b}	LT CD8 ^{+c}	CD4 ⁺ /CD8 ^{+d}	% LT CD4 ^{+e}	% LT CD8 ^{+f}
LTNP 10	5.181	572	1.347	0,45	24,65	58,00
LTNP 12	2.463	501	991	0,53	24,85	47,92
LTNP 30	14.875	790	1.021	0,77	33,68	42,11
Media	7.506	621	1.119	0,58	27,72	49,34
LTNP 7	727	700	2.563	0,30	18,06	64,86
LTNP 14	19.102	584	740	0,81	33,11	42,00
LTNP 19	8.640	547	1.640	0,30	16,25	48,75
LTNP 45	616	920	995	0,94	37,74	40,13
LTNP 64	24.558	557	2.387	0,26	17,25	69,88
Media	10.728	661	1.665	0,52	24,48	53,12

Se presentan los valores medios de los individuos a lo largo del seguimiento. a) Carga viral plasmática (n° de copias ARN/ml), b) número de linfocitos CD4⁺(células/μl), c) número de linfocitos CD8⁺(células/μl), d) cociente CD4⁺/CD8⁺, e) porcentaje de células CD4⁺, f) porcentaje de células CD8⁺.

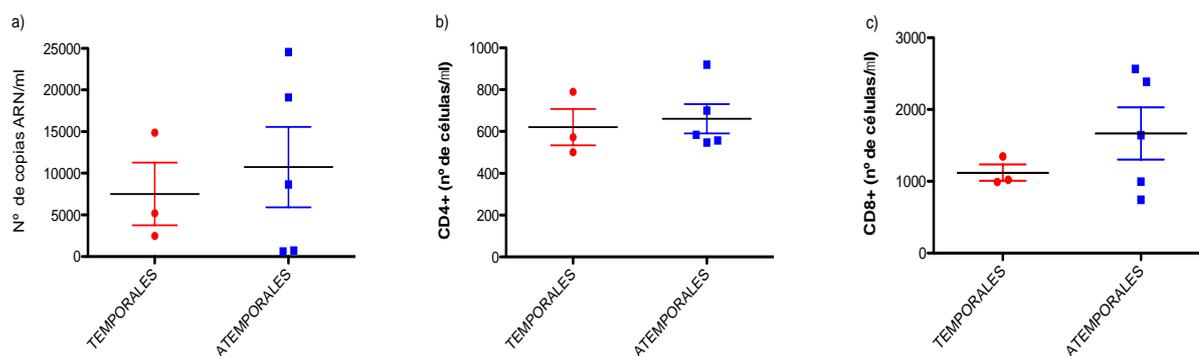
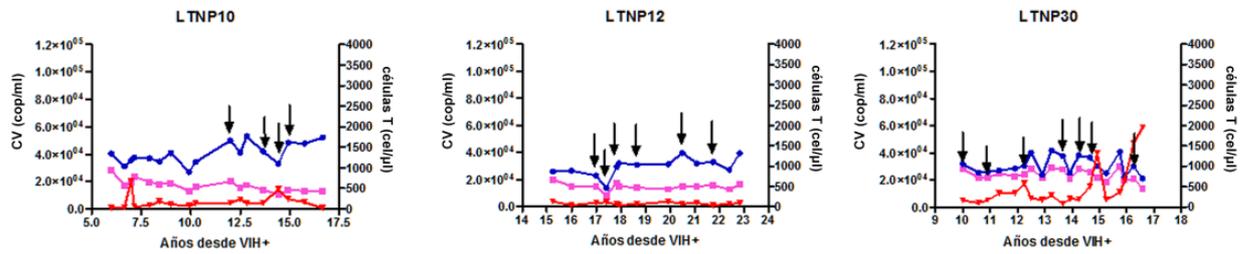


Figura 4.9. Características clínicas de los individuos LTNP “modernos”. Se presentan los valores medios de los individuos a lo largo del seguimiento. a) Carga viral plasmática (n° de copias ARN/ml), b) número de células T CD4⁺(células/μl), c) número de células T CD8⁺ (células/ μl).

TEMPORALES



ATEMPORALES

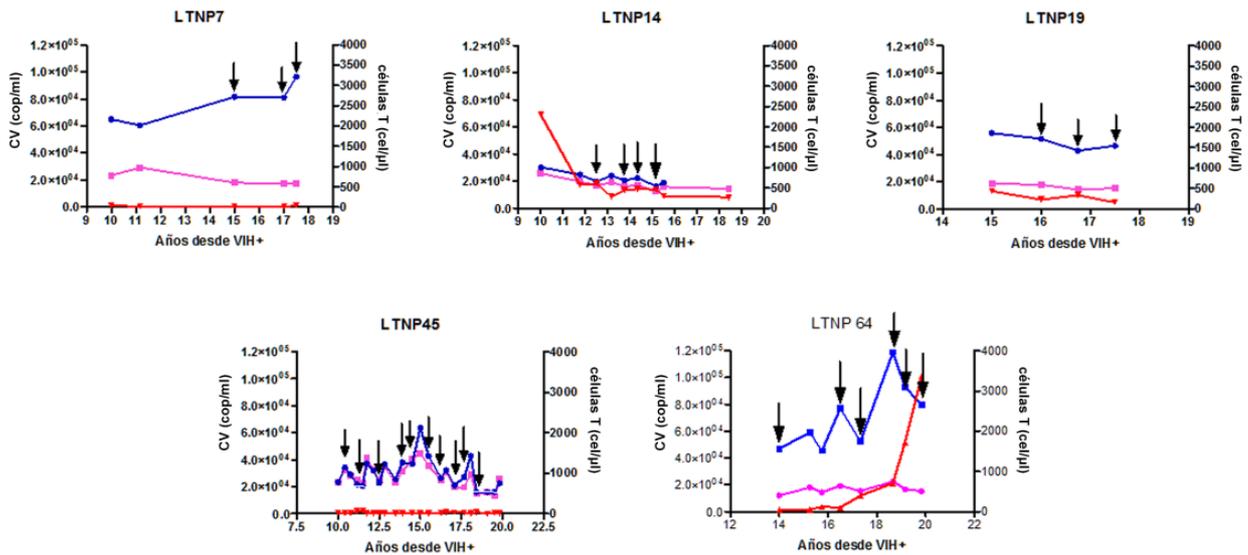


Figura 4.10: Carga viral y número de células T CD4⁺ y T CD8⁺ en individuos LTNP “modernos”. La carga viral plasmática (copias ARN/ml) se representa en el eje izquierdo, y el número de células T CD4⁺ y T CD8⁺ (células/μl) en el eje derecho de cada gráfico. Las representaciones se refieren al tiempo en años desde diagnóstico representado en el eje de abscisas. Las flechas representan las muestras que han sido utilizadas para el análisis de la evolución viral en cada paciente. Los números de identificación de cada paciente se sitúan en la parte superior de cada gráfico.

La dinámica de células T CD4⁺ y T CD8⁺ de los individuos se analizó mediante un análisis de regresión lineal del porcentaje de células T para determinar si había un aumento o disminución significativa en el número de células a lo largo del seguimiento.

Los resultados se muestran en las figuras 4.10, 4.11 y 4.12 así como en la tabla 4.9. El análisis determinó que había un descenso estadísticamente significativo en el número de células T CD4⁺ a lo largo del seguimiento en todos los individuos excepto en el paciente LTNP 19. El porcentaje de caída oscila entre el 1.4% en el paciente LTNP 7 y el 0.6% en el paciente LTNP 45.

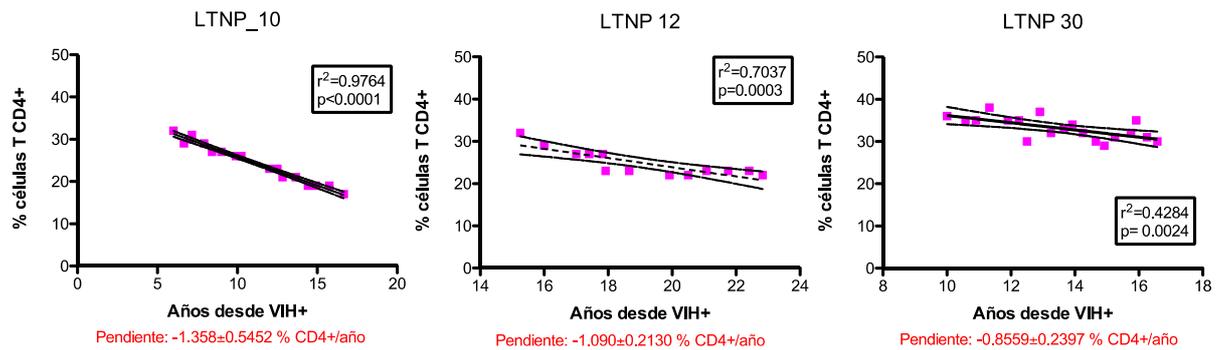
De tal manera, el análisis por regresión lineal del porcentaje de células T CD8⁺, mostró un aumento estadísticamente significativo en el número de células en los individuos LTNP 7, LTNP 12, LTNP 10, LTNP 64 (ver tabla 4.9). En el resto de individuos no se detectó un aumento o disminución estadísticamente significativo de este tipo celular a lo largo del seguimiento. Estos resultados sugieren que los LTNP “modernos” no son un grupo homogéneo, ni siquiera dentro del subgrupo “temporal” o “atemporal”, y que mientras un grupo de individuos siguen la dinámica de los individuos con PC (LTNP 7, LTNP 12, LTNP 10 y LTNP 64) otro grupo (LTNP 14, LTNP 30 y LTNP45) pierde células T CD4⁺ pero mantiene el número de células T CD8⁺ y el paciente LTNP 19 mantiene un equilibrio entre ganancia y pérdida de células T con una dinámica similar a la que tienen los individuos LTNP “ancestrales”.

Tabla 4.9: Dinámica de las poblaciones de las células T CD4⁺ y T CD8⁺

Paciente	% CD4 ⁺	P Valor	% CD8 ⁺	P Valor
LTNP 10	-1,358%	<0,0001	1,813%	<0,0001
LTNP 12	-1,090%	0,0003	1,322%	0,0058
LTNP 30	-0,8559%	0,0024	0,1050%	0,6769
Media (1)	-1,101%		1,567%	
LTNP 7	-1,416%	0,0450	2,294%	0,0182
LTNP 14	-0,8284%	0,0038	-0,5492%	0,0716
LTNP 19	-0,3105%	0,6536	-0,0411%	0,7625
LTNP 45	-0,6764%	0,0094	-0,00579%	0,7158
LTNP 64	-1,092%	0,0132	2,114%	0,0173
Media (1)	-1.00%		2,204%	

En rojo se muestran los valores que tienen un apoyo estadístico significativo.

TEMPORALES



ATEMPORALES

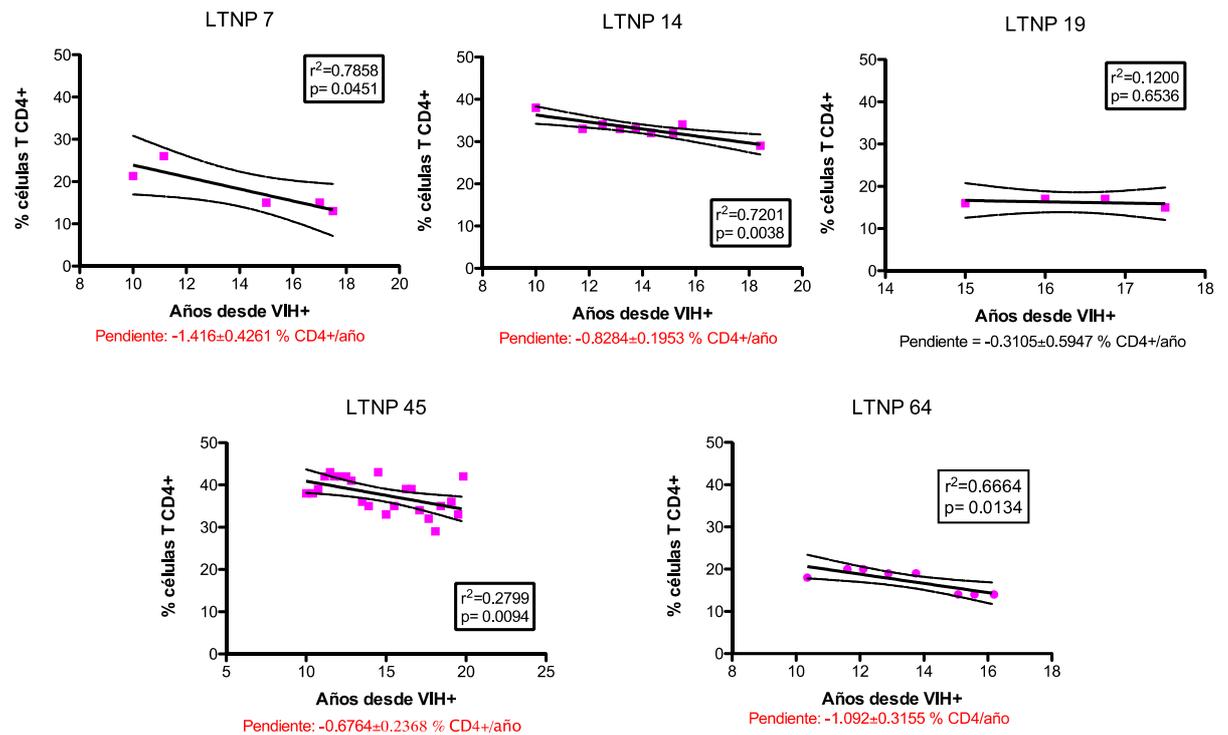
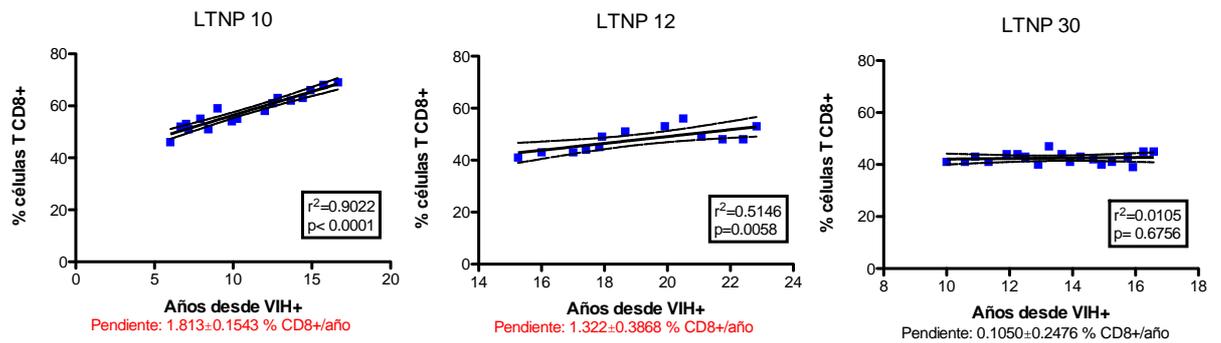


Figura 4.11: Análisis por regresión lineal del porcentaje de células T CD4+ en individuos LTNP “modernos” a lo largo del seguimiento. En el eje de ordenadas de cada gráfico se representa el % de células T CD4+. El número de identificación de los individuos se encuentra en la parte superior de cada gráfico. En rojo se muestra el valor de la pendiente en los individuos donde es estadísticamente significativa.

TEMPORALES



ATEMPORALES

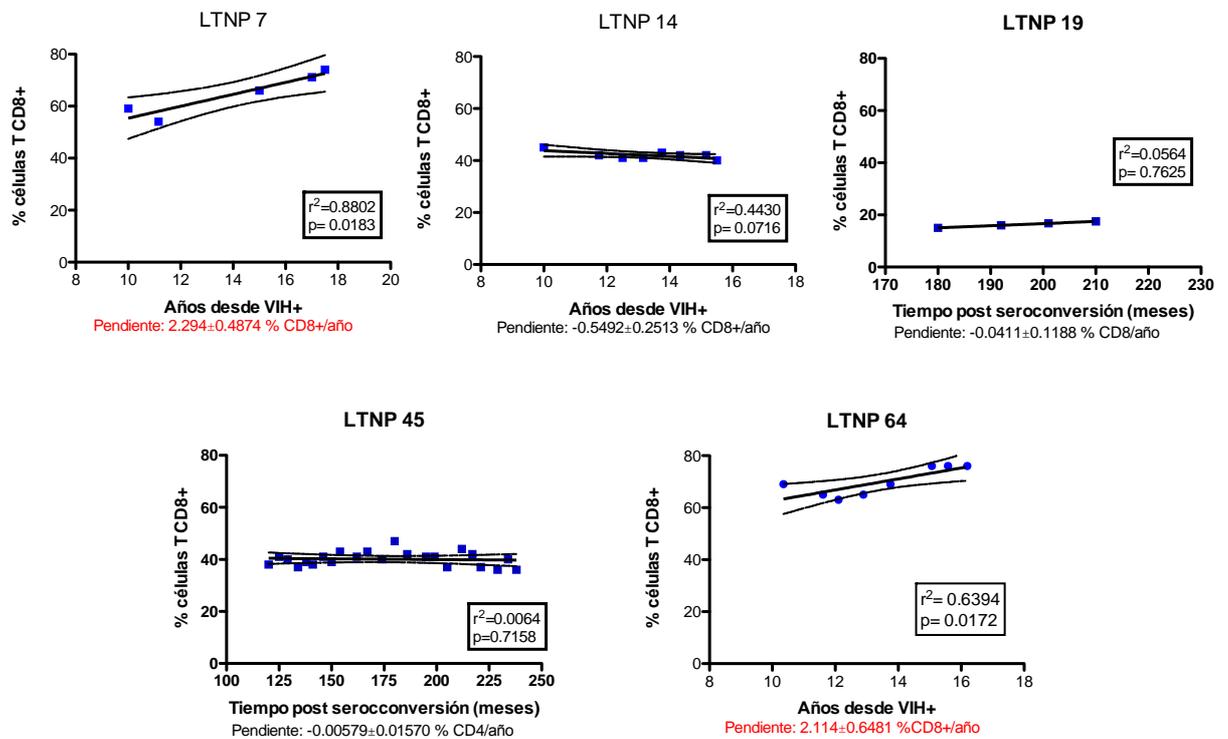


Figura 4.12: Análisis por regresión lineal del porcentaje de células T CD8⁺ en individuos LTNP “modernos” a lo largo del seguimiento. En el eje de ordenadas de cada gráfico se representa el % de células T CD8⁺. El número de identificación de los individuos se encuentra en parte superior de cada gráfico. En rojo, se muestra el valor de la pendiente en los individuos donde es estadísticamente significativa.

4.4 Estudio Viroológico de los individuos LTNP “modernos”

4.4.1 Co-cultivo de los virus de los individuos LTNP “modernos”.

Para complementar el estudio filogenético de los virus de los individuos LTNP “modernos” nos propusimos aislar los virus de estos individuos para poder hacer una caracterización virológica de los mismos y tratar de medir la capacidad replicativa (eficacia biológica) de estos virus, pudiendo así determinar en qué medida está afectando el virus a la progresión de la enfermedad.

Los co-cultivos de los virus se hicieron según se explica en los apartados 3.3.6 al 3.3.8. Los virus obtenidos fueron los siguientes:

VIRUS PACIENTE	MUESTRA
LTNP 7	3 (2005)
LTNP 10	3 (2003) 4 (2004)
LTNP 12	5 (2005)
LTNP 19	3 (2005)
LTNP 64	6 (2004) 7 (2004) 8 (2005)

Los co-cultivos de los individuos LTNP 14 y LTNP 45 fueron negativos tras un mes en cultivo. El co-cultivo del LTNP 30 dio un valor de p24 muy bajo no pudiendo obtenerse semilla de este virus.

4.4.2 Cinética de replicación de los virus de los individuos LTNP “modernos”.

Para medir la eficacia biológica de los aislados primarios de los individuos LTNP “modernos” se llevó a cabo un ensayo por triplicado de cinética de replicación, utilizando como grupo control tres aislados primarios de individuos PC tal y como se explica en el apartado 3.5 de materiales y métodos. Los resultados se muestran en la figura 4.13.

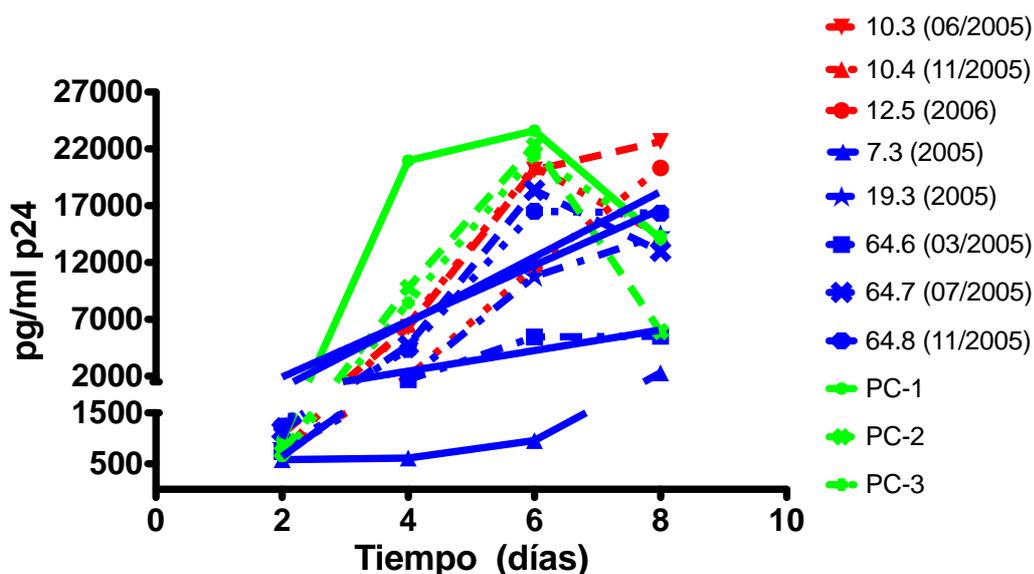


Figura 4.13. Cinética de replicación de los aislados primarios LTNP “modernos”. En esta gráfica se muestran los resultados del ensayo de cinética de replicación de los aislados primarios de LTNP “modernos” en comparación con aislados primarios de PC. En rojo se muestran los virus con patrón de evolución “temporal” y en azul los virus con patrón de evolución “atemporal”. Se recogió una alícuota de sobrenadante cada dos días para cuantificar la concentración de p24 durante los ocho días que dura el ensayo.

Como se puede observar en la figura 4.13, la capacidad replicativa de los aislados primarios de los LTNP “modernos” es ligeramente inferior a la de los PC. Los LTNP replican de forma más lenta durante los cuatro primeros días, igualando el nivel de replicación de los PC al final del ensayo. Es probable que la caída en replicación de los PC a partir del día seis se deba a una saturación del sistema, ya que no se añaden CMSP nuevas durante el ensayo. En el caso del aislado obtenido del paciente LTNP 7 (patrón de evolución “atemporal”), se observa un nivel de replicación claramente inferior al del resto de los LTNP y de los PC. El aislado del paciente LTNP 10.3 (patrón de evolución “temporal”), parece ser el que mejor replica igualando los niveles de los aislados de PC, no encontrando diferencias entre los dos aislados obtenidos (10.3 y 10.4) que se solapan en la gráfica.

Si nos fijamos en el virus del paciente LTNP 64 (patrón de evolución “atemporal”), encontramos diferencias en la capacidad replicativa entre el virus de la muestra 64.6 y la 7-8. Para ver mejor estas diferencias, realizamos un análisis de regresión lineal. Como se puede observar en la figura 4.14, hay una tendencia clara a una mejora en la eficacia replicativa de los virus 64.7 y 64.8 con respecto al virus 64.6, aunque las pendientes no son estadísticamente significativas. En base a estos resultados, podríamos decir que el virus de este paciente está mejorando su eficacia con el tiempo.

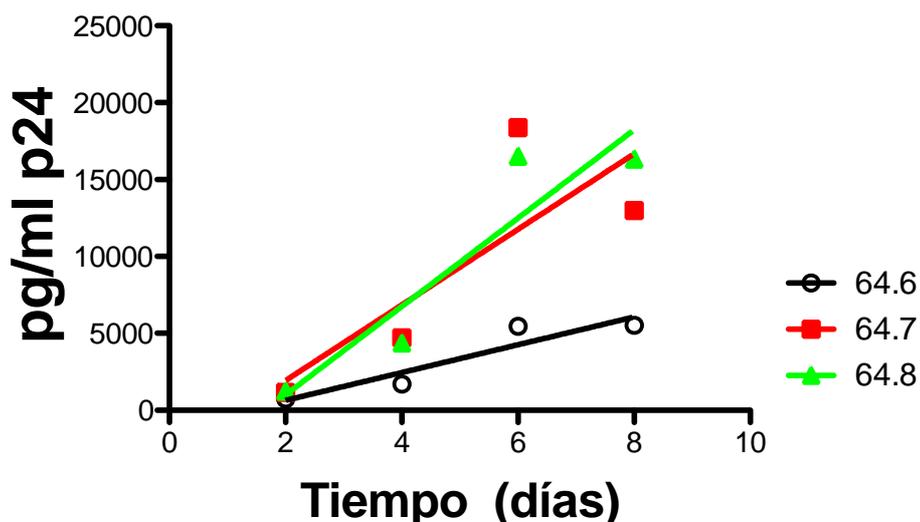


Figura 4.14. Análisis por regresión lineal de los distintos aislados del paciente LTNP 64.

A excepción del paciente LTNP 7, cuyo aislado replica peor que los demás virus, no se observan diferencias significativas entre los virus aislados de LTNP y los de PC (t-test $p > 0.100$). En base a este ensayo, no podemos decir que la diferencia en la progresión de la enfermedad entre los individuos LTNP “modernos” y los PC se deba a que presentan un virus con una capacidad replicativa reducida.

4.5 Estudio inmunológico de los individuos LTNP “modernos”.

4.5.1 Estudio de neutralización en los individuos LTNP “modernos”.

Después de aislar los virus de los individuos y analizar su capacidad replicativa nos propusimos realizar un ensayo de neutralización autóloga con los virus obtenidos de los individuos LTNP “modernos”. Se estudió la capacidad de neutralización del plasma contemporáneo al virus y un plasma moderno, posterior a la muestra de la que se aisló el virus. También se realizó un ensayo de neutralización heteróloga utilizando un pool de sueros positivos. El ensayo se llevó a cabo tal y como se explica en el apartado 3.4 de materiales y métodos.

El porcentaje de neutralización que se obtuvo en los ensayos con plasma autólogo contemporáneo fue muy bajo o nulo, excepto en el caso del virus del paciente LTNP 64

(ver tabla 4.10). Cuando utilizamos un plasma autólogo moderno, los porcentajes de neutralización aumentan. No se pudo realizar este último ensayo en el caso de los individuos LTNP 7 y LTNP 19, dado que no había muestras posteriores a la de obtención del virus. En el caso de la neutralización heteróloga, los porcentajes de neutralización obtenidos fueron superiores al 50% en todos los casos. Los porcentajes de neutralización obtenidos se muestran en la tabla 4.10.

Para obtener los títulos de anticuerpos neutralizantes se calculó la IC_{50} (el inverso de la dilución de suero necesaria para reducir las URL al 50%). En la neutralización autóloga contemporánea solo se pudo obtener la IC_{50} en los individuos LTNP 10 y LTNP 64. En los individuos LTNP 7, LTNP 12 y LTNP 19 no se detectó neutralización usando un plasma contemporáneo. Cuando usamos un plasma moderno, sólo obtuvimos la IC_{50} en los virus del LTNP 10 y LTNP 64. En los casos del LTNP 7 y LTNP 19 no pudo ser determinada por no haber muestras posteriores a la fecha de obtención del virus. En el caso de la neutralización heteróloga se pudo determinar la IC_{50} en todos los casos. Los resultados se muestran en la tabla 4.11.

Tabla 4.10. Análisis de neutralización de los virus asilados de individuos LTNP “modernos”.

Virus del paciente	Plasma Contemporáneo	Plasma Moderno	Heteróloga
LTNP 12.5	1,3%	6%	63%
LTNP 10.4	3%	39,4%	57,5%
LTNP 7.3	0%	NA*	61,5%
LTNP 19.3	9,8%	NA*	65%
LTNP 64.8	36,5%	42,4%	70%

. * NA no analizado.

Tabla 4.11. Título de Ac neutralizantes IC_{50} en individuos LTNP “modernos”

Virus del paciente	IC_{50} Plasma Contemporáneo	IC_{50} Plasma Moderno	IC_{50} Heteróloga
LTNP 12.5	ND*	ND*	568
LTNP 10.4	ND*	57,09	500,1
LTNP 7.3	ND*	NA*	404,2
LTNP 19.3	ND*	NA*	799,1
LTNP 64.8	2.281	419,4	2.434

* ND no detectable. *NA no analizado.

4.5.2 Factores genéticos asociados al huésped.

Para completar el análisis de los factores implicados en el control de la infección, analizamos los factores genéticos de los individuos que pudieran estar afectando al curso de la enfermedad. La caracterización genética del huésped fue llevada a cabo por el laboratorio del Dr. Amalio Telenti en el centro de investigación Institute of Microbiology, University Hospital Center, University of Lausanne, Lausanne, Suiza (ver apartado 3.15 y tabla 4.12).

Se analizaron distintos marcadores genéticos del huésped que se han asociado con una progresión más lenta, como el haplotipo del CCR5, CCR5 del32, CCR2 V64I, variación en el número de copias de CCL3L1, alelos protectores del HLA-B (B*2705, *5701, *5101, *1302), el serogrupo A10 (A*2501, A*2601) y el A*3201. Los alelos HLA de riesgo que se incluyeron en el análisis fueron B35Px (B*3503), el serogrupo B22 (B*55, B*56), B*1801, A*2402 y A*2301[204]. Los resultados se muestran en la tabla 4.12. El paciente LTNP 19 no pudo ser analizado por falta de material.

Tabla 4.12. Análisis de los marcadores genéticos del huésped.

	Paciente	CCR5 del32 rs333	CCR2 V64I rs1799864	CCR5 haplotype		CCL3L1 (n)	HCP5 73T>G rs2395029	HLA-C rs9264942	ZNRD1 rs3869068	HLA-A1	HLA-A2	HLA-B	HLA-B	Score
	LTNP 10	11	11	HHC	HHC	3	11	22	11	0201	0201	2705	3801	3
	LTNP 12	12	11	HHC	HHG*2	2	11	12	11	0101	2902	1402	4403	2
	LTNP 30	11	11	HHE	HHE	2	11	11	12	1101	2601	1501	3501	-2
Atemporales	LTNP 7	12	11	HHC	HHG*2	2	11	11	12	2601	2902	4403	4901	1
	LTNP 14	12	12	HHG*2	HHF*2	1	11	11	12	0201	2601	4403	5101	3
	LTNP 45	11	11	HHC	HHC	2	11	12	11	0101	1101	0801	2705	2
	LTNP 64	12	12	HHG*2	HHF*2	3	11	12	11	0201	2301	4402	4901	3

Los factores protectores se muestran en verde y los factores de riesgo se muestran en rojo. La puntuación se usó para reunir la información genética y se obtuvo de la siguiente forma: en este modelo el impacto de cada alelo se asume que es el mismo excepto por el signo (alelos con un efecto protector se suman, los alelos de riesgo se restan). Aunque en la tabla se indican todos los factores analizados, para la puntuación solo se tuvieron en cuenta los siguientes: CCR5 Δ 32 (0,1), CCR2V64I (0,1,2), CCR5 P1 homocigoto (0,-2), HLA-B protectores (0,1,2) y de riesgo (0,-1, -2). [204].

Si miramos la puntuación global del grupo de individuos LTNP “temporales” (10, 12 y 30) es menor (3) que la del grupo de individuos LTNP “atemporales” (9), lo que implica una mayor acumulación de factores protectores en este último grupo de individuos. Esta diferencia se mantiene si dividimos la puntuación obtenida de cada grupo entre el número de individuos que hay en cada uno (1 frente a 2,25). La diferencia en la puntuación entre los individuos de ambos grupos no es estadísticamente significativa. Esto es debido al

amplio rango de valores observados en los individuos temporales (desde -2 a+3), mientras que en los individuos atemporales el rango es menor (entre 1 y 3).

En base a estos resultados, no podemos afirmar que las diferencias encontradas a nivel filogenético se deban a diferencias en el huésped, aunque los datos apuntan a que los individuos LTNP atemporales parecen tener una mayor acumulación de factores protectores.

4.5.3 Análisis de la concentración de $\beta 2$ microglobulina y título de anticuerpos específicos frente a la gp160 del HIV-1 en plasma.

En un intento de estimar el grado de activación inmune en ambos grupos de LTNP “modernos”, realizamos un análisis comparativo de la concentración de $\beta 2$ microglobulina, mientras que para evaluar la respuesta inmune humoral realizamos un ensayo para medir el título de Ac específicos frente a la gp160/p25 del VIH-1. Con estos ensayos intentamos encontrar diferencias entre los dos grupos de individuos LTNP “modernos”. Los ensayos se realizaron tal y como se explica en los apartados 3.6 y 3.7 de Materiales y Métodos.

Cuando analizamos la $\beta 2$ microglobulina, encontramos que el grupo de individuos LTNP “modernos atemporales” tenían una concentración en plasma mayor que la de los “temporales”, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Los valores de $\beta 2$ microglobulina se muestran en la tabla 4.13.

Los títulos de anticuerpos frente a gp160/p25 obtenidos son similares en ambos grupos de individuos. Los valores de Ac gp160/p25 se muestran también en la tabla 4.13.

Tabla 4.13. Medida de la concentración de $\beta 2$ microglobulina y del título de Ac gp160/p25 en individuos LTNP “modernos”.

Paciente	$\beta 2$ microglobulina $\mu\text{g/ml}$	Ac gp160/p25
LTNP 10	2.20	1.2×10^5
LTNP 12	2.75	5.1×10^5
LTNP 30	3.80	1.2×10^6
Media	2.92	6.1×10^5
LTNP 7	2.91	6.9×10^5
LTNP 14	2.22	6.4×10^5
LTNP 19	4.91	2.4×10^6
LTNP 45	4.02	8.2×10^5
LTNP 64.8	4.17	9.8×10^5
Media	3.65	1.1×10^6

4.6 Análisis de la pérdida de control en dos individuos LTNP.

Durante el seguimiento de los individuos LTNP 12 y LTNP 64, observamos una pérdida del control de la enfermedad tras casi 27 y 17 años de infección, respectivamente (ver apartado 4.2.1), por lo que decidimos analizarlos en profundidad. Estos individuos constituyen un modelo ideal para analizar en qué medida los factores virológicos contribuyen a la progresión de la infección en ausencia de terapia antirretroviral, y en el caso del LTNP 12, que es un paciente doblemente infectado como ya se ha comentado anteriormente, la evolución de ambos virus, antes y después de la pérdida de control. Los datos clínicos de ambos individuos a lo largo del seguimiento (ver figura 4.15), se encuentran en el material suplementario.

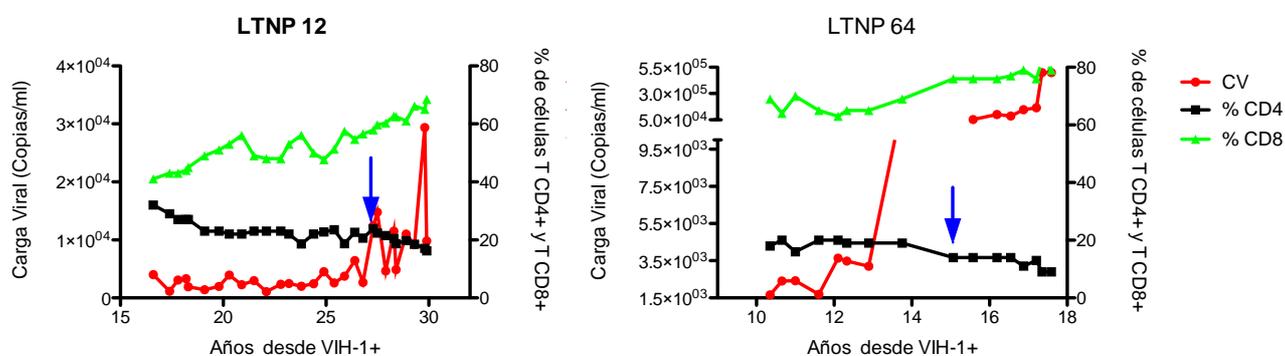


Figura 4.15: Niveles de la carga viral y porcentaje de células T CD4⁺ y T CD8⁺ a lo largo del seguimiento del paciente LTNP 12 y LTNP 64. La carga viral plasmática (copias ARN/ml) se representa en el eje izquierdo, y el porcentaje de células T CD4⁺ y T CD8⁺ (células/ μ l) en el eje derecho del gráfico. En el eje de abscisas se muestra el tiempo de infección desde el diagnóstico en años. Las flechas indican el momento de la pérdida de control.

Realizamos una regresión lineal con los datos de carga viral, %CD4⁺ y %CD8⁺ antes y después de la pérdida de control observando que a partir de que el individuo perdía el control de la enfermedad, se produce un descenso acelerado en el número de células T CD4⁺, que va acompañado de un incremento también acelerado de células T CD8⁺ en el LTNP 12. En el caso del LTNP 64 el descenso en el número de células T CD4⁺ no se ve acompañado con un aumento significativo del número de células T CD8⁺. Con respecto a la carga viral, en el paciente LTNP 12 no se observa un aumento significativo mientras que en el caso del LTNP 64 sí aumenta de forma significativa (ver tabla 4.14).

Tabla 4.14. Regresión lineal de los datos clínicos de los individuos LTNP 12 y LTNP 64.

	LTNP 12			LTNP 64		
	CV	%CD4	%CD8	CV	%CD4	%CD8
Pendiente	124.5±86.75	-0.7827±0.1495	1.1454±0.2355	3812±774.4	-0.5958±0.4568	1.399±0.8617
r ²	0.1027	0.6037	0.5692	0.7759	0.1955	0.2737
pValor	0.1683	<0.0001	0.0001	0.0017	0.2334	0.2737
Antes	No significativo	Significativo	Significativo	Significativo	No significativo	No significativo
Pendiente	4345±3212	-2.497±0.2951	3.26±0.6002	218278±73893	-2.604±0.8758	2.031±1.105
r ²	0.2337	0.9219	0.7872	0.6357	0.6387	0.4031
pValor	0.2249	0.0002	0.0033	0.0317	0.0311	0.1255
Después	No significativo	Significativo	Significativo	Significativo	Significativo	No significativo

Empezamos el análisis ampliando los árboles filogenéticos mostrados en las figuras 4.2B (LTNP 12) y 4.2H (LTNP 64) con las secuencias obtenidas con posterioridad a la muestra 12.8 (20.9 años desde el diagnóstico) y la 64.8 (16.2 años desde el diagnóstico), incluyendo las muestras correspondientes a la pérdida de control. En estos árboles se incluyeron también, secuencias obtenidas a partir de ARN plasmático y de ADN de los cultivos realizados.

Hay que remarcar que el paciente LTNP 12 estaba doblemente infectado (virus A y virus B) (ver figura 4.16). Como se puede observar en la figura 4.16, el virus “B” tiene dos subpoblaciones bien diferenciadas en función de su grado de evolución y denominadas “B1” y “B2”. También se puede observar que tanto el virus “A” como la subpoblación “b1” no han evolucionado desde la primera muestra.

En el caso del paciente LTNP 64 (ver figura 4.17), aunque no estaba doblemente infectado, si encontramos distintas poblaciones (A y B), claramente diferenciadas por su grado de evolución, siendo la “A” la población más ancestral. Dentro de la población “B”, encontramos dos subpoblaciones bien diferenciadas denominadas “B1” y “B2”.

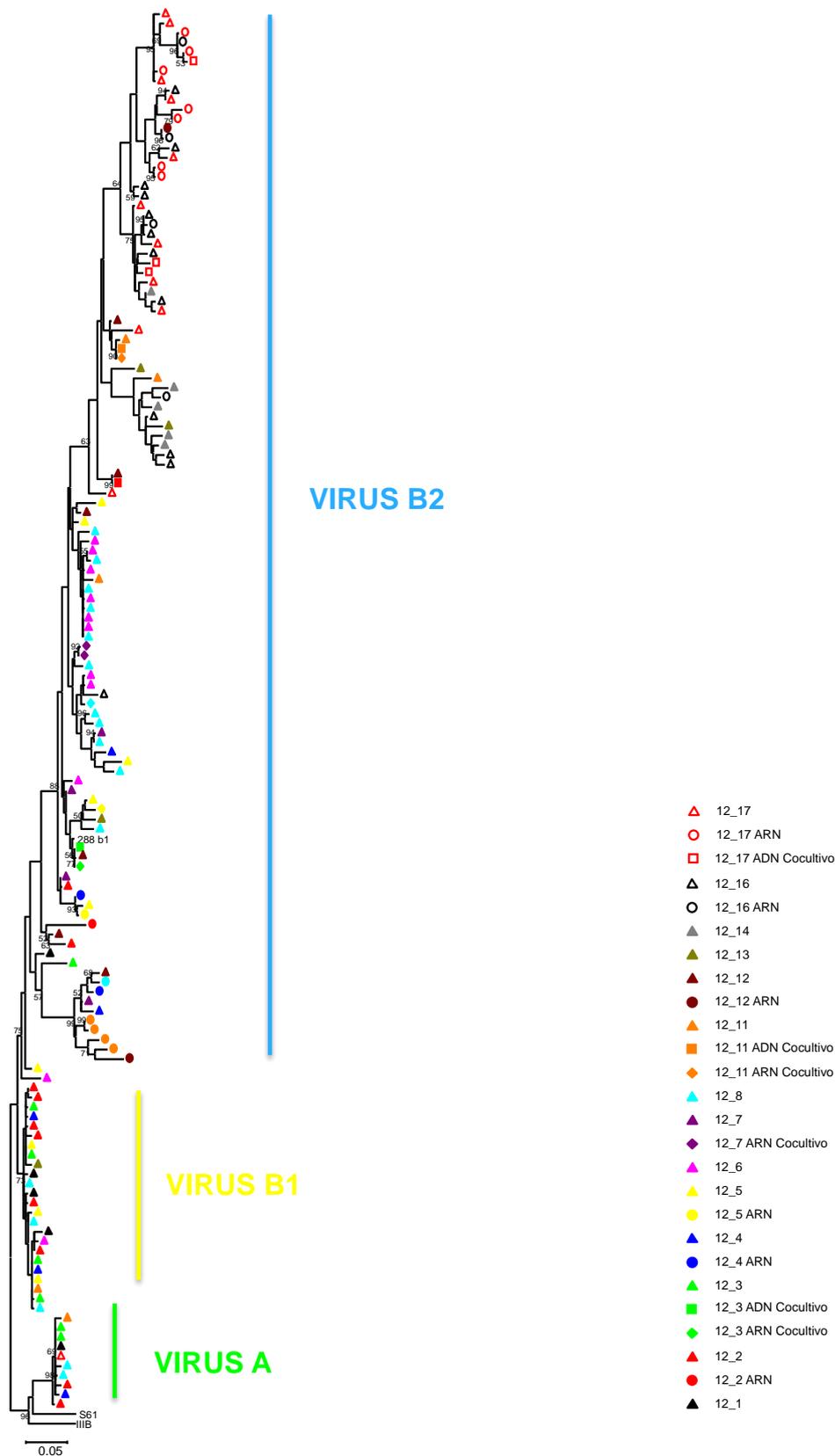


Figura 4.16: Evolución viral del LTNP 12 durante el seguimiento. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en el apartado 3.13.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP, así como de ARN plasmático y ADN de cocultivo. Se incluyen las cepas de referencia S61 y IIIB del subtipo B. Los números de nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de “bootstrap” con 1000 réplicas y solo se representan valores mayores del 50%. El color de cada secuencia hace referencia al número de la muestra.

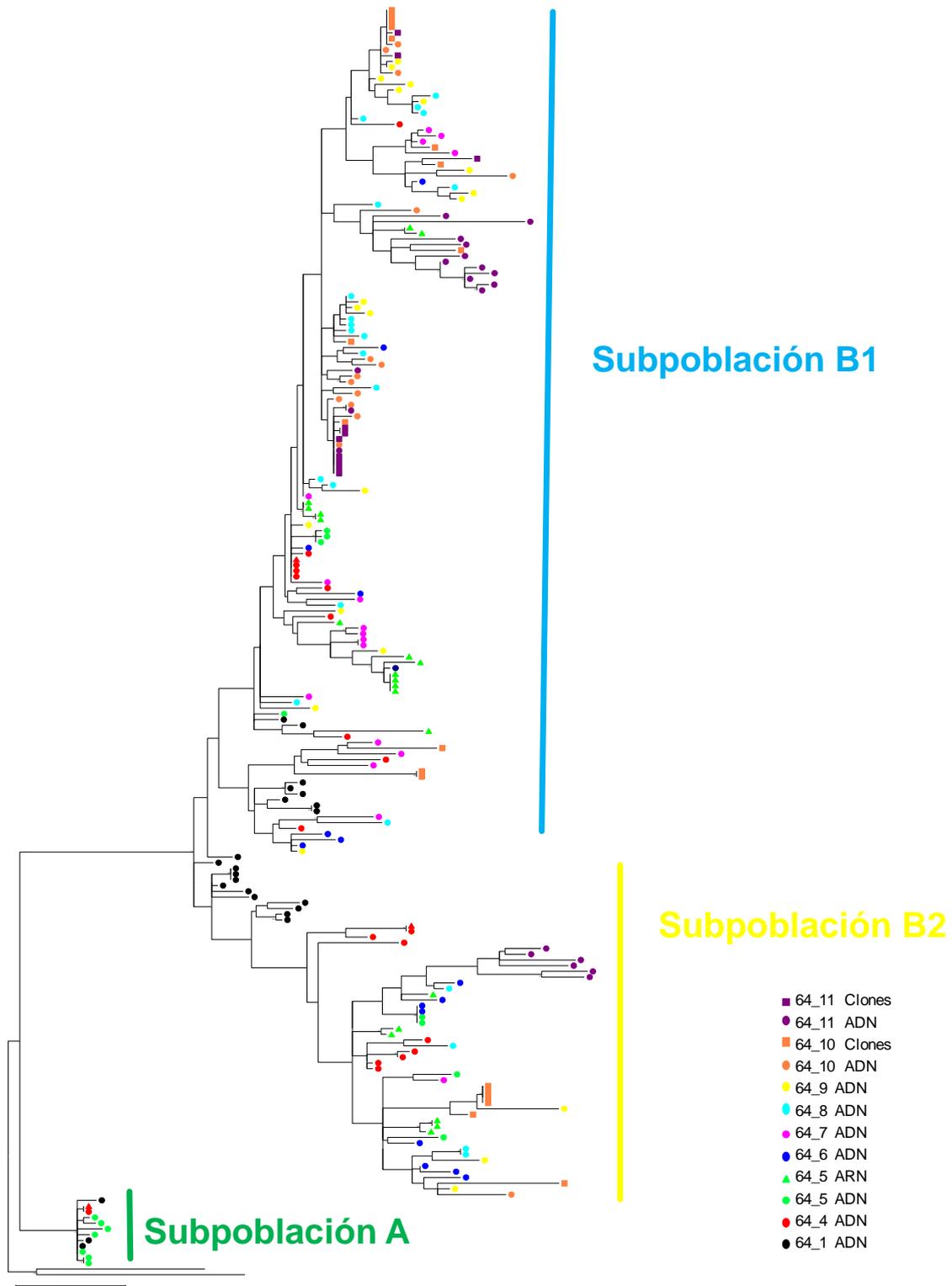


Figura 4.17: Evolución viral del LTNP 64 durante el seguimiento. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en el apartado 3.13.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP, así como de ARN plasmático y ADN de cocultivo. Se incluyen las cepas de referencia S61 y IIIB del subtipo B. Los números de nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de “bootstrap” con 1000 réplicas y solo se representan valores mayores del 50%. El color de cada secuencia hace referencia número de la muestra.

Con objeto de estudiar cómo fluctuaban las poblaciones virales en ambos individuos, calculamos los porcentajes que representaban cada una de ellas durante el seguimiento de los individuos. Como se puede observar en la figura 4.18 A, al analizar las muestras de ADN proviral del paciente LTNP 12, vemos que la población “B2” se impone con respecto a la otra población (“B1”) y al otro virus (“A”). A medida que avanza el tiempo de infección, la subpoblación “B2” llegó a representar el 100% en las muestras 12.14 y 12.16. Sin embargo, en la última muestra (12.17) vuelve a aparecer la población del virus “A”, quizás debido a una expansión clonal. Si nos fijamos en la figura 4.18 B, observamos que la población “A” del paciente LTNP 64 desaparece a partir de la muestra 64.6, y que a partir de la pérdida de control (15.58 años) se impone la población B1.

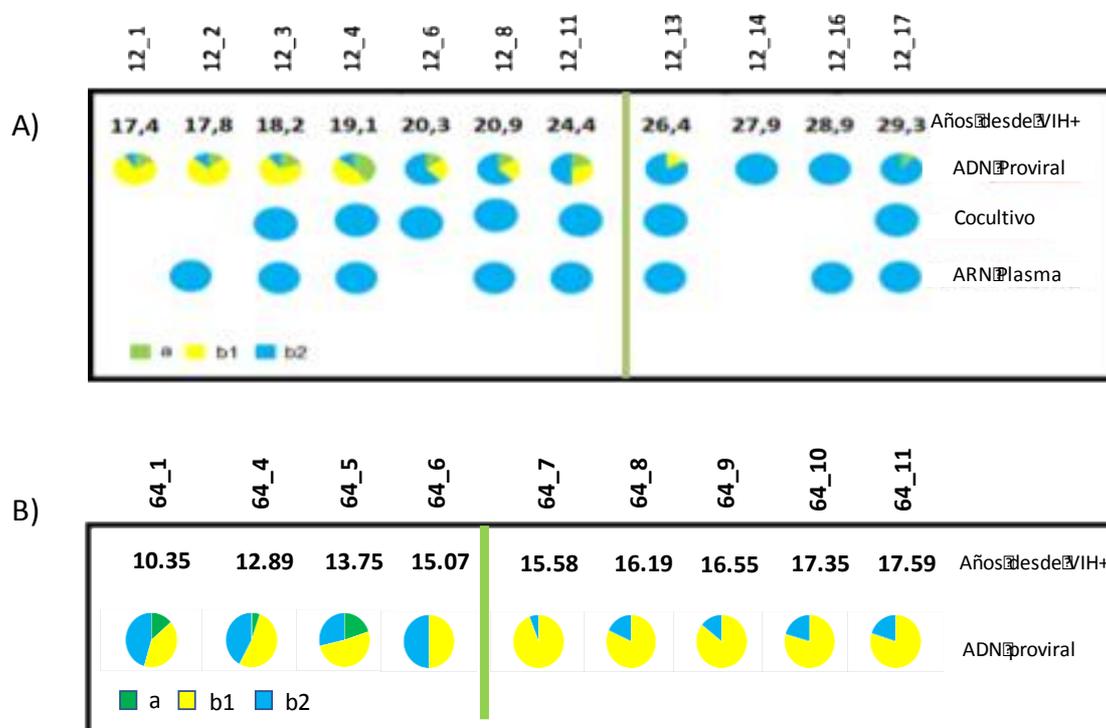


Figura 4.18 Fluctuación de las poblaciones virales del paciente LTNP 12 (A) y LTNP 64 (B) a lo largo del seguimiento. En negrita se indica el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de VIH (años) y la muestra a la que corresponde. La línea verde marca el antes y el después de la pérdida de control.

También analizamos el grado de evolución de las distintas poblaciones virales en ambos individuos (ver figura 4.19). Si nos fijamos en el paciente LTNP 12, se puede observar que el grado de evolución de las distintas poblaciones es diferente. Mientras que la subpoblación “B2” ha ido evolucionando con el tiempo, el virus “A” y la subpoblación “B1” no han evolucionado desde la primera muestra. En el caso del paciente LTNP 64,

también encontramos diferencias en la velocidad de evolución de las distintas subpoblaciones.

La subpoblación “A” no mostró evolución durante el seguimiento, apareciendo por última vez en la muestra 64_5 (14 años después del diagnóstico). Dentro del grupo “B”, observamos una distinta evolución entre sus subpoblaciones siendo la “B2” la que presentó una mayor tasa evolutiva.

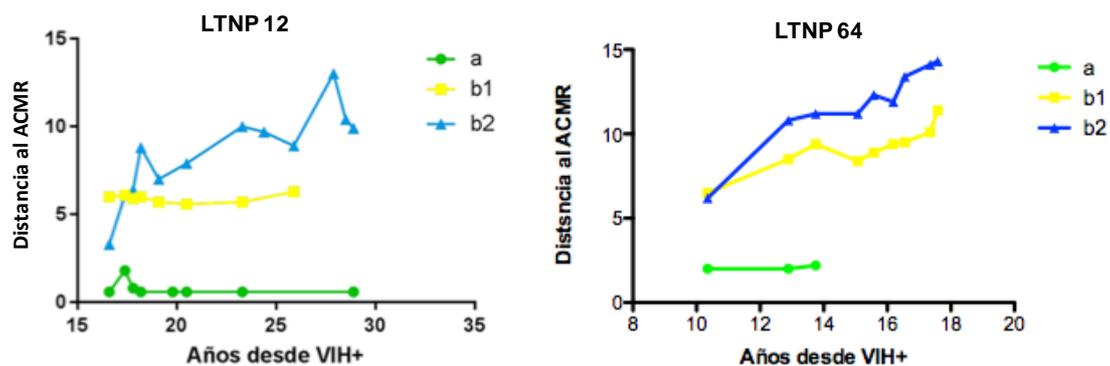


Figura 4.19 Evolución de la divergencia en las distintas poblaciones virales de los individuos LTNP 12 y LTNP 64.

Como se puede observar en la figura 4.1(A (LTNP 12), las poblaciones virales obtenidas desde el ARN plasmático y desde las muestras de los co-cultivos, se incluyen siempre a la población “B2” independientemente del momento de obtención de la muestra. Debido a esto y con el objeto de determinar cómo era la dinámica de las poblaciones virales en los distintos tipos de muestras, se analizó la “concordancia” entre la población que se estaba seleccionando durante el proceso de aislamiento viral (co-cultivo), la población que estaba replicando en ese momento en el individuo (plasma) y la población del reservorio viral, realizando un árbol ML con dichas secuencias (ver Figura 4.16).

En las secuencias obtenidas de los virus del plasma (ver figura 4.16 y 4.20), a diferencia del ADN proviral, no se está produciendo una evolución temporal, ya que hay muestras alejadas en el tiempo que agrupan en el mismo clúster, (marcado con un círculo rojo en la figura 4.20), lo cual indicaría que lo que está replicando en el paciente no está rellenando el reservorio, si no que estaría siendo controlado por el sistema inmune del paciente.

Por otra parte, como se puede observar en la misma figura, en las muestras anteriores a la pérdida de control, las secuencias del co-cultivo y las del ADN procedente de los CMSP no se corresponden con las secuencias obtenidas del plasma de su misma

muestra, ya que no agrupan juntas. Sin embargo, en las últimas muestras donde el paciente ha perdido el control de la infección, las secuencias de los tres tipos de muestras se encuentran entremezcladas en el mismo clado. Se puede por tanto concluir que la dinámica viral de los distintos tipos de muestras analizadas cambia de patrón antes y después de la pérdida del control virológico.

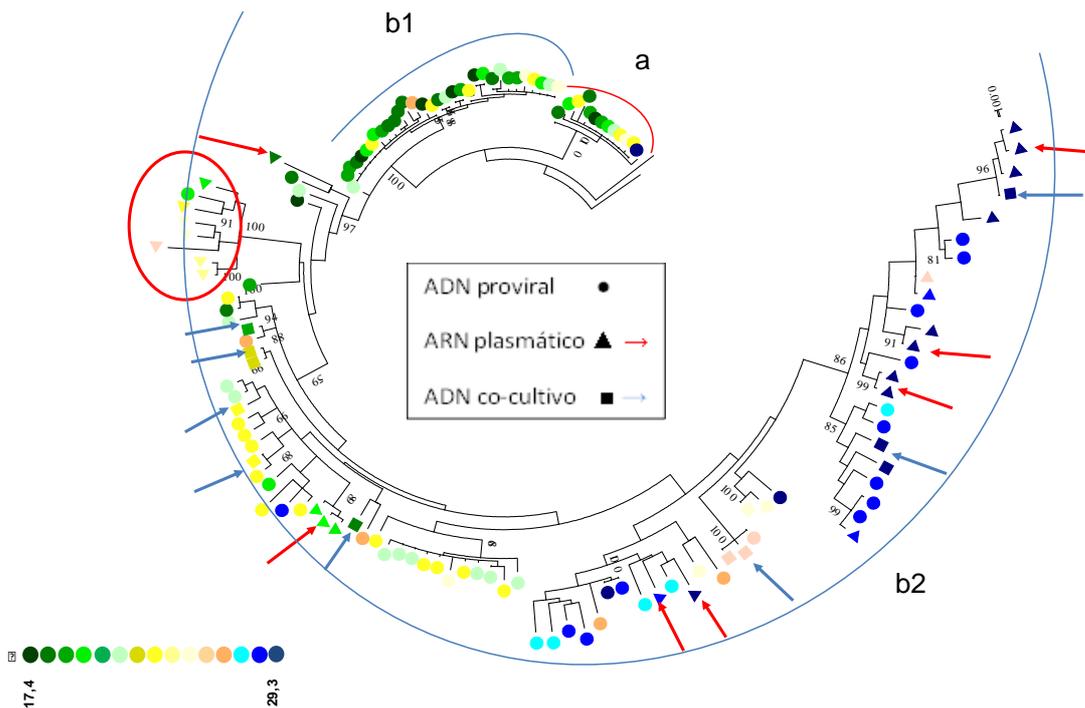


Figura 4.20: Evolución viral del LTNP 12 durante el seguimiento. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en el apartado 3.13.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP (círculos), así como de ARN plasmático (triángulos marcados con una flecha roja) y ADN de cocultivo (cuadrados marcados con una flecha azul). Se incluyen las cepas de referencia S61 y IIB del subtipo B. Los números de nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de “bootstrap” con 1000 réplicas y solo se representan valores mayores del 85%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. Rodeadas en rojo se remarcan las secuencias de ARN plasmático de distintas muestras que agrupan todas en el mismo clado.

Para poder discernir si la causa de la falta de evolución de las variantes “A” y “B1” (LTNP 12), así como su ausencia tras la activación del reservorio (co-cultivo), se debe a que son virus con baja capacidad replicativa, hicimos el estudio de infectividad en células TZM-bl utilizando pseudovirus construidos con la gp160 clonada a partir de distintas variantes virales obtenidas (ver apartados del 3.11.1 al 3.11.4).

Para ello medimos la capacidad replicativa de los pseudovirus generados con la envuelta de ocho variantes pertenecientes al virus “B2” (obtenidas en las muestras 12_12,

12_13 y 12_16 del paciente correspondientes a los años 2011, 2012 y 2014 respectivamente), junto con pseudovirus que correspondían al virus “A” (muestra 12_6 del año 2006) y a las poblaciones “B1” (muestra 12_3, 12_6 y 12_13 correspondientes a los años 2004, 2006 y 2012 respectivamente) y “B2” (12_6, 12_12, 12_13 y 12_16 correspondientes a los años 2006, 2011, 2012 y 2014 respectivamente) obtenidos previamente por el grupo. Como se puede observar en la figura 4.21 todos los pseudovirus de la variante “B2”, independientemente de la muestra, fueron capaces de replicar con valores de URL muy por encima de los pseudovirus de la variante “B1”. El virus A no fue capaz de replicar.

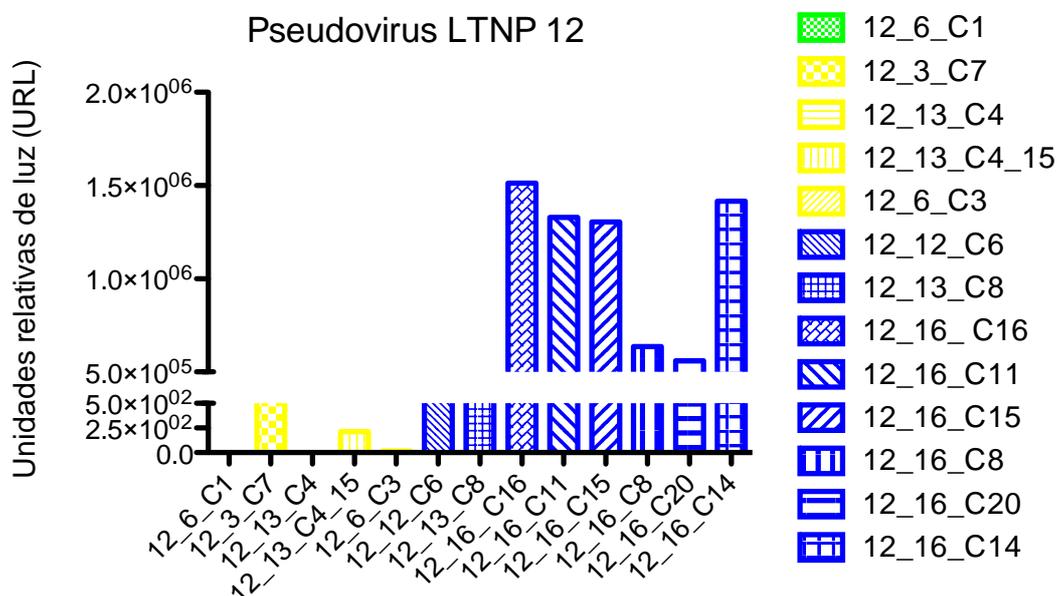


Figura 4.21: Capacidad replicativa de los pseudovirus generados con la envuelta del paciente LTNP 12. En verde aparecen el virus “A”, en amarillo los virus “B” de la subpoblación “B1” y en azul los de la subpoblación “B2”.

En relación al paciente LTNP 12, los pseudovirus de la variante “B1” tienen una capacidad replicativa muy baja, mientras que en la variante “B2” se observa una gran heterogeneidad, con pseudovirus (12_12_C6, 12_12_C8) por debajo de las 5×10^5 URL a pseudovirus por encima de 1.3×10^6 URL. Los pseudovirus “B2” pertenecientes a la muestra 12.16 obtenida tras la pérdida de control tienen, en general, una capacidad replicativa mayor que la de las variantes anteriores a la pérdida de control.

Según estos resultados parece existir una tendencia al aumento de la capacidad replicativa que estaría relacionada con la pérdida del control virológico en el paciente LTNP 12.

En el caso del paciente LTNP 64, habíamos observado una tendencia al aumento de la capacidad replicativa en el momento de la pérdida de control durante el ensayo de cinética de replicación (ver apartado 4.4.2, figuras 4.13 y 4.14). Para comprobar que esta tendencia se mantenía o aumentaba con el tiempo de infección, realizamos un estudio de infectividad en células TZM-bl utilizando pseudovirus construidos con la gp160 clonada a partir de distintas variantes virales obtenidas (ver apartados 3.12.1 al 3.12.2). Dichas variantes virales eran representativas de la cuasiespecie del paciente.

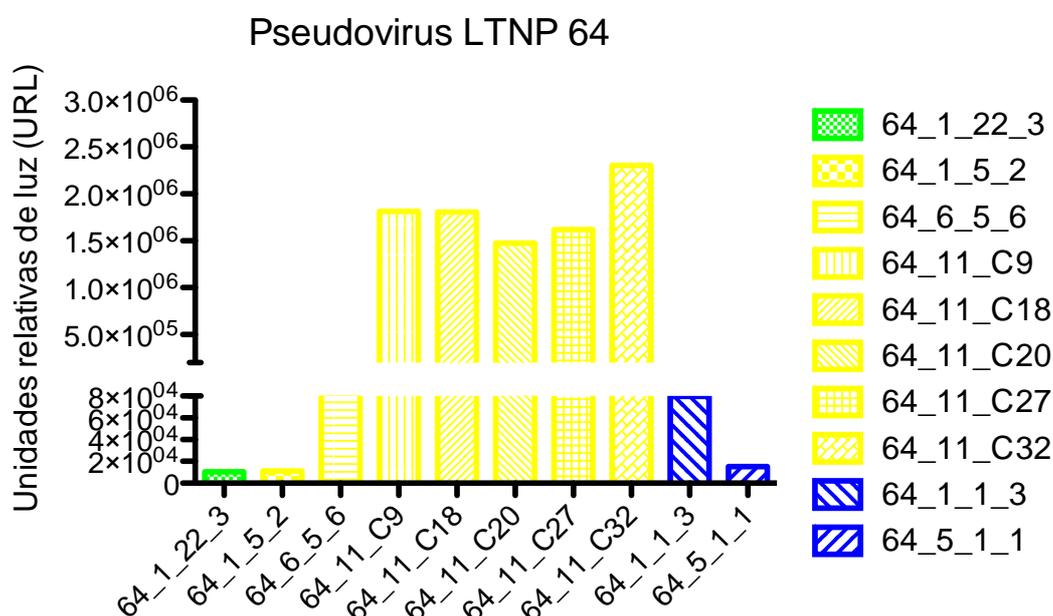


Figura 4.22: Capacidad replicativa de los pseudovirus generados de la envuelta del paciente LTNP 64. En verde aparece la subpoblación “a”, en amarillo los virus de la subpoblación “b1” y en azul los de la subpoblación “b2”.

Como se puede observar en la figura 4.22, los pseudovirus con mayor infectividad fueron aquellos obtenidos a partir de la muestra 64.11 (siendo esta la última muestra obtenida antes de que el paciente entrara en terapia antiretroviral), alcanzando valores por encima de las 10^6 URL. Las variantes obtenidas antes de la pérdida de control (64.1 y 64.5) mostraron valores por debajo de las 10^5 URL. La diferencia de infectividad observada entre las variantes de antes y después de la pérdida de control es estadísticamente significativa ($p=0.0079$).

Teniendo en cuenta los dos ensayos realizados para caracterizar el virus del paciente LTNP 64 (ver figura 4.13, 4.14 y 4.22) constatamos que hay un aumento en la infectividad del virus con el tiempo y que este coincide con el momento de la pérdida de control de la infección.

En resumen, los resultados obtenidos en estos dos individuos, que pierden el control de la replicación viral, indican que esta pérdida de control está relacionada con la aparición e imposición en la población de variantes virales con una mayor capacidad replicativa.

5. DISCUSIÓN

El trabajo realizado en esta Tesis ha estado encaminado al estudio de la variabilidad y evolución del virus VIH-1 en individuos no progresores a largo plazo (LTNP), centrándonos en los LTNP que denominados “modernos”. Hemos estudiado las características virológicas en los virus en estos individuos, como la variabilidad genética de la población viral en un momento dado y su evolución a lo largo del seguimiento, así como las características inmunológicas y genéticas del hospedador. Los estudios filogenéticos se han realizado en la región C2-V5 del gen *env* por tres motivos:

- 1) esta zona del gen determina la especificidad del receptor y del co-receptor.
- 2) en esta región se localizan importantes epítomos frente a los que se dirige la respuesta inmune del paciente.
- 3) exhibe un alto grado de variabilidad filogenéticamente informativa.

Hay que tener en cuenta que este tipo de individuos es muy minoritario, suponiendo entre el 1-5% de los individuos infectados por el VIH-1 [106, 205, 211]. Por este motivo, es difícil identificar muchos individuos con estas características y no es posible, en consecuencia, conseguir estadísticas significativas en los distintos parámetros analizados en ambos grupos, siendo un estudio cualitativo y no cuantitativo.

5.1 Datación de las secuencias virales.

Los LTNP son un grupo pequeño y muy heterogéneo de individuos, que presentan las siguientes características: permanecen clínicamente asintomáticos en ausencia de terapia antirretroviral, manteniendo unos niveles de células T CD4+ normales (> 500 células/ μ l) durante al menos diez años [73, 211, 212]. Aunque algunos pueden tener niveles bajos de carga viral [73], existe una gran variación en los niveles de carga viral plasmática [213] así como distintos patrones de evolución viral [208, 214]. Además, mediante la datación de las secuencias virales (descrita en el apartado 4.1.2), pudimos segregar los individuos LTNP en dos grupos claramente diferenciados: LTNP “modernos” y LTNP “ancestrales”. Los LTNP “ancestrales” presentan secuencias nucleotídicas del ADN proviral con una datación próxima a la fecha de seroconversión del paciente, mientras que los LTNP “modernos” presentan una datación del ADN proviral cercana a la fecha de obtención de la muestra.

El grupo de individuos LTNP “ancestrales”, ha sido objeto de estudio en otra Tesis de nuestro grupo [70], y en ella encontramos que los individuos LTNP “ancestrales” se diferencian de los individuos “modernos” además de en la datación de sus secuencias

nucleotídicas, en la heterogeneidad y divergencia de sus cuasiespecies virales, y en diversos marcadores virológicos e inmunológicos.

5.2 Clasificación de los individuos LTNP “modernos”:

5.2.1 *Análisis filogenético de los individuos LTNP “modernos”.*

Para estudiar la evolución viral de los individuos LTNP “modernos”, se llevó a cabo un análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas, como se describe en el apartado 4.2.1.

Los árboles filogenéticos inferidos (ver figuras de la 4.2A a la 4.2H) muestran que las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada paciente forman grupos monofiléticos con altos valores de remuestreo ($> 90\%$). Sin embargo, en los individuos LTNP 12 y LTNP 64 el valor de remuestreo, al utilizar como grupo externo la cepa de referencia del subtipo B, es del 49% y del 69% respectivamente (ver figuras 4.3 y 4.4).

A partir del análisis filogenético pudimos detectar una topología con una clara estructura temporal que se caracterizaba por presentar unos árboles filogenéticos similares a los que podemos encontrar en individuos con progresión crónica (individuos LTNP 10, LTNP 12 y LTNP 30). Sin embargo, en los demás árboles filogenéticos (individuos LTNP 7, LTNP 14, LTNP 19, LTNP 45 y LTNP 64) no se observaba la estructura temporal descrita.

5.2.2 *Heterogeneidad y divergencia de las cuasiespecies virales.*

Ante los resultados obtenidos en la reconstrucción filogenética, decidimos analizar los parámetros de heterogeneidad y divergencia virales para determinar si estos parámetros podían ayudar a diferenciar las dos topologías que reflejan dichos árboles (ver tabla 4.3 y 4.4)

La topología representada por los individuos LTNP 10, LTNP 12 y LTNP 30, es consistente con el modelo que propuso el grupo del Dr. Mullins [151] quienes describieron que durante la mayoría del periodo asintomático la evolución del VIH-1, en individuos con progresión crónica, muestra una estructura temporal. Esta estructura está caracterizada por el reemplazo de los linajes virales y un aumento lineal tanto de la divergencia y como de la heterogeneidad de las cuasiespecies virales con el tiempo con respecto al virus fundador. A medida que nos vamos acercando al final del periodo asintomático, la heterogeneidad

disminuye mientras que la divergencia sigue aumentando. Justo cuando el paciente va a entrar en la fase de SIDA, la divergencia se estabiliza mientras que la heterogeneidad sigue disminuyendo (modelo “temporal”).

La topología que muestran los individuos LTNP 7, LTNP 12 A, LTNP 14, LTNP 19, LTNP 45 y LTNP 64, se caracteriza por una falta de estructura temporal en la diversificación de las cuasiespecies. En este patrón de evolución, la heterogeneidad y la divergencia fluctúa aleatoriamente. Esto se refleja en el análisis de la divergencia frente al tiempo donde observamos que no hay una relación estadísticamente significativa entre los parámetros analizados (modelo “atemporal”) [208] (ver tabla 4.4). La divergencia anual, es lo que diferencia claramente el grupo de individuos “temporales” y “atemporales”. Que el aumento de la divergencia anual no sea estadísticamente significativa se debe a que en estos individuos no hay un reemplazo temporal de los linajes virales. Podría ser que en estos individuos se estén activando distintos reservorios virales latentes [20] de forma aleatoria a lo largo del tiempo. Aunque no podemos determinar una tasa de evolución anual en los individuos “atemporales”, si consideramos la primera y la última muestra observamos que la heterogeneidad y la divergencia también aumentan en el tiempo. En el paciente LTNP 14, detectamos en la muestra 2, variantes virales CCRX4 que produjeron un gran aumento de la heterogeneidad y de la divergencia en la población viral. La desaparición de estas variantes en las muestras posteriores podría indicar que estas variantes indujeron una respuesta CTL que consiguió eliminarlas o controlarlas temporalmente, con el consiguiente descenso en la heterogeneidad y en la divergencia.

Aunque en este trabajo se han analizado todos los individuos LTNP “modernos” disponibles en el laboratorio, cabe destacar, que sólo en los individuos LTNP 12, LTNP 30 (modelo “temporal”), LTNP 45 y LTNP 64, (modelo “atemporal”) se ha podido llevar a cabo un estudio evolutivo a largo plazo (de entre 6 y 11 años) y en consecuencia en estos individuos se pueden observar mejor las diferencias en la topología de los árboles filogenéticos. En el resto de individuos se realizó un estudio evolutivo a corto plazo de forma que las diferencias están disminuidas.

5.2.3 Estudio de dobles infecciones: individuos LTNP 12 y LTNP 64

En este apartado hemos detectado la posible presencia de más de un virus en dos de los individuos analizados, ya que la única forma de determinar que un paciente está

doblemente infectado (ya sea co-infección o superinfección) es realizar un estudio filogenético de las secuencias virales. Para eliminar la posibilidad de que el bajo valor de remuestreo obtenido en los árboles de los virus de los individuos LTNP 12 y LTNP 64 (ver figuras 4.2B y 4.2H respectivamente), al utilizar cepas de referencia del subtipo B, fuera un reflejo de la coexistencia de secuencias virales con distintos grados de evolución, decidimos volver a reconstruir los árboles filogenéticos de los virus de los individuos LTNP 12 y LTNP 64, incluyendo en el análisis cepas de referencia del subtipo A y D como grupos externos, más alejadas filogenéticamente. En el caso del individuo LTNP 12, el valor del remuestreo seguía siendo bajo (49%) (ver figura 4.3). Sin embargo, al utilizar cepas de referencia de otros subtipos, el individuo LTNP 64 agrupaba todo junto (valor de remuestreo del 100%) (ver figura 4.4) pero introducía los virus de referencia del subtipo B dentro del clado más cercano su ACMR. Todo esto podría indicar que estos individuos están doblemente infectados.

Las dobles infecciones tienen una frecuencia parecida, alrededor del 20% [145], en todos los grupos de individuos VIH-1 independientemente de la velocidad de progresión de la enfermedad. Por esto, nos propusimos hacer otro estudio filogenético para estar totalmente seguros de que se trataba de dobles infecciones. Se reconstruyó un árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias nucleotídicas únicas derivadas del gen de la envuelta completo, pertenecientes a virus de individuos LTNP españoles, europeos, de Canadá y Estados Unidos de VIH-1 y con distintos tipos de progresión. También se incluyeron cepas de referencia de distintos subtipos (Figuras 4.3 y 4.4). Como se puede observar en la figura 4.5, todas las cuasiespecies estudiadas formaron grupos únicos (incluida la del paciente LTNP 64), mientras que la cuasiespecie del paciente LTNP 12 forma dos grupos diferentes.

La distancia genética media entre los dos grupos del virus LTNP 12 (ver apartado 4.2) es mayor que la distancia genética a otros aislados españoles no relacionados epidemiológicamente. [106, 124, 129]. La presencia de dos clados estadísticamente diferenciados en el paciente LTNP 12 junto con una mayor distancia genética entre los grupos A y B que con aislados virales no relacionados, indica que este paciente está doblemente infectado con dos virus del subtipo B. A partir de que confirmamos la presencia de la doble infección, se analizaron de forma independiente las dos poblaciones.

En el caso del virus del individuo LTNP 64, sus secuencias formaron un grupo único por lo que no podemos confirmar la presencia de una doble infección. Esto puede deberse al hecho de que el árbol filogenético de este paciente con patrón de evolución “atemporal”, se caracteriza por la presencia de dos poblaciones virales claramente diferenciadas, donde una población se encuentra más alejada del ACMR (subpoblación B), indicando mayor evolución, y otra población mucho más próxima al ACMR y por lo tanto mucho menos evolucionada (subpoblación A). La falta de evolución en la subpoblación A puede explicarse por la expansión clonal de esta subpoblación [14, 20]. Además, pone de manifiesto la coexistencia en un mismo individuo de variantes antiguas y modernas [206].

En la mayoría de los estudios de la literatura, las dobles infecciones están asociadas con la progresión de la infección [215]. El presente estudio describe la ocurrencia de una doble infección en un paciente LTNP que ha mantenido sus características clínicas y no ha mostrado ningún síntoma de progresión de la enfermedad durante casi 25 años [129].

5.2.4 Análisis de las mutaciones sinónimas y no-sinónimas sitio a sitio en el gen env de los individuos LTNP.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de heterogeneidad y divergencia entre los dos grupos, posiblemente debido a que el tamaño muestral que tenemos es demasiado pequeño. Para tratar de investigar las causas que están promoviendo las diferencias encontradas a nivel filogenético en los virus de estos individuos, nos propusimos analizar que fuerzas selectivas podían estar influenciando su evolución. Para ello determinamos qué posiciones aminoacídicas estaban sometidas a presión, tal y como se describe en el apartado 4.2.5 (ver figura 4.7) [201].

Como se puede observar en la figura 4.7, la distribución de los sitios de selección no es homogénea en todas las regiones analizadas, a pesar de esto no encontramos diferencias, entre los dos grupos de individuos. Lo más destacable de los resultados de este análisis es que en las regiones V3 y C4, prácticamente, solo aparece acumulación de mutaciones sinónimas (selección negativa). Esto probablemente se deba a que estos sitios admiten pocos cambios, ya que afectaría a la estructura proteica y como consecuencia probablemente al reconocimiento del receptor y correceptor. Estos resultados concuerdan con que son zonas estructuralmente muy importantes ya que es donde se encuentran parte de los residuos implicados en la unión del virus al correceptor CCR5 y al receptor CD4 respectivamente [209, 210]. Debido a la importancia estructural de estas zonas y su implicación directa con la capacidad de entrada a la célula, son zonas que prácticamente no admiten variación y, por tanto, están sometidas a selección negativa.

Tras analizar las posiciones que estaban sometidas a presión selectiva sitio a sitio, nos preguntamos qué fuerzas estarían influenciando la evolución a nivel global en este gen.

Para poder determinar si hay presión selectiva y de qué tipo, utilizamos la diferencia dN-dS. Cuando el resultado de esta diferencia es mayor de cero, indica que la proteína está sometida a selección positiva (acumulación de posiciones no sinónimas); cuando es inferior a cero estaría sometida a selección negativa (acumulación de mutaciones sinónimas) [216]. El resultado obtenido fue que la mayoría de individuos “temporales” tienen evidencia de presión positiva (diferencia mayor de uno), mientras que en los individuos “atemporales” esta diferencia es menor de uno. Como ya hemos comentado anteriormente, este resultado es claro en los individuos en los que se ha hecho un seguimiento evolutivo a largo plazo de entre 6 y 9 años (LTNP 12 y LTNP 30 patrón temporal, LTNP 45 y LTNP 64 patrón atemporal) estando en concordancia con estudios previos [208, 217]. Se observan discrepancias en los individuos LTNP 7, LTNP 10 y LTNP 14 probablemente debido al tiempo de estudio (3 años). Con estos resultados comprobamos que el modelo “temporal” estaría mayoritariamente asociada a selección positiva, mientras que el modelo “atemporal” estaría asociada a selección negativa. De nuevo los resultados indicarían que la diferente presión selectiva impuesta por el sistema inmune del huésped podría ser el origen de la discordancia en los patrones evolutivos virales.

De acuerdo con los modelos filodinámicos descritos por Grenfell et al. [218], la estructura temporal y la alta tasa de adaptación viral observada en estos individuos (LTNP 10, LTNP 12 y LTNP 30) podría ser el resultado de la coincidencia de una notable replicación viral junto con una presión inmune “media”. En esta situación, la infección crónica de VIH-1 estaría mantenida por rápidos y continuos ciclos de infecciones productivas y muerte celular de las células TCD4⁺ activadas, debido a la aparición y selección constante de variantes de escape del sistema inmune (modelo de evolución adaptativa) [219].

La pérdida de estructura temporal observada en los individuos LTNP 7, LTNP 14, LTNP 19, LTNP 45 y LTNP 64 es más compatible con un patrón de evolución neutra (apoyada por la aparición de selección negativa en estos individuos). Este modelo “atemporal” podría resultar de la coincidencia de una notable replicación viral (aunque no se han encontrado diferencias significativas en la carga viral entre los dos grupos de individuos) junto con una presión inmune “baja” [30]. La situación de “inmunodeficiencia”

relativa de estos individuos podría corresponderse con el periodo donde los síntomas clínicos aparecen [208]. Sin embargo, esta explicación parece improbable porque los individuos “atemporales” no mostraban síntomas clínicos de progresión de la enfermedad y ninguno de ellos había recibido tratamiento antirretroviral durante el periodo de seguimiento.

Otra forma alternativa de explicar el modelo “atemporal”, sería el resultado de la coincidencia de una notable replicación viral junto con una presión inmune “alta y persistente” capaz de reducir la aparición y selección de variantes de escape del sistema inmune. De acuerdo con este modelo, las secuencias derivadas de puntos posteriores no necesariamente habrían replicado a lo largo de generaciones y no habrían acumulado más cambios que aquellas variantes obtenidas con anterioridad, contribuyendo de este modo a la pérdida de la estructura temporal. Bajo este escenario, la replicación viral persistente podría ser sostenida principalmente por la activación de nuevas variantes de un reservorio de células T CD4⁺ latentemente infectadas mediante expansiones clonales de distintas subpoblaciones [20, 208]. De esta forma, la presión selectiva ejercida por el sistema inmune del huésped puede ser la causa de los dos patrones evolutivos observados en este estudio.

5.3 Estudio de las características clínicas de los individuos LTNP “modernos”: carga viral, número de células T CD4⁺ y CD8⁺.

La carga viral plasmática, así como el número de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ se analizaron durante el seguimiento de los individuos (ver figuras 4.10, 4.11, 4.12 y tabla 4.8).

Como puede observarse en la tabla 4.8, este grupo de individuos es muy heterogéneo en cuanto a carga viral. Debido a esta gran variación entre los individuos, y que el número total es pequeño, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la carga viral plasmática entre ambos grupos. A pesar de esto, los individuos LTNP7 y LTNP45 (ambos con patrón de evolución “atemporal”) son controladores virémicos, es decir tienen cargas virales por debajo de las 2.000 copias/ml, muy por debajo de los niveles del resto de individuos.

Analizando la dinámica de células T CD4⁺ y T CD8⁺ observamos que en todos los

individuos (a excepción del LTNP 19) hay un descenso estadísticamente significativo de células T CD4⁺ con el tiempo mientras que simultáneamente el número de células T CD8⁺ se mantiene estable o aumenta. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la tasa de pérdida de células T CD4⁺ y T CD8⁺ entre los dos grupos de individuos, aunque parece haber una tendencia a una mayor pérdida de células T CD4⁺ durante el seguimiento en el grupo de individuos “temporales” (1,101% en “temporales”, 0,802% en “atemporales”).

5.4 Estudio virológico de los individuos LTNP “modernos”.

Para completar la caracterización virológica de los individuos LTNP “modernos”, intentamos el aislamiento del virus en todos los individuos mediante co-cultivo (ver apartados 3.3.6-3.3.7), obteniendo aislados primarios de los siguientes individuos: LTNP 7, LTNP 10, LTNP 12, LTNP 19 y LTNP 64 (ver apartado 4.4.1). Aunque el porcentaje de aislamiento fue claramente superior al que se obtiene en individuos “ancestrales”, hay que señalar que en tres de los individuos (LTNP 14, LTNP 30 y LTNP 45) no fuimos capaces de obtener el aislamiento por lo tanto su capacidad replicativa no fue posible estudiarla. Este hecho, indirectamente, indicaría que su capacidad replicativa es menor.

A continuación, estudiamos la capacidad replicativa de estos aislados primarios comparándola con un grupo control de PC (ver apartado 4.4.2). Como se puede observar en la figura 4.13, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la capacidad replicativa de los virus ni entre los individuos “modernos” y “atemporales”, ni entre los virus de los individuos del grupo de LTNP y los PC. Este resultado está en concordancia con otros estudios en los que queda patente la gran diversidad existente dentro del grupo de individuos LTNP. Hay estudios centrados en individuos LTNP controladores de élite, en los que se demuestra que no siempre es posible recuperar estos virus y que en los que se recupera, el virus está atenuado y tiene, por tanto, una eficacia biológica reducida. Esta característica podría ser la explicación de la ralentización en la progresión de la enfermedad [68, 70, 71, 211, 220-224]. Sin embargo, dentro del grupo de individuos denominados LTNP hay una gran heterogeneidad y no todos ellos tienen virus atenuados o defectivos, llegando a alcanzar el estatus de no progresor mediante vías muy diferentes en cada uno de ellos [73, 211, 225, 226]. Una diferencia remarcable entre los individuos LTNP “modernos” y los “ancestrales”, es que mientras que en el primer grupo el aislamiento del virus ha sido

exitoso en cinco de los ocho casos, en el grupo de virus LTNP “ancestrales” el aislamiento siempre fracasó [70, 71]. Esto ya es un indicador de las diferencias existentes en cuanto a capacidad replicativa entre ambos grupos, a pesar de ser todos ellos individuos no progresores.

En el caso del paciente LTNP 64 observamos diferencias en la capacidad replicativa entre los virus aislados de la muestra 6 con respecto a las muestras 7 y 8 (posteriores en el tiempo). Si nos fijamos en la figura 4.14, podemos concluir que existe una tendencia al aumento de la capacidad replicativa con el tiempo en este paciente lo que podría ser un factor determinante en la progresión de la enfermedad [227].

En resumen, podemos concluir que, en los casos en los que el aislamiento viral fue posible, la diferencia observada a nivel filogenético entre los dos grupos de individuos LTNP “modernos” no se debe, en principio, a diferencias en la capacidad replicativa de los virus. También podemos concluir que, en el grupo de individuos estudiados cuyos aislados virales fueron obtenidos, la diferencia existente en la progresión de la enfermedad con respecto a los PC no se debe a una capacidad replicativa reducida de los virus que tienen los individuos LTNP, a excepción del virus del paciente LTNP 7 en el que si se observa una menor capacidad replicativa.

5.5 Estudio inmunológico de los individuos LTNP “modernos”.

5.5.1 Estudio de neutralización de los aislados primarios de los individuos LTNP “modernos”.

Tras realizar la caracterización virológica de los individuos LTNP, nos propusimos analizar si la capacidad neutralizante de estos individuos podría estar implicada en el control de la infección y en los modelos de evolución encontrados.

Como se puede observar en las tablas 4.10 y 4.11, aunque los valores obtenidos son bajos, hay una tendencia a una mayor capacidad de neutralización en los individuos “atemporales” cuando se utiliza un plasma contemporáneo a la obtención de la muestra. Esta respuesta aumenta notablemente cuando se utilizan plasmas “modernos” (posteriores en el tiempo a la muestra de la que se aisló el virus), con respecto a los individuos LTNP

“temporales”. Esta misma tendencia se observa cuando se realiza una neutralización heteróloga, donde vemos que la IC_{50} (inverso de la dilución de anticuerpos que produce el 50% de neutralización del virus) es mayor en los individuos “atemporales”. En resumen, aunque los niveles de neutralización obtenidos en el ensayo son bajos, los individuos LTNP “atemporales” siempre tienen una mejor respuesta neutralizante, tanto autóloga como heteróloga.

5.5.2 Estudio de los factores genéticos asociados al huésped.

Para completar el estudio de los individuos LTNP “modernos”, analizamos distintos factores genéticos del huésped asociados con una progresión más lenta (ver tabla 4.12).

Se analizaron distintos marcadores genéticos asociados con la progresión de la enfermedad, factores protectores (+) y factores de riesgo (-) otorgándoles una puntuación para poder reunir la información genética (ver tabla 4.12) [204]. Con este análisis pudimos determinar que los individuos LTNP “temporales” tenían una puntuación global inferior (menos acumulación de factores protectores) a la obtenida para los individuos “atemporales” (1 frente a 2,25). Los datos parecen apuntar nuevamente a que los individuos LTNP “atemporales” tienen una mayor acumulación de factores protectores y, por lo tanto, tendrían un mejor pronóstico en cuanto a progresión de la enfermedad.

5.5.3 Análisis de la concentración de $\beta 2$ microglobulina y del título de anticuerpos específicos frente a la gp160 del VIH-1 en plasma.

Para complementar la caracterización virológica de los individuos LTNP en estudio, intentamos encontrar diferencias a nivel de la respuesta del sistema inmune humoral entre los dos grupos de individuos. Para ello realizamos un análisis comparativo de la concentración de $\beta 2$ microglobulina, como marcador de activación del sistema inmune, y del título de anticuerpos específicos frente a la gp160/p25 del VIH-1 en plasma para evaluar la respuesta humoral (ver tabla 4.13).

Los resultados obtenidos muestran que los individuos LTNP “atemporales” tienen una concentración de $\beta 2$ microglobulina y título de anticuerpos específicos frente a la gp160/p25 del VIH-1 en plasma mayor que la encontrada en los individuos LTNP “temporales”. A pesar de que estas diferencias no son estadísticamente significativas entre ambos grupos, vemos nuevamente que en los individuos “atemporales” parece haber una

tendencia hacia una mejor respuesta del sistema inmune que en los “temporales”.

Si analizamos conjuntamente los resultados del estudio de neutralización, medida de la concentración de $\beta 2$ microglobulina y del título de anticuerpos específicos frente a la gp160/p25 del VIH-1 en plasma y los resultados del estudio genético del huésped, podemos afirmar que la estructura filogenética de los virus “atemporales” es el resultado de la coincidencia de una notable replicación junto con una presión inmune alta y persistente. La replicación viral en estos individuos estaría sostenida principalmente por la activación aleatoria y expansión clonal de nuevas variantes virales procedentes de reservorios de células T CD4⁺ latentemente infectadas. Debido a esto, no observamos una estructura filogenética “temporal”. No es descartable que a medida que el sistema inmune del huésped se vaya deteriorando observaríamos la transición entre la estructura filogenética “atemporal” a la “temporal”.

5.7 Análisis de la pérdida de control en dos individuos LTNP.

La infección por VIH-1 en individuos LTNP presentan una buena oportunidad para identificar los determinantes moleculares de la patogénesis del VIH-1 en un entorno inmunogenético definido, ya que estos individuos permanecen clínicamente estables durante años en ausencia de tratamiento antirretroviral. Sin embargo, muchos LTNP experimentan eventualmente una progresión clínica, inmunológica y virológica de la enfermedad [73, 215]. En nuestro estudio, dos de los individuos analizados llegaron a perder este control a lo largo del seguimiento. Por esta razón, intentamos analizar los factores virales que podrían estar asociados a esta pérdida del estatus de LTNP.

En el caso del paciente LTNP 12, como ya se ha comentado en el apartado 5.2.3, el análisis de la cuasiespecie de ADN proviral obtenido a partir de CMSP mostró la presencia de dos virus distintos, el virus “A” y el virus “B”. En este último se podía diferenciar dos subpoblaciones virales: “B1” y “B2”. El virus “A” siempre fue el menos representado en la población (alrededor del 12% durante todo el seguimiento). La subpoblación “B1” fue la predominante en las primeras muestras analizadas y decreció a una proporción muy baja llegando a ser indetectable en muestras posteriores al año 2012. La subpoblación “B2” fue detectada desde la primera muestra analizada (8% en 2003), llegando a ser la predominante

en las muestras cercanas a la progresión de la enfermedad y se impuso tras la pérdida de control (ver figura 4.18 A).

Durante el periodo en que el paciente mantuvo el estatus LTNP, las secuencias obtenidas del plasma agrupaban juntas pero separadas de aquellas obtenidas por co-cultivo en el árbol filogenético. Sin embargo, aquellas variantes obtenidas durante o después de la pérdida de control de la infección, ya fueran de ADN proviral, ARN plasmático o ADN de co-cultivo, agrupaban todas juntas (ver figura 4.20), es decir, la progresión de la enfermedad se asoció a una homogenización de las poblaciones virales presentes en el paciente.

La caracterización viral de las envueltas virales presentes en el individuo a lo largo del curso clínico de la infección mediante generación de pseudovirus de las poblaciones “A” y “B1”, muestran una capacidad replicativa muy baja. Sin embargo, los pseudovirus obtenidos a partir de la subpoblación “B2” muestran un aumento significativo de la capacidad replicativa que se asocia en el tiempo con la pérdida de control de la enfermedad (ver figura 4.21).

El análisis de las cuasiespecies, en el caso del paciente LTNP 64, reveló también tres subpoblaciones virales (“A”, “B1” y “B2”) con distinto grado de evolución, siendo la subpoblación “A” la menos evolucionada. Con el paso del tiempo, la subpoblación “A” deja de detectarse y a partir de la pérdida de control se impone la subpoblación “B1” (ver figura 4.18B). Esto está en concordancia con los resultados obtenidos del análisis de las envueltas virales mediante generación de pseudovirus, donde los que tenían mayor capacidad replicativa, eran los obtenidos tras la pérdida de control que además pertenecen a la subpoblación “B1” (ver figura 4.22). También concuerda con los resultados del estudio de los virus obtenidos por co-cultivo de las CMSP donde se observaba una tendencia al aumento de la capacidad replicativa en las muestras 64.7 y 8 con respecto a la 64.6, momento en el que se produce la pérdida de control de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en ambos sujetos, sugieren que los cambios clínicos observados pueden relacionarse con cambios en las subpoblaciones de VIH-1 y fundamentalmente con un aumento de la capacidad replicativa de las variantes seleccionadas. Por tanto, podemos decir, que los cambios que se producen en las cuasiespecies virales tienen un impacto significativo en el mantenimiento o no del estatus de LTNP. La imposición en las poblaciones virales de virus con una mejor capacidad

replicativa resulta en cambios en la progresión de la enfermedad, como se ha demostrado en otros estudios [73]. En resumen, el análisis de poblaciones virales puede ayudar a entender los mecanismos por los cuales algunos LTNP pierden el control viral y su influencia en la patogenia de la infección por VIH-1.

Es interesante resaltar que en los dos individuos en los que se ha constatado una pérdida de control de la infección coincide con los dos individuos en los que se analizó la posibilidad de una doble infección.

Por qué algunos individuos desarrollan SIDA rápidamente mientras que otros permanecen asintomáticos durante muchos años, sigue siendo una pregunta central en la investigación del VIH-1 [228]. En este estudio, hemos tratado de caracterizar un grupo de sujetos LTNP que llevan controlando la enfermedad durante un periodo largo de tiempo. A diferencia de los individuos LTNP “ancestrales” (todos ellos controladores de élite) que muestran cuasiespecies muy homogéneas y con poca divergencia del ACMR, así como una baja capacidad replicativa [70], los individuos objeto de este estudio parecen haber alcanzado el estatus de no progresor por diferentes vías. Los resultados encontrados muestran cuasiespecies virales más heterogéneas y divergentes del ACMR, así como virus con capacidades replicativas similares a los PC. Por esto, los individuos LTNP “modernos” son más parecidos a los de los progresores crónicos que a los de los controladores de élite. Todos estos datos parecen indicar que, antes o después, los individuos LTNP “modernos” terminarán progresando a la fase de SIDA. Esta progresión podría ocurrir antes en los “temporales”, lo cual está en concordancia con la aplicación de la terapia antiretroviral a todos los sujetos con carga viral.

En resumen, a través del estudio de las características virológicas de los virus en dos grupos de individuos LTNP, hemos podido identificar características virológicas distintas entre los dos grupos que explicarían los dos tipos de evolución encontrados. El estudio de los virus y sus características virológicas permiten profundizar y entender la patogenia de la infección por VIH-1.

6. CONCLUSIONES.

- 1) La estimación de la fecha de las secuencias virales (datación) nos ha permitido diferenciar dos grupos de individuos LTNP: 1) “ancestrales” (con secuencias próximas a la fecha de infección del paciente) y 2) “modernos” (con secuencias próximas a la fecha de obtención de la muestra).
- 2) Los dos modelos de evolución viral, “temporal” y “atemporal”, han sido confirmados en los individuos LTNP del estudio.
- 3) El modelo “temporal” es semejante al propuesto para individuos crónicos con una sustitución de variantes virales con el tiempo, mientras que el modelo “atemporal” estaría asociado a expansiones clonales de las poblaciones virales.
- 4) La variabilidad genética observada en la envuelta viral no está uniformemente distribuida ya que hemos encontrado una escasa acumulación mutaciones no sinónimas en las V3 y C4, lo que indica que estas zonas están sometidas a una gran presión negativa debido a su importancia estructural.
- 5) No existen diferencias significativas en cuanto a la variabilidad genética observada en las envueltas de los virus de los dos grupos.
- 6) En los modelos descritos (“temporal” y “atemporal”) la presión inmune y los factores genéticos del huésped parecen tener un papel importante.
- 7) El aislamiento viral no fue posible en tres de los ocho individuos analizados, lo cual puede indicar una baja capacidad replicativa de estos virus.
- 8) En aquellos casos en los que el aislamiento fue posible, los virus obtenidos no presentaban grandes diferencias en su capacidad replicativa.
- 9) Los individuos “atemporales” presentan una mayor respuesta neutralizante, una mayor concentración de $\beta 2$ microglobulina, un mayor título de anticuerpos gp160 y una mayor acumulación de factores genéticos protectores del huésped, aunque debido al bajo número de individuos las diferencias observadas no llegan a tener un valor estadísticamente significativo.
- 10) El seguimiento clínico y virológico en dos de los individuos estudiados, nos ha permitido constatar la aparición e imposición en las poblaciones virales de virus con mejor capacidad replicativa que se asocia con cambios en la progresión de la enfermedad y pérdida del estatus de LTNP.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Gottlieb, M.S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon. , *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men*. N. Engl. J. Med. , 1981. **305**: p. 1426-1431.
2. Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe vande, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and a. S. Cunningham-Rundles. , *An outbreak of community-acquired pneumocystis carinii pneumonia*. . N. Engl. J. Med, 1981. **305**: p. 1431-1438.
3. Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. V.zinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. , *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**: p. 868-871.
4. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 500-3.
5. Nuno R. Faria, A.R., Marc A. Suchard, Guy Baele, Trevor Bedford, Melissa J. Ward, Andrew J. Tatem, João D. Sousa, Nimalan Arinaminpathy, Jacques Pépin, David Posada, Martine Peeters, Oliver G. Pybus, Philippe Lemey., *The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations*. Science, 2014. **346**(6205): p. 56-61.
6. Griffiths, P.D. and *Improved understanding of human genetic control of HIV pathogenicity*. Med Virol, 2005. **15**(1): p. 1-2.
7. David, S.A., Smith, M. S., Lopez, G. J., Adany, I., Mukherjee, S., Buch, S., Goodenow, M. M., and and O. Narayan, *Selective transmission of R5-tropic HIV type 1 from dendritic cells to resting CD4+ T cells*. . AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(1): p. 59-68.
8. Murphy, F., C.M. Fauquet, and D.H.L. Bishop, *Virus taxonomy - the classification and nomenclature of viruses: sixth report of the International Committee of Taxonomy of viruses*. 1995: Viena: Springer - Verlag.
9. Barker, E., et al., *The human immunodeficiency viruses*, in *The Retroviridae*, J.A. Levy, Editor. 1995, Plenum Press: New York. p. 1-96.
10. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.
11. Kuiken, C., et al., *Human Retrovirus and AIDS*. 1999, Los Alamos, New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics, Group T 10, Los Alamos National Laboratory.
12. Gatell, J.M.C., B. Podzamczer, D. Mir, J. M. Mallolas, J., ed. *Guia práctica del SIDA*. 4ª edici—n ed. 1996, Masson, S. A.: Barcelona (Spain). 511.
13. Finzi, D. and R.F. Silliciano, *Viral dynamics in HIV-1 infection*. Cell, 1998. **93**(5): p. 665-71.
14. Siliciano, M.L.a.R.F., *Nuclear Landscape of HIV-1 Infection and Integration*. Nature Reviews, 2017. **15**(February 2017): p. 69-82.
15. Lewinski, M.K.e.a., *Retroviral DNA Integration: Viral and Celular Determinants of target-site selection*. PLoS Pathog, 2006. **2**(60).
16. Demeulemeester, J.e.a., *HIV-1 Integrase Variants Retarget viral Integration and are Associated with Disease Progression in a Chronic Cohort*. Cell Host Microbe, 2014. **16**: p. 651-662.
17. Ciuffi, A.e.a., *A role of LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration*. Nat Med, 2005. **11**: p. 1287-1289.
18. F. Maldarelli, X.W., L. Su, F. R. Simonetti, W. Shao, S. Hill, J. Spindler, A. L. Ferris, J. W. Mellors, M.F. Coffin. S. H. Hughes., *Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells*. Science, 2014. **345**(6193): p. 179-183.
19. Weiss, R.A., *Gulliver's travels in HIVland*. Nature, 2001. **410**.

20. Alexandra J. Murray, K.J.K., Donna L. Farber and Robert F. Siliciano., *The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence*. J Immunol 2016. **197**: p. 407-417.
21. Chun, T.W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J.A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn et al., *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. Nature, 1997. **387**: p. 183-188.
22. Josefsson, L.S.v.S., N. R. Faria, E. Sinclair, P. Bacchetti, M. Killian, L. Epling, A. Tan, Ho, P. Lemey, et al., *The HIV-1 Reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**: p. E4987-E4996.
23. Jaafoura, S., M. G. de Góer de Herve, E. A. Hernández-Vargas, H. Hendel-Chavez, M. Abdoh, M. C. Mateo, R. Krzysiek, M. Merad, R. Seng, M. Tardieu, et al., *Progressive contraction of the latent HIV-1 reservoir around a core of less-differentiated CD4+ memory T cells*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5407.
24. Siliciano, J.D., J. Kajdas, D. Finzi, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Kovacs, S. J. Gange, and R. F. Siliciano., *Long-Term Follow-up Studies Confirm the Stability of the Latent Reservoir for HIV-1 in Resting CD4+ T Cells*. 2003.
25. Bailey, J.R., A. R. Sedaghat, T. Kieffer, T. Brennan, P. K. Lee, M. Wind-Rotolo, C. M. Haggerty, A. R. Kamireddi, Y. Liu, J. Lee, et al., *Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells*. J Virol, 2006. **80**: p. 6441-6457.
26. Nickle, D.C., M. A. Jensen, D. Shriner, S. J. Brodie, L. M. Frenkel, J. E. Mittler, and J. I. Mullins, *Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments*. J. Virol, 2003. **77**: p. 5540-5546.
27. Tobin, N.H., G. H. Learn, S. E. Holte, Y. Wang, A. J. Melvin, J. L. McKernan, D. M. Pawluk, K. M. Mohan, P. F. Lewis, J. I. Mullins and L. M. Frenkel., *Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication virus*. J. Virol, 2005. **79**: p. 9625-9634.
28. Wagner, T.A., J. L. Mckernan, N. H. Tobin, K. A. Tapia, J. I. Mullins and L. M. Frenkel., *An increasing proportion of monotypic HIV-1 DNA sequences during antiretroviral treatment suggest proliferation of HIV-infected cells*. J Virol, 2013. **87**: p. 1770-1778.
29. Mandarelli, F.X.W., L. Su, F. R. Simonetti, W. Shao, S. Hill, J. Spindler, A. L. Ferris, J. W. Mellors, M. F. Kerney, et al., *HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells*. Science, 2014. **345**: p. 179-183.
30. Wagner, T.A., S. McLaughlin, K. Garg, C. Y. Cheung, B.B. Larsen, S. Styrchak, H. C. Huang, P.T. Edlefsen, J. I. Mullins and L. M. Frenkel, *HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection*. Science, 2014. **345**: p. 570-573.
31. Schöder, A.R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J.R. Ecker, and F. Bushman., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspot*. Cell, 2002. **110**: p. 521-529.
32. Piatak, J.M., et al., *High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR*. Science, 1993. **259**: p. 1749-54.
33. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E., and Picker, L. J. , *Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys*. . Nat Med 2006. **12**(3): p. 289-95.
34. Pilgrim, A.K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., and A.S. Fauci, and Montefiori, D. C. , *Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection*. J Infect Dis, 1997. **176**(4): p. 924-32.

35. Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Peffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., and B.H. Hahn, Oldstone, M. B. A., and Shaw, G. M. , *Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary demonstrated by rapid selection of CTL escape virus*. Nature Medicine 1997. **3**(205-211.).
36. Jones, N.A., Wei, X., Flower, D. R., Wong, M., Michor, F., Saag, M. S., Hahn, B. H., Nowak, M. A., and G.M. Shaw, and Borrow, P. , *Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from the Primary CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte Response*. . J. Exp. Med 2004. **200**(10): p. 1243-1256.
37. Mellors, J.W., et al, *Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion*. Ann Intern Med, 1995. **122**: p. 573-579.
38. Mellors, J.W., et al., *Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma*. Science, 1996. **272**(5265): p. 1167-70.
39. Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A. T. and *Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS*. Nature 1993. **362**: p. 359-362.
40. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., and D.P. Kotler, and Fauci, A. S. , *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 1993. **362**: p. 355-358.
41. Piatak, J.M., Saag, M. S., Yang, L. C., Clark, S. J., Kappes, J. C., Luk, K. C., Hahn, B. H., Shaw, G. and a.L. M., J. D. , *High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR*. Science, 1993. **259**: p. 1749-54.
42. Perelson, A.S., et al., *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1582-6.
43. Silvestri, G., and Feinberg, M. B. , *Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection*. J Clin Invest 2003. **112**(6): p. 821-4.
44. Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifso, J. D., and S. Bonhoeffer, Nowak, M. A., Hahn, B. H., Saag, M. S., and Shaw, G. M. , *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection*. . Nature, 1995. **373**(117-122.).
45. Ho, D.D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. , *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. . Nature, 1995. **373**: p. 123-126.
46. Gange, S.J., et al., *Longitudinal patterns of HIV type 1 RNA among individuals with late disease progression*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(13): p. 1223-9.
47. Hubert, J.B., et al., *Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group*. Aids, 2000. **14**(2): p. 123-31.
48. Lyles, C.M., et al., *Longitudinal human immunodeficiency virus type 1 load in the italian seroconversion study: correlates and temporal trends of virus load*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1018-24.
49. O'Brien, T.R., Rosenberg, P. S., Yellin, F., and Goedert, J. J. , *Longitudinal HIV-1 RNA levels in a cohort of homosexual men*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **18**(2): p. 155-61.
50. Lang, W., et al., *Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1989. **2**(1): p. 63-9.
51. Rodes, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J. M., Jimenez, V., Wrin, T., and S. Bassani, and Soriano, V. , *Differences in disease progression in a cohort of long term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection*. Aids, 2004. **18**(8): p. 1109-16.

52. Lefrere, J.J., Morand-Joubert, L., Mariotti, M., Bludau, H., Burghoffer, B., Petit, J. C., and Roudot- and F. Thoraval, *Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection.* . Blood, 1997. **90**(3): p. 1133-40.
53. Goudsmit, J., Bogaards, J. A., Jurriaans, S., Schuitemaker, H., Lange, J. M., Coutinho, R. A., and and G.J. Weverling, *Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia.* Aids 2002. **16**(5): p. 791-3.
54. Kelleher., M.L.M.a.A., *Acutely dysregulated, chronically disable by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection.* Immunology and Cell Biology., 2007. **85**: p. 6-15.
55. Haynes, B.F., G. Pantaleo, and A.S. Fauci, *Toward an Understanding of the Correlates of Protective Immunity to HIV Infection.* Science, 1996. **271**: p. 324-327.
56. Hendriks, J.C., Medley, G. F., van Griensven, G. J., Coutinho, R. A., Heisterkamp, S. H., and van and H.A. Druten, *The treatment-free incubation period of AIDS in a cohort of homosexual men.* . Aids 1993. **7**(2): p. 231-9.
57. Bacchetti, P., and Moss, A. R. , *Incubation period of AIDS in San Francisco.* . Nature, 1989. **338**(6212): p. 251-3.
58. Muñoz, A., Wang, M.-C., Bass, S., Taylor, J. M. G., Kingsley, L. A., Chmiel, J. S., Polk, B. F., and and T.M.A.C.S. Group, *Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)-Free Time After Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Seroconversion in Homosexual Men.* American. Journal of Epidemiology 1989. **130**: p. 530-9.
59. Bello, G., et al., *A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population.* J Gen Virol, 2005. **86**(2): p. 355-364.
60. Buchbinder, S.P., et al., *Long-term HIV-1 infection without immunologic progression.* Aids, 1994. **8**(8): p. 1123-8.
61. Keet, I.P., et al., *Characteristics of long-term asymptomatic infection with human immunodeficiency virus type 1 in men with normal and low CD4+ cell counts.* J Infect Dis, 1994. **169**(6): p. 1236-43.
62. Lefrere, J.J., et al., *Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection.* Blood, 1997. **90**(3): p. 1133-40.
63. Sheppard, H.W., et al., *The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels.* Aids, 1993. **7**(9): p. 1159-66.
64. Kate Poropatich and David J. Sulilvan, J., *Human Immunodeficiency Virus Tipe 1 Long-Term Non-Progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression.* J Gen Virol, 2011. **92**: p. 247-268.
65. Deeks, S.G., and Walker, B. D. , *Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy.* . Immunity 2007. **27**(3): p. 406-416.
66. Dyer, W.B., Zaunders, J. J., Yuan, F. F., Wang, B., Learmont, J. C., Geczy, A. F., Saksena, N. K., and D.A. McPhee, Gorry, P. R., and Sullivan, J. S. , *Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection.* Retrovirology, 2008. **5**: p. 112.
67. Hunt, P.W., *Natural control of HIV-1 replication and long-term nonprogression: overlapping but distinct phenotypes.* J Infect Dis, 2009. **200**(11): p. 1636-8.
68. López-Galíndez, C., *HIV long-term non progressors elite controllers: an interplay between host, immune and viral factors.* Future Virology, 2019.
69. Okulicz, J.F., Marconi, V. C., Landrum, M. L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B.,, et al., *Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term*

- nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study.* . J Infect Dis, 2009. **200**(11): p. 1714-23.
70. Sandonís, V., *Evolución del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en pacientes no progresores con virus ancestrales.* 2010, Uniiversidad de Alcalá de Henares.
 71. Sandonis, V., Casado, C., Alvaro, T., Pernas, M., Olivares, I., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, and a.L.-G. J., C. , *A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs.* . Virology 2009. **391**(1): p. 73-82.
 72. Bailey, J.R., O'Connell, K., Yang, H.-C., Han, Y., Xu, J., Jilek, B., Williams, T. M., Ray, S. C., and R.F. Siliciano, and Blankson, J. N. , *Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Patient Who Developed AIDS to an Elite Suppressor.* 2008 **Vol. 82**: p. 7395-7410.
 73. Guowei Fang, H.B., Colombe Chappey, Sarah Rowland-Jones, Aloise Visosky, Chih-Hsiung Chen, Timothy Moran, Laura Townsend, Melanie Murray and Barbara Weiser., *Analysis of Transition from Long-Term Nonprogressive to Progressive Infection Identifies Sequences that May Attenuate HIV Type 1.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(15): p. 1395-1404.
 74. Leon A., P.I., Ruiz-Mateos E, Benito JM, Leal M, Lopez-Galindez C, Rallon N, Alcami J, Lopez-Aldeguer J, Viciano P, Rodriguez C, Grau E, Iribarren J, Gatell JM, Garcia F., *Rate and predictors of progression in elite and viremic HIV-1 controllers.* Aids, 2016. **15**(30): p. 1209-1220.
 75. Muttineni Radhakrishna, K.D., Ravilla Kondal Rao, Doodipala Mallikarjuna Reddy and Anand Kumar Kondapi., *Factors Associated with Conversion of Long-Term Non-Progressors to Progressors: A Prospective Study of HIV perinatally Infected Paediatric Survivors.* Indian J Med Res, 2013. **138**(Septiembre 2013): p. 322-328.
 76. Blaak, H., et al., *In vitro replication kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in relation to virus load in long-term survivors of HIV-1 infection.* J Infect Dis, 1998. **177**(3): p. 600-10.
 77. Deacon, N.J., et al., *Genomic Structure of an Attenuated Quasi Species of HIV-1 from a Blood Transfusion Donor and Recipients.* Science, 1995. **270**: p. 988-991.
 78. Kirchhoff, F., et al., *Brief Report: Absence of Intact nef Sequences in a Long-Term Survivor with Nonprogressive HIV-1 Infection.* New England Journal of Medicine, 1995. **332**: p. 228-232.
 79. Mariani, R., et al., *High Frequency of Defective nef Alleles in a Long-Term Survivor with Nonprogressive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection.* Journal of Virology, 1996. **70**: p. 7752-7764.
 80. Salvi, R., et al., *Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor.* J Virol, 1998. **72**(5): p. 3646-57.
 81. Wang, B., et al., *First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection.* Virology, 2003. **312**(1): p. 135-50.
 82. Iversen, A.K.N., et al., *Persistence of Attenuated rev Genes in a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Asymptomatic Individual.* Journal of Virology, 1995. **69**: p. 5743-5753.
 83. Chen J, T.N., Sauter D, et al. , *Modest Attenuation of HIV-1 Vpu Alleles Derived from Elite Controller Plasma.* . PLoS ONE. , 2015. **10**((3)).
 84. Shioda, T., et al., *In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120: association of V2 extension with slow disease progression.* J Virol, 1997. **71**(7): p. 4871-81.
 85. Wang, B., et al., *HIV-1 strains from a cohort of American subjects reveal the presence of a V2 region extension unique to slow progressors and non-progressors.* Aids, 2000. **14**(3): p. 213-23.
 86. Phillips, R.E., et al., *Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition.* Nature, 1991. **354**: p. 453-459.

87. Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. Journal of Virology, 1994. **68**: p. 6103-6110.
88. Soudeyns, H., et al., *Selective pressure exerted by immunodominant HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses during primary infection drives genetic variation restricted to the cognate epitope*. Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3629-35.
89. Goulder, P.J.R., et al., *Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS*. Nature Medicine, 1997. **3**: p. 212-217.
90. Koenig, S., et al., *Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression*. Nat Med, 1995. **1**(4): p. 330-6.
91. Price, D.A., et al., *Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**: p. 1890-1895.
92. Singh, M.K., et al., *A long-term follow-up of an HIV type 1-infected patient reveals a coincidence of Nef-directed cytotoxic T lymphocyte effectors and high incidence of epitope-deleted variants*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(13): p. 1265-71.
93. Allen, T.M., et al., *Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 386-90.
94. O'Connor, D.H., et al., *Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 493-9.
95. Evans, D.T., et al., *Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1270-6.
96. Watkins, P.J.R.G.a.D.I., *HIV and SIV CTL Escape: Implications for Vaccine Design*. Nat Rev Immunology, 2004. **4**: p. 630-640.
97. Martinez-Picado, J., et al., *Fitness Cost of Escape Mutations in p24 Gag in Association with Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1*. J. Virol., 2006. **80**(7): p. 3617-3623.
98. M. Huber, A.T., *Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond*. Journal of Internal Medicine, 2007. **262**: p. 5-25.
99. Arendrup, M., et al., *Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1992. **5**(3): p. 303-7.
100. Beaumont, T., et al., *Reversal of human immunodeficiency virus type 1 IIB to a neutralization-resistant phenotype in an accidentally infected laboratory worker with a progressive clinical course*. J Virol, 2001. **75**(5): p. 2246-52.
101. Schreiber, M., et al., *Loss of antibody reactivity directed against the V3 domain of certain human immunodeficiency virus type 1 variants during disease progression*. Journal of General Virology, 1996. **77**: p. 2403-2414.
102. Tsang, M.L., et al., *Neutralizing antibodies against sequential autologous human immunodeficiency virus type 1 isolates after seroconversion*. J Infect Dis, 1994. **170**(5): p. 1141-7.
103. Richman, D.D. and S.A. Bozzette, *The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression*. Journal of Infectious Diseases, 1994. **169**: p. 968-974.
104. Wei, X., et al., *Antibody neutralization and escape by HIV-1*. Nature, 2003. **422**(6929): p. 307-12.
105. Smith, D.M., et al., *Lack of neutralizing antibody response to HIV-1 predisposes to superinfection*. Virology, 2006. **355**(1): p. 1-5.
106. Pernas M, S.-M.V., Casado C, Merino-Mansilla A, Olivares i, Yuste E, Lopez-Galindez C., *HIV-1 Dual Infected LTNP-EC Patients Developed an Unexpected Antibody Cross-Neutralizing Activity*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. 1-14.

107. Carrington, M., Nelson, G. W., Martin, M. P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J. J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., and O'Brien, S. J. , *HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage*. Science, 1999. **283**(5408): p. 1748-52.
108. Migueles, S.A., Sabbaghian, M. S., Shupert, W. L., Bettinotti, M. P., Marincola, F. M., Martino, L., and C.W. Hallahan, Selig, S. M., Schwartz, D., Sullivan, J., and Connors, M. , *HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors*. . Proc Natl Acad Sci U S A 2000. **97**(6): p. 2709-14.
109. Cohen, O.J., A. Kinter, and A. S. Fauci, *Host factors in the pathogenesis of HIV disease*. Immunol. Rev., 1997. **159**: p. 31-48.
110. Hogan, C.M., and S. M. Hammer., *Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics*. Ann Intern Med, 2001. **134**: p. 978-96.
111. Hendel, H., S. Caillat-Zucman, H. Lebuane, M. Carrington, S. O'Brien, J. M. Andrieu, F. Schachter, D. Zagury, J. Rappaport, C. Winkler, G. W. Nelson, and J. F. Zagury., *New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS*. J Immunol, 1999. **162**: p. 6942-6.
112. Pereyra, F., y cols., *The major genetics determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation*. Science, 2010. **330**(6010): p. 1551-1557.
113. Dean, M., et al., *Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the CCR5 Structural Gene*. Science, 1996. **273**: p. 1856-1862.
114. Huang, Y., et al., *The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression*. Nature Medicine, 1996. **2**: p. 1240-1243.
115. Eugen-Olsen, J., A. K. Iversen, P. Garret, U. Koppelhus, C. Pedersen, T. L. Benfield, A. M. Sorensen, T. Katzenstein, E. Dickmeiss, J. Gerstoft, P. Skinhoj, A. Svejgaard, J. O. Nielsen, and B. Hofmann., *Heterozygosity for a deletion in the CCR5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals*. Aids, 1997. **11**: p. 305-310.
116. Reynes, J., P. Portales, M. Segondy, V. Baillat, P. Andre, B. Reant, O. Avinens, G. Coudere, M. Benkirane, J. Clot, J. F. Eliaou, and P. Corbeau., *CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1*. J Infect Dis, 2000. **181**: p. 927-32.
117. Gero Hütter, M.D., Daniel Nowak, M. D., Maximilian Mossner, B. S., Susane Ganepola, M. D., Arne Mübig, M. D., Kristina Allers, Ph. D., Thomas Schneider, M. D., Ph. D., Jörg Hofmann, Ph. D., Claudia Kücherer, M- D., Olga Blau, M. D., Igor W. Blau, M. D., Wolf K. Hofmann, M.D., and Eckhard Thiel, M. D., *Long-Term Control of HIV-1 by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation*. N Engl J Med, 2009. **360**: p. 692-698.
118. Ravindra K. Gupta, S.s.-J., Laura E. McCoy, Hoi Ping Mok, Dimitra Peppas, Maria Salgado, Javier Martínez-Picado, Monique Nijhuis, Annemarie M. J. Wensing, Helen Lee, Paul Grant, Eleni Nastouli, Jonathan Lambert, Matthew Pace, Fanny Salasc, Christopher Monit, Andrew J. Innes, Luke Muir, Laura Walters, John Frater, Andrew M. L. Lever, Simon G. Edwards, Ian H. Gabriel and Eduardo Olavarria., *HIV-1 remission following CCR5 Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation*. Nature, 2019. **568**: p. 244-248.
119. Mansky, L.M., and Temin, H. M. , *Lower In Vivo Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 than That Predicted from the Fidelity of Purified Reverse Transcriptase*. . Journal of Virology 1995. **69**: p. 5087-5094.
120. Mansky, L.M., *Forward Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in a T Lymphoid Cell Line*. . AIDS Research and Human Retroviruses 1996 **12**(307-314).

121. Jetzt, A.E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D., and Dougherty, J. P., *High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1234-40.
122. Clavel, F., M. D. Hoggan, R. L. Willey, K. Strebel, M. A. Martin, and R. Repaske., *Genetic Recombination of Human Immunodeficiency Virus*. J Virol, 1989. **63**: p. 1455-1459.
123. Hu, W.S., and H. M. Temin., *Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**: p. 1556-60.
124. Pernas, M., Casado, C., Fuentes, R., Perez-Elias, M. J., and Lopez-Galindez, C. , *A dual superinfection and recombination within HIV-1 subtype B 12 years after primoinfection*. . J Acquir Immune Defic Syndr 2006. **42**: p. 12-18.
125. Buttò, S., Argentini, C., Mazzella, A. M., Iannotti, M. P., Leone, P., Leone, P., Nicolosi, A., and Rezza, G. , *Dual infection with different strains of the same HIV-1 subtype*. . Aids 1997. **11**(5): p. 694-6.
126. Diaz, R.S., E. C. Sabino, A. Mayer, J. W. Mosley, and M. P. BUSch., *Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. The Transfusion Safety Study Group*. J Virol, 1995. **69**: p. 3273-81.
127. Sala, M., E. Pelletier, and Wain-Hobson., *HIV-1 gp 120 Sequences from a Doubly Infected Drug User*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**: p. 653-655.
128. Zhu, T., N. Wang, A. Carr, S. Wolinsky, and D. D. Ho., *Evidence for coinfection by multiple strains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype B in an acute seroconverter*. J Virol, 1995. **69**: p. 1324-1327.
129. Casado, C., Pernas, M., Alvaro, T., Sandonis, V., Garcia, S., Rodriguez, C., Romero, J. D., Grau, E., Ruiz, L., and Lopez-Galindez, C. , *Coinfection and Superinfection in Patients with Long-Term, Nonprogressive HIV-1 Disease*. . J Infect Dis, 2007. **196**(6): p. 895-9.
130. Fultz PN, S.A., Greene CR, Butler D, Swenson RB, McClure HM., *Superinfection of a chimpanzee with a second strain of human immunodeficiency virus*. J.Virol, 1987. **61**: p. 4026-9.
131. Ramos, A., et al., *Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7444-52.
132. Jost, S., et al., *A patient with HIV-1 superinfection*. N Engl J Med, 2002. **347**(10): p. 731-6.
133. Peeters, M., *Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic*. Human Retrovirus and AIDS, 2000: p. I-39-54.
134. Robertson, D.L., et al., *HIV-1 nomenclature proposal [letter]*. Science, 2000. **288**(5463): p. 55-6.
135. Altfeld, M., et al., *HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus*. Nature, 2002. **420**(6914): p. 434-9.
136. Koelsch, K.K., et al., *Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus*. Aids, 2003. **17**(7): p. F11-6.
137. Gottlieb, G.S., et al., *Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression*. Lancet, 2004. **363**(9409): p. 619-22.
138. Chakraborty, B., et al., *Can HIV-1 superinfection compromise antiretroviral therapy?* Aids, 2004. **18**(1): p. 132-4.
139. Yerly, S., et al., *HIV-1 co/super-infection in intravenous drug users*. Aids, 2004. **18**(10): p. 1413-21.
140. Manigart, O., et al., *HIV-1 superinfections in a cohort of commercial sex workers in Burkina Faso as assessed by an autologous heteroduplex mobility procedure*. Aids, 2004. **18**(12): p. 1645-51.

141. McCutchan, F.E., et al., *In-Depth Analysis of a Heterosexually Acquired Human Immunodeficiency Virus Type 1 Superinfection: Evolution, Temporal Fluctuation, and Intercompartment Dynamics from the Seronegative Window Period through 30 Months Postinfection*. J. Virol., 2005. **79**(18): p. 11693-11704.
142. Chohan, B., et al., *Evidence for frequent reinfection with human immunodeficiency virus type 1 of a different subtype*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10701-8.
143. Plantier, J.C., et al., *HIV-1 group M superinfection in an HIV-1 group O-infected patient*. Aids, 2004. **18**(18): p. 2444-6.
144. Gottlieb, G.S., et al., *HIV type 1 superinfection with a dual-tropic virus and rapid progression to AIDS: a case report*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(4): p. 501-9.
145. Maria Pernas, C.C., Virginia Sandonis, Carolina Arcones, Carmen Rodriguez, Ezequiel Ruiz-Mateos, Eva Ramirez de Arellano, Norma Rallon, Margarita del Val, Eulalia Grau, Mariola Lopez-Vazquez, Manuel Leal, Jorge del Romero and Cecilio López Galindez, *Prevalence of HIV-1 Dual Infection in Long-Term Nonprogressor-Elite Controllers*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **0**(0): p. 1-7.
146. Gojobori, T., E.N. Moriyama, and M. Kimura, *Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(24): p. 10015-8.
147. Li, W.H., M. Tanimura, and P. M. Sharp., *Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequence*. Mol Biol Evol, 1988. **5**: p. 313-30.
148. Karlsson, A.C., S. Lindback, H. Gaines, and A. Sonnerborg., *Reappearance of founder virus sequence in human immunodeficiency virus type 1-infected patients*. J Virol, 1999. **73**: p. 6191-6.
149. Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., and Bhattacharya, T. , *Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains [see comments]*. Science 2000. **288**(5472): p. 1789-96.
150. Leitner, T. and J. Albert, *The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history [see comments]*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10752-7.
151. Shankarappa, R., et al., *Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10489-502.
152. Pedroza Martins, L., N. Chenciner, and S. Wain-Hobson, *Complex Intrapatient Sequence Variation in the V1 and V2 Hypervariable Regions of the HIV-1 gp120 Envelope Sequence*. Virology, 1992. **191**: p. 837-845.
153. Korber, B., J. Theiler, and S. Wolinsky., *Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1*. Science, 1998. **280**: p. 1868-71.
154. Sato, H., T. Shiino, N. Kodaka, K. Taniguchi, Y. Tomita, K. Kato, T. Miyakuni, and Y. Takebe., *Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp 120 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family*. J Virol, 1999. **73**: p. 3551-9.
155. Ganeshan, S., et al., *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genetic Evolution in Children with Different Rates of Development of Disease*. Journal of Virology, 1997. **71**: p. 663-677.
156. Wolfs, T.F.W., et al., *Evolution of sequences encoding the principal neutralization epitope of human immunodeficiency virus 1 is host dependent, rapid, and continuous*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**: p. 9938-9942.
157. Zhang, L., R. S. Díaz, D. D. Ho, J. W. Mosley, M. P. Busch, and A. Meyer., *Host-Specific Driving Force in HUMAN Immunodeficiency Virus Type 1 Evolution In Vivo*. J Virol, 1997. **71**: p. 2555-2561.
158. Myers, G., et al., *Human retroviruses and AIDS 1996: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. 1996, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory: Los Alamos, New Mexico.

159. Korber, B., B. Hahn, B. Foley, J. W. Mellors, T. Leitner, G. Meyers, F. McCutchan, and C. Kuiken., *Human retrovirus and AIDS: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. 1997, Los Alamos, New Mexico.: Los Alamos National Laboratory.
160. Robertson, D.L., P. M. Sharp, F. E. McCutchan, and J. I. Mullins., *Recombination in HIV-1*. *Nature*, 1995. **374**: p. 124-125.
161. Yamaguchi, J., Vallari, A. S., Swanson, P., Bodelle, P., Kaptue, L., Ngansop, C., Zekeng, L., Gurtler, L. G., Devare, S. G., and Brennan, C. A. , *Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters*. . *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002. **18**(4): p. 269-82.
162. Brown, A.L., and P. Monaghan., *Evolution of the structural proteins of human immunodeficiency virus: selective constraints on nucleotide substitution*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1988. **4**: p. 399-407.
163. Seibert, S.A., C. Y. Howell, M. K. Hughes, and A. L. Hughes., *Natural selection on the gag, pol, and env genes of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)*. *Mol Biol Evol*, 1995. **12**: p. 803-13.
164. Sala, M., and S. Wain-Hobson., *Are RNA viruses adapting or merely changing?* *J. Mol. Evol.*, 2000. **51**: p. 12-20.
165. Zhu, T., et al., *An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic*. *Nature*, 1998. **391**: p. 594-597.
166. Casado, C., et al., *Genetic analysis of HIV-1 samples from Spain*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2000. **23**(1): p. 68-74.
167. Robbins, K.E., et al., *U.s. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains*. *J Virol*, 2003. **77**(11): p. 6359-66.
168. Lukashov, V.V., and J. Goudsmit., *Recent evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1 subtype B: reconstruction of epidemic onset based sequence distance to the common ancestor*. *J. Mol. Evol.*, 2002. **54**: p. 680-91.
169. Fisher, A.G., Ensoli, B., Looney, D., Rose, A., Gallo, R. C., Saag, M. S., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Wong-Staal, F. , *Biologically diverse molecular variants within a single HIV-1 isolate*. . *Nature* 1988. **334**(6181): p. 444-7.
170. Delassus, S.C., R. Wain-Hobson, S., *Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef and Long Terminal Repeat Sequences Over 4 Years in vivo and in vitro*. *J. Virol*, 1991. **65**: p. 225-231.
171. Simmonds, P., et al., *Discontinuous Sequence Change of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 env Sequences in Plasma Viral and Lymphocyte-Associated Proviral Populations In Vivo; Implications for Models of HIV Pathogenesis*. *Journal of Virology*, 1991. **65**: p. 6266-6276.
172. Balfe, P., P. Simmonds, C. A. Ludlam, J. O. Bishop, and A. J. L. Brown., *Concurrent Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Patients Infected from the Same Source: Rate of Sequence Change and Low Frequency of Inactivating Mutations*. *J Virol*, 1990. **64**.
173. Meyerhans, A., R. Cheynier, J. Albert, M. Seth, S. Kwok, J. Sninsky, L. Morfeldt-Manson, B. Asjo, and S. Wain-Hobson., *Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations*. *Cell*, 1989. **58**: p. 901-10.
174. Simmonds, P., P. Balfe, C. A. Ludlam, J. O. Bishop, and A. J. Leigh-Brown., *Analysis of Sequence Diversity in Hypervariable Regions of the External Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1*. *J Virol*, 1990. **64**: p. 5840-5850.
175. Eigen, M., *Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules*. *Naturwissenschaften*, 1971. **58**(10): p. 465-523.
176. Domingo, E., et al., *Basic concepts in RNA virus evolution*. *The FASEB Journal*, 1996. **10**: p. 859-863.

177. Holland, J. and E. Domingo, *Origin and evolution of viruses*. Virus Genes, 1998. **16**(1): p. 13-21.
178. Holland, J.J., De La Torre, J. C., and Steinhauer, D. A. , *RNA virus populations as quasispecies*. Curr Top Microbiol Immunol 1992. **176**: p. 1-20.
179. Wain-Hobson, S., *Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in vivo and ex vivo*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **176**: p. 181-93.
180. Domingo, E., and J. J. Holland., *RNA Virus Mutations and Fitness for Survival*. Annu. Rev. Microbiol., 1997. **51**: p. 151-178.
181. Esteban Domingo, C.P., *Quasispecies and virus*. European Biophysics Journal, 2018. **47**: p. 443-457.
182. Delwart, E.L., H. W. Sheppard, D. Walker, J. Goussmit, and J. I. Mullins., *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Evolution In Vivo Tracked by DNA Heteroduplex Mobility Assays*. J Virol, 1994. **68**: p. 6672-6683.
183. Karlsson, A.C., S. Lindback, H. Gaines, and A. Sonnerborg., *Characterization of the viral population during primary HIV-1 infection*. Aids, 1998. **12**: p. 839-47.
184. McNearney, T., Z. Hornickova, R. Markham, A. Birdwell, M. Arens, A. Saah, and L. Ratner., *Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequences heterogeneity to stage of disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**: p. 10247-51.
185. Pang, S., Y. Shlesinger, E. S. Daar, T. Moudgil, D. D. Ho, and I. S. Y. Chen., *Rapid generation of sequence variation during primary HIV-1 infection*. Aids, 1992. **6**: p. 453-460.
186. Shankarappa, R., J. B. Margolick, S. J. Gange, A. G. Rodrigo, C. R. Rinaldo Jr, M. C. Gorry, J. I. Mullins, P. L. Nara, and G. D. Ehrlich., *Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Sequences in Infected Individuals with Differing Disease Progression Profiles*. Virology, 1998. **241**: p. 251-259.
187. Wolfs, T.F., G. Zwart, M. Bakker, and J. Goudsmit., *HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission*. Virology, 1992. **189**: p. 103-10.
188. Delwart, E.L., H. Pang, H. W. Sheppard, D. Wolpert, A. U. Neumann, B. Korber, and J. I. Mullins., *Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS*. J Virol, 1997. **68**: p. 6672-6683.
189. Montefiori, D.C., *Evaluating Neutralizing Antibodies Against HIV, SIV, SHIV in Luciferase Reporter Gene Assays*. Current protocols in Immunology, 2004. **S-64**(12.11.1-12.11.17).
190. Domingo, E., et al., *Viral Quasispecies and Fitness Variations*, in *Origin and Evolution of Viruses*, E. Domingo, R. Webster, and J. Holland, Editors. 1999, Academic Press. p. 141-161.
191. Domingo, E., L. Menéndez-Arias, and J.J. Holland, *RNA virus fitness*. Reviews in Medical Virology, 1997. **7**: p. 87-96.
192. Deeks, S.G., *International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. **26 Suppl 1**: p. S25-33.
193. Boom R, S.C.J., Salimans M M, Jansen C L, Wertheim-van Dillen P M, van der Noordaa J, *Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acid*. J Clinical Microbiology, 1990. **28**(3): p. 495-503.
194. Green MR, S., *A Laboratory Manual Second Edition*. J Molecular Cloning, 1989: p. 2028.
195. Koichiro Tamura, G.S., Daniel Peterson, Alan Filipski and Sudhir Kumar, *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(12): p. 2725-2729.
196. Akaike, H., *A new look at the statistical model identification*. IEEE Transactions on Automatic Control, 1974. **19**: p. 716-723.

197. Posada, D. and T.R. Buckley, *Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests.* Syst Biol, 2004. **53**(5): p. 793-808.
198. Posada, D. and K.A. Crandall, *MODELTEST: testing the model of DNA substitution.* Bioinformatics, 1998. **14**(9): p. 817-8.
199. Guindon, S., et al., *PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W557-9.
200. Gascuel, O., *BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data.* Mol Biol Evol, 1997. **14**(7): p. 685-95.
201. Sergei Kosakovsky Pond, S.V.M., *Site-to-site variation of synonymous substitution rates.* Molecular Biology and Evolution, 2005. **22**(12): p. 2375-2385.
202. Tamura K, S.G., Peterson D, Filipiski A, and Kumar S., *MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.* Mol Biol Evol, 2013. **30**: p. 2725-2729.
203. Michael, N.L., Chang, G., d'Arcy, L. A., Ehrenberg, P. K., Mariani, R., Busch, M. P., Bix, D. L., Schwartz, D. H., *Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1- infected long-term survivor lacking recoverable virus.* J Virol, 1995. **69**(7): p. 4228-36.
204. Concepción Casado, S.C., Andri Rauch, Raquel Martinez, Huldrych F. Günthard, Soledad García, Carmen Rodriguez, Jorge del Romero, Amalio Telenti and Cecilio López-Galíndez., *Host and Viral Genetic Correlates of Clinical Definitions of HIV-1 Disease Progression.* Plos One, 2010. **5**(6): p. 1-6.
205. Paroli, M., et al., *The immunology of HIV-infected long-term non-progressors--a current view.* Immunol Lett, 2001. **79**(1-2): p. 127-9.
206. Bello, G., et al., *Co-existence of recent and ancestral nucleotide sequences in viral quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 patients.* J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 2): p. 399-407.
207. Korber, B.T., P.M. Sharp, and D.D. Ho, *Dating the origin of HIV-1 subtypes.* Nature, 1999. **400**: p. 326.
208. Bello, G., et al., *Lack of temporal structure in the short term HIV-1 evolution within asymptomatic naive patients.* Virology, 2007.
209. Jasminka Sterjovski, M.J.C., Michael Roche, Anne Ellett, William Farrugia, Steven L. Wesselingh, Anthony L. Cunningham, Paul A. Ramsland and Paul R. Gorry, *CD4-binding site alterations in CCR5-using HIV-1 envelopes influencing gp120-CD4 interactions and fusogenicity.* Virology, 2011. **410**: p. 418-428.
210. Dragic, E.G.C.a.T., *The Crown and Stem of the V3 Loop play Distinct Roles in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Interactions with the CCR5 Coreceptor.* Journal of Virology, 2002. **76**(17): p. 8953-8957.
211. Kimdar Sherefa Kemal, P., Tara Beattie, PhD, Tao Dong, PhD, Barbara Weiser, MD, Rupert Kaul, MD, PhD, Carla Kuiken, PhD, Julian Sutton, PhD, Dorothy Lang, PhD, Hongbing Yang, PhD, Yan Chun Peng, MS, Ronald Collman, MD, Sean Philpott, PhD, Sarah Rowland-Jones, MA, DM, and Harold Burger, MD, PhD., *Transition From Long-Term Nonprogression to HIV-1 Disease Associated With Escape From Cellular Immune Control.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2008. **48**: p. 8.
212. Nesrina Imami, S.J.W., Nathali Grageda and Anna A. Herasimtschuck, *Long-term non-progressive and broad HIV-1-specific proliferative T-cell responses.* Frontiers in Immunology, 2013. **4**: p. 16.
213. Bello, G., Casado, C., Sandonis, V., Alvaro-Cifuentes, Tamara., Dos Santos, C. A., Garcia, S., Rodriguez, C., Del Romero, J., Pilotto, J. H., Grinsztejn, B., Veloso, V. G., Morgado, M. G., and Lopez- Galindez, C. , *Plasma viral load threshold for sustaining intrahost HIV type 1 evolution. .* AIDS Res Hum Retroviruses 2007. **23**(10): p. 1242-50.

214. Casado, C.G., S. Rodriguez, C. del Romero, J. Bello, G. Lopez-Galindez, C., *Different evolutionary patterns are found within human immunodeficiency virus type 1-infected patients*. J Gen Virol, 2001. **82**(10): p. 2495-508.
215. Marion Cornelissen, A.O.P., Marlous L. Grijzen, Fokla Zorgdrager, Margreet Bakker, Petra Blom, Jan M. Prins, Suzanne Jurriaans, and Antoinette C. van der Kuyl, *HIV-1 Dual Infection Is Associated With Faster CD4+ T-Cell Decline in a Cohort of Men With Primary HIV Infection*. Clin Infect Dis, 2001: p. 9.
216. Ngandu NK, S.K.M.P., Woodman Z, Martin D, Seoighe C., *Extensive purifying selection acting on synonymous sites in HIV-1 group M sequences*. J Virol, 2008. **5**(160).
217. Williamson, S., et al., *A statistical characterization of consistent patterns of human immunodeficiency virus evolution within infected patients*. Mol Biol Evol, 2005. **22**(3): p. 456-68.
218. Grenfell, B.T., et al., *Unifying the Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Pathogens* 10.1126/science.1090727. Science, 2004. **303**(5656): p. 327-332.
219. Wolinsky, S.M., Kunstman, K. J., Safrit, J. T., Koup, R. A., Neumann, A. U., and Korber, B. T., *Response: HIV-1 evolution and disease progression*. Science, 1996. **5289**: p. 1010-1011.
220. Concepción Casado, S.M.-H., Daniel Márquez-Arce, María Pernas, Silvia Marfil, Ferran Borrás-Grañada, Isabel Olivares, Romina Cabrera-Rodriguez, María-Soledad Valera, Laura de Armas-Rillo, Philippe Lemey, Julià Blanco, Agustín Valenzuela-Fernández, Cecilio López-Galíndez, *Viral Characteristics Associated with the Clinical Nonprogressor Phenotype Are Inherited by Viruses from a Cluster of HIV-1 Elite Controllers*. MBio, 2018. **9**(2): p. 1-18.
221. Kara G. Lassen, M.A.L., Justin R: Bailey, Samantha Johnston, Sandra Nguyen, Benhur Lee, Tom Chou, Robert F. Siliciano, Martin Markowitz, Eric J. Arts., *Elite Suppressor-Derived HIV-1 Envelope Glycoproteins Exhibit Reduced Entry Efficiency and Kinetics*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. 1-12.
222. Miura, T., Brockman, M. A., Schneidewind, A., Lobritz, M., Pereyra, F., Rathod, A., Block, B. L., Brumme, Z. L., Brumme, C. J., Baker, B., Rothchild, A. C., Li, B., Trocha, A., Cutrell, E., Frahm, N., Brander, C., Toth, I., Arts, E. J., Allen, T. M., and Walker, B. D. , *HLAB57/B*5801 Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Controllers Select for Rare Gag Variants Associated with Reduced Viral Replication Capacity and Strong Cytotoxic T Lymphocyte Recognition*, . J Virol, 2009. **83**(2743-2755).
223. Lassen KG, L.M., Bailey JR, et al., *Elite suppressors-derived HIV-1 envelope glycoproteins exhibit reduced entry efficiency and kinetics*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4).
224. Casado C, P.M., Sandonis V, Alvaro-Cifuenes T, Olivares I, Duentes R, Martinez-Prats L, Grau E, Ruiz L, Delgado R, Rodriguez C, del Romero J, Lopez-Galindez C., *Identification of a cluster of HIV-1 controllers infected with low replicating viruses*. PLoS One, 2013. **8**(10).
225. Blankson, J.N., et al., *Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2508-18.
226. Miura, T., Brockman, M. A., Brumme, C. J., Brumme, Z. L., Carlson, J. M., Pereyra, F., Trocha, A., M.M. Addo, Block, B. L., Rothchild, A. C., Baker, B. M., Flynn, T., Schneidewind, A., Li, and W. B., Y. E., Heckerman, D., Allen, T. M., and Walker, B. D., *Genetic Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Elite Controllers: Lack of Gross Genetic Defects or Common Amino Acid Changes*. J.Virol, 2008. **82**: p. 8422-8430.
227. Ryan M. Troyer, K.R.C., Awet Abraha, Erika Fraundorf, Dawn M. Moore, Randall W. Krzan, Zahra Toossi, Robert L. Colebunders, Mark A. Jensen, James I. Mullins,

- Guido Vanham, and Eric J Arts., *Changes in Immunodeficiency Virus Type 1 Fitness and Genetic Diversity during Disease Progression*. J of Virol, 2005. **79**: p. 9006-9018.
228. Christophe Fraser, K.L., Gabriel E. Leventhal, George Shirreff, T. Déirdre Hollingsworth, Samuel Alizon, Sebastian Bonhoeffer., *Virulence and Pathogenesis of HIV-1 Infection: An Evolutionary Perspective*. Science, 2014. **343**(6177).

8. ANEXO I.


```

110      120      130      140      150      160      170      180      190
7_1_13  FYCNSTQLFNSTWNVV-GTWNDTEGLNNTG---TTLPCRIKQLINMQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNITGLLLTRDGGNN---NNETEIFRP
7_3_3DL .....
7_3_4DL .....
7_3_25DL .....
7_2_2DL .....
7_2_5C .....
7_2_13DL .....
7_1_6 .....
7_3_18DL .....N-----
7_2_6DL .....N-----
7_3_22DL .....N-----K-----Q-----
7_1_17 .....R-----
7_1_19 .....
7_1_14 .....S.P.
7_2_41DL .....D---G-----K-----
7_2_40DL .....D-----GN-E.RS.G.S..D-----T-----S---DSKP.
7_1_15 .....N---G---RS..D---T-----S.P.
7_1_3 .....NSTWNA...REPS-ND---K-----I-----G...D.T--T.M.T.
7_2_1C .....A..SSTWNAS...PS-ND---K-----I-----E.T--T.T.
7_3_16DL .....NSTWNA...WPS-ND---K-----I-----D.T--T.I.T.
7_3_14DL .....A..SSTWNAS...PS-ND---K-----I-----E.T--T.T.
7_3_10DL .....D.....NSTWDA...KPS-ND---K-----T-----K.T--S.T.T.
7_1_1 .....A..AN-.R...SS-N---K-----TS--TS.P.
7_1_2 .....A..AN-.R...SS-N---K-----TS--TS.P.
7_1_4 .....A..AN-.R...SS-N---K-----TS--TS.P.
7_1_18 .....A..AN-.R...SS-N---K-----TS--TS.P.
7_1_11 .....A..AN-.R...SS-N---K-----TS--TS.P.
7_1_7 .....A..AN-.R...SS-N---K-----TS--TS.PG.
7_1_9 .....A..AN-.R...SS-N---K-----
7_2_5DL .....A..AN-...SS-ND---K-----DS--DSKP.
7_2_28DL .....A..AN-...SS-ND---K-----DS--DSKP.
7_2_2C .....A..AN-...SS-ND---K-----DS--DSKP.
7_2_31DL .....A..AN-...SS-ND---K-----DS--DSKP.
7_2_37DL .....A..AN-...SSDT---K-----T-----DS--DSKP.
7_3_1C .....A..AN-...SS-ND---K-----DS--DSKP.
7_3_11DL .....A..AN-...SS-ND---K-----DS--DSKP.
7_3_20DL .....A..AN-...SS-ND---K-----DS--DSKP.
7_3_6DL .....D.....AN-...ESS-K---TN.K-----T-----D.T--T.M.T.
7_1_20 .....D.....HGN-E.E...K.SS-N---K-----TS--KS.L.T.
7_1_21 .....D.....HGN-E.E...K.SS-N---K-----TS--KS.L.T.
7_1_16 .....D.....HGN-E.E...K.SS-N---K-----G.
7_3_15DL .....HAN-.RK.I.ESR-EE---N..K-----T-----E.T--T.T.T.
7_3_17DL .....HAN-.RK.I.ESG-EE---N..K-----T-----K.T--T.T.T.
7_1_10 .....HGN-E.E...K.SS-N---K-----TS--KS.P.
7_1_12 .....D.....HGN-E.E...K.SS-N---K-----TS--KS.L.T.
7_2_16DL .....D.....YGN-E.K.G...S..D-----P-----I.N..SK--S.S.
7_3_24DL .....D.....YSN-K.E.A.KRSS-N---K-----R-----R.K-----S.DS--DSTS.T.
7_3_9DL .....YAN-.KE...GESK-EK---N..K-----R-----T-----E.T--NTA.T.T.
7_3_CD4 .....YAN-.RKY.GESKEEN---K-----T-----E.T--NTN.T.T.
7_3_CD45 .....YAN-.RE...GESKEEN---K-----I-----TT.T.T.T.
7_2_39DL .....YAN-.RE...GESKEEN---K-----T-----E.TSTI.T.T.
7_3_7DL .....DNNTWNAD..WNS-..SDTTNTN..K-----T-----E.T--T.T.T.

```

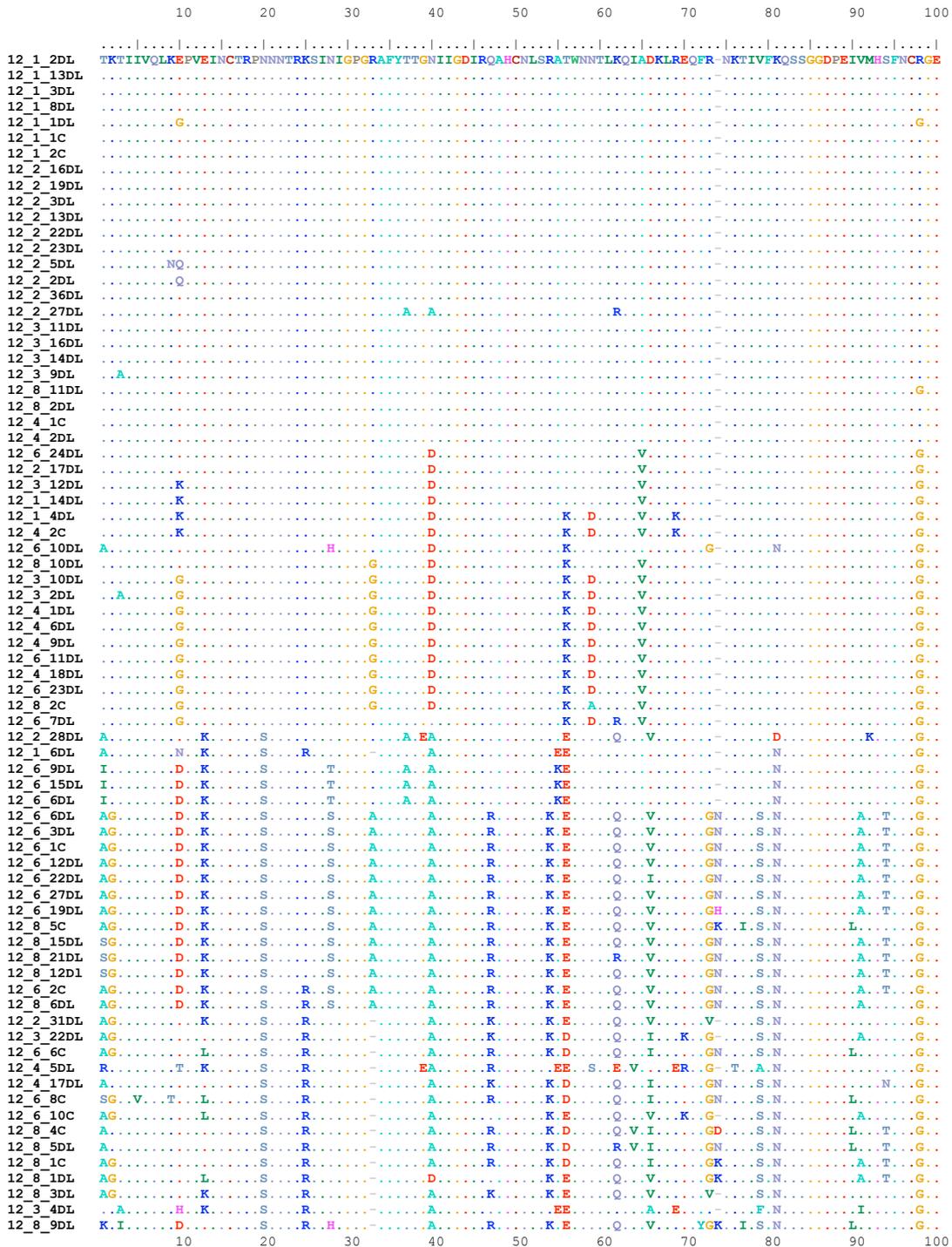


```

110      120      130      140      150      160      170      180      190
10_1_16 FFYCNLSQLFNSTWVPSST--WNGTWNITSNNNDSSITLPCRKQIINMWQEVGKAMYAPPTRGQISCSNITGLLLTRDGGKFNDS--TEIFRF
10_1_10
10_1_6
10_1_12
10_1_4
10_1_13
10_1_3
10_1_11
10_4_23DL
10_4_5DL
10_4_24DL
10_4_22DL
10_1_8
10_1_14
10_1_20
10_6_6C
10_7_1DL
10_4_17DL
10_4_4DL
10_1_17
10_6_10C
10_1_15
10_6_7DL
10_6_8DL
10_6_8C
10_7_1C
10_7_7DL
10_7_6DL
10_7_8DL
10_7_9DL
10_7_13DL
10_7_11DL
10_7_22DL
10_4_20DL
10_4_8DL
10_4_12DL
10_4_14DL
10_6_16C
10_7_20DL
10_1_18
10_6_25DL
10_6_4DL
10_7_4DL
10_4_13DL
10_4_18DL
10_4_9DL
10_4_2DL
10_6_13C
10_7_5DL
10_6_22DL
10_6_18DL
10_6_21DL
10_6_20DL
10_7_23DL
10_1_19
10_1_2
10_1_7
10_7_10DL
10_7_16DL
10_1_5
10_6_11DL
10_6_12DL
10_6_14DL
10_6_16DL
10_6_15C
10_6_14C
10_7_2C
10_7_3DL
10_7_14DL
10_4_11DL
10_4_21DL

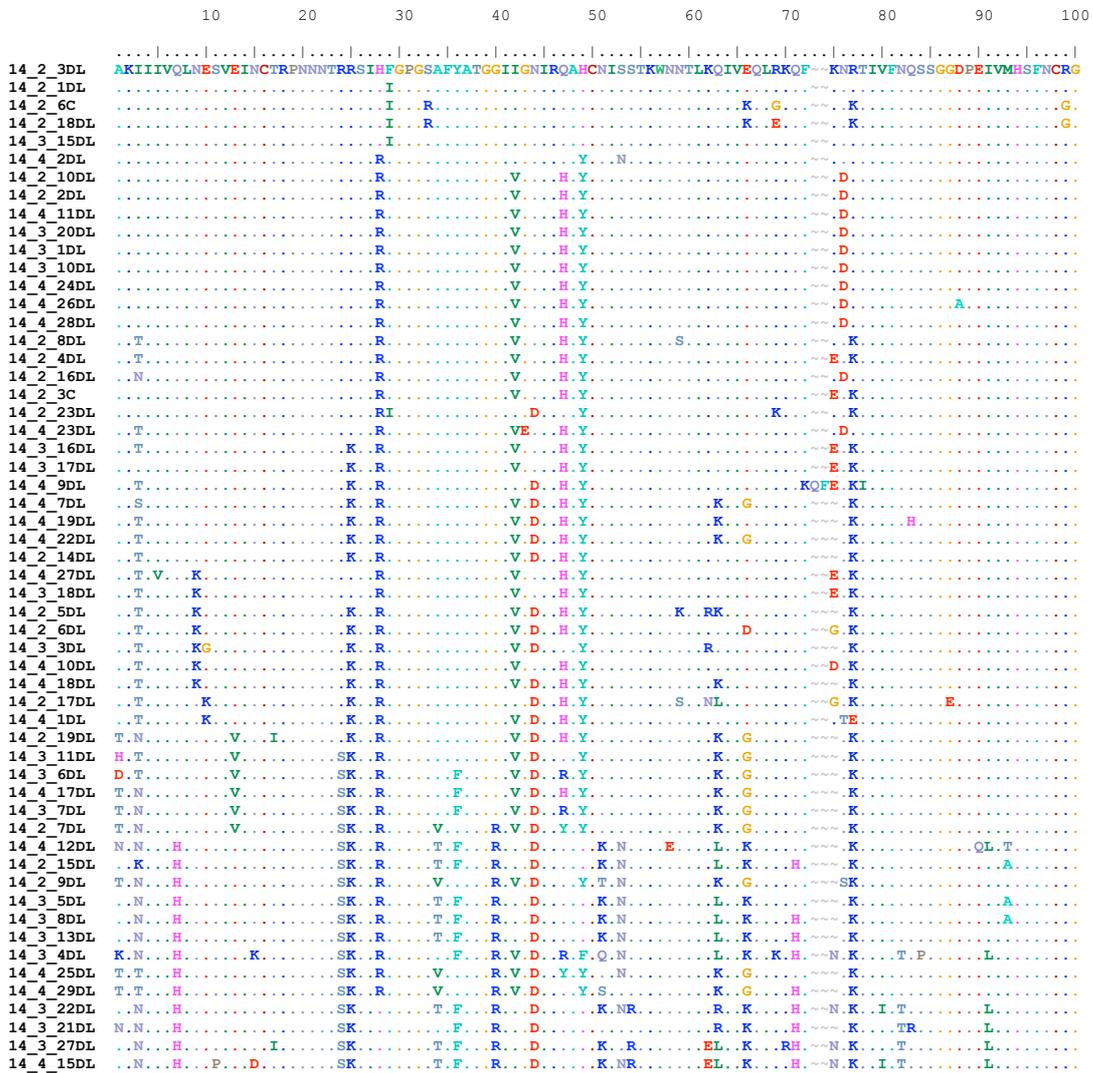
```

Alinamiento de las secuencias del virus LTNP 12.



12_2_9DL A.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_3_3DL A.A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_22DL A.....SI.....S.....E.T.....K.ED.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_2_34DL A...EK...SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_1_10DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_2_11DL A...LE...I.SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_1_3CSI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_2_38DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_3_17DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_3_23DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_3_3C A.....SSI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_3_19DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_3_20DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_3_4C A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_3_8C A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....I.N.....T.....G..
12_4_3DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_11DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_15DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_16DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_12DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_19DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_23DL AR.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_25DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_26DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_27DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_4_29DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_6_8DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_6_20DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_6_7C A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_8_3C A.....SI.....I.....H.....E.T.....G.....K.D.....VR.....K.....LG.....N.....T.....G..
12_8_16DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....G.....K.D.....VR.....K.....LG.....N.....T.....G..
12_8_17DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_8_19DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..
12_8_4DL A.....SI.....I.....H.....E.T.....K.D.....VR.....LG.....N.....T.....G..

Alineamiento de las secuencias del virus LTNP 14.

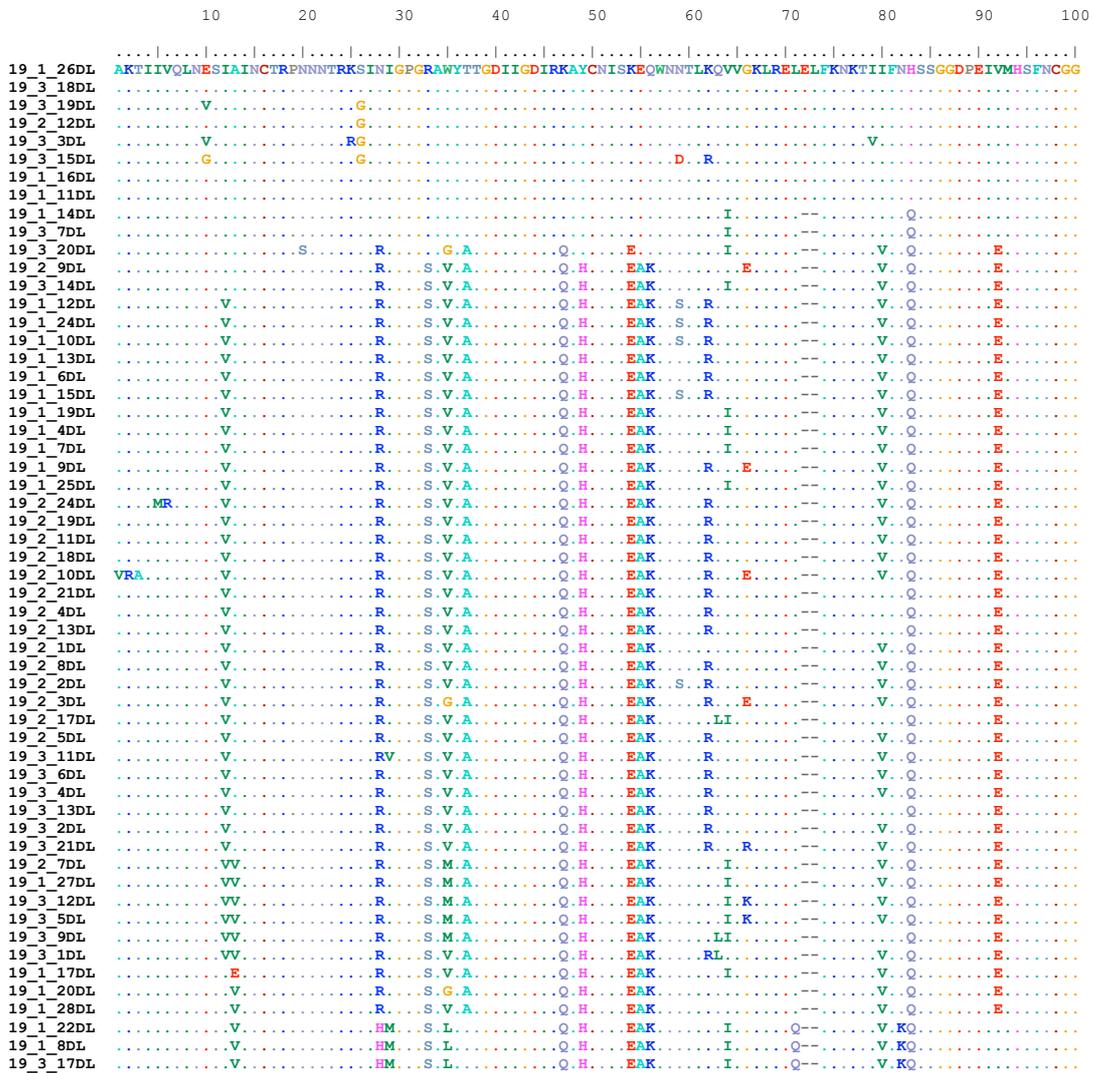


```

110      120      130      140      150      160      170      180      190
14_2_3DL  E F F Y C N S T K L F N S T W F P N N T W F G S N S T E E I I T L F C R I K Q I V N M W Q E V G K A M Y A P P I R G Q I N C S S Q I T G L L L T R D G G T N S S T E T D I F R P
14_2_1DL  .....G.....G.....K.....E.....
14_2_6C   .....G.....G.....K.....E.....
14_2_18DL .....D.....G.....K.....E.....
14_3_15DL .....R.....D.....K.....A.....N.....E.....L.....
14_4_2DL  .....R.....D.....E.....E.....
14_2_10DL .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_2_2DL  .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_4_11DL .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_3_20DL .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_3_1DL  .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_3_10DL .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_4_24DL .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_4_26DL .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_4_28DL .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_2_8DL  .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....G.....N.....E.....
14_2_4DL  .....T.....R.....D.....E.....H.....A.....T.....D.....E.....
14_2_16DL .....T.....R.....D.....E.....E.....
14_2_3C   .....T.....R.....D.....E.....L.....N.....D.....E.....
14_2_23DL .....D.....K.....E.....
14_4_23DL .....T.....R.....D.....E.....T.....E.....Q.....Y.....R.....R.....
14_3_16DL .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....G.....N.....E.....
14_3_17DL .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....S.....G.....D.....E.....
14_4_9DL  .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....G.....N.....E.....
14_4_7DL  .....T.....A.....G.....D.....L.....E.....F.....L.....N.....N.....G.....N.....E.....
14_4_19DL .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....N.....D.....T.....N.....N.....E.....
14_4_22DL .....T.....A.....G.....D.....L.....E.....F.....L.....N.....N.....G.....N.....E.....
14_2_14DL .....T.....G.....D.....E.....F.....L.....Y.....S.....G.....N.....E.....
14_4_27DL .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....G.....D.....N.....E.....
14_3_18DL .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....H.....A.....D.....N.....E.....
14_2_5DL  .....T.....A.....G.....D.....L.....E.....F.....I.....L.....N.....N.....T.....D.....N.....E.....
14_2_6DL  .....T.....R.....D.....R.....E.....F.....L.....N.....G.....N.....T.....I.....T.....E.....
14_3_3DL  .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....N.....E.....
14_4_10DL .....T.....G.....D.....E.....K.....F.....L.....N.....G.....N.....T.....E.....
14_4_18DL .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....G.....R.....E.....
14_2_17DL .....T.....R.....D.....E.....F.....L.....N.....N.....T.....D.....N.....E.....
14_4_1DL  .....T.....G.....D.....E.....K.....F.....I.....L.....N.....G.....N.....T.....E.....
14_2_19DL .....T.....A.....G.....E.....L.....E.....G.....F.....I.....L.....N.....I.....N.....A.....T.....D.....N.....E.....
14_3_11DL .....T.....S.....R.....D.....L.....E.....G.....F.....I.....L.....V.....N.....I.....N.....A.....T.....N.....N.....E.....
14_3_6DL  .....T.....R.....D.....P.....L.....E.....G.....F.....I.....L.....N.....I.....N.....A.....T.....D.....N.....E.....
14_4_17DL .....T.....A.....E.....D.....L.....E.....G.....F.....I.....Q.....L.....L.....N.....I.....N.....G.....D.....N.....T.....E.....
14_3_7DL  .....T.....A.....E.....R.....D.....L.....E.....K.....F.....I.....Q.....L.....N.....I.....N.....G.....D.....N.....T.....E.....
14_2_7DL  .....T.....A.....E.....E.....D.....L.....E.....G.....F.....I.....Q.....L.....N.....I.....N.....G.....D.....N.....T.....E.....
14_4_12DL .....T.....A.....G.....E.....L.....E.....N.....S.....T.....E.....L.....N.....I.....G.....N.....D.....T.....N.....R.....T.....E.....
14_2_15DL .....T.....A.....G.....E.....L.....E.....N.....S.....T.....E.....I.....S.....L.....N.....I.....I.....N.....A.....T.....N.....N.....S.....I.....E.....
14_2_9DL  .....T.....A.....A.....R.....D.....L.....D.....N.....S.....T.....E.....K.....F.....I.....I.....N.....I.....N.....A.....T.....N.....N.....S.....I.....E.....
14_3_5DL  .....T.....A.....G.....E.....L.....E.....N.....S.....T.....E.....I.....L.....N.....I.....I.....N.....A.....T.....N.....N.....S.....I.....E.....
14_3_8DL  .....T.....A.....G.....E.....L.....E.....N.....S.....T.....E.....I.....S.....L.....N.....I.....I.....N.....A.....T.....N.....N.....S.....I.....E.....
14_3_13DL .....T.....A.....G.....E.....S.....L.....E.....N.....S.....T.....K.....N.....F.....S.....L.....N.....I.....I.....N.....G.....N.....D.....T.....N.....R.....T.....E.....
14_3_4DL  .....T.....S.....N.....L.....D.....V.....Q.....P.....N.....K.....G.....V.....S.....K.....L.....N.....I.....I.....N.....D.....N.....N.....R.....T.....E.....
14_4_25DL .....T.....A.....E.....E.....H.....D.....L.....E.....G.....S.....I.....Q.....I.....L.....N.....I.....I.....N.....D.....T.....N.....K.....T.....E.....
14_4_29DL .....T.....A.....E.....R.....D.....L.....E.....N.....S.....T.....E.....K.....F.....I.....I.....N.....I.....N.....A.....T.....N.....N.....E.....
14_3_22DL .....T.....S.....R.....I.....D.....L.....E.....N.....S.....A.....E.....I.....S.....L.....N.....I.....I.....N.....D.....N.....R.....T.....E.....
14_3_21DL .....T.....S.....Q.....L.....G.....V.....P.....N.....K.....V.....S.....L.....N.....I.....I.....N.....D.....N.....R.....T.....E.....
14_3_27DL .....T.....S.....R.....I.....D.....L.....E.....A.....N.....S.....T.....E.....S.....L.....N.....I.....I.....N.....D.....D.....N.....R.....T.....E.....
14_4_15DL .....T.....S.....N.....I.....D.....L.....I.....E.....N.....G.....T.....E.....S.....L.....N.....I.....I.....N.....D.....D.....N.....S.....T.....E.....

```

Alineamiento de las secuencias del virus LTNP 19.



```

110      120      130      140      150      160      170      180      190
19_1_26DL E F F Y C N T T Q L F N S T W E V N H T -- R T -- A N N T G E N I I L P C R I K Q I I N R W Q E V G K A M Y A P P I R G Q I S C S S T I R G L L L T R D G G T K N N S N -- E T F R P
19_3_18DL .....A.....
19_3_19DL .....A.....
19_2_12DL .....Y.....N.....NNS...
19_3_3DL .....Y.....N.....NNS...
19_3_15DL .....Y.....L.....NNS...
19_1_16DL .....K.L.N.....NNS...
19_1_11DL .....R.....N.....KN...
19_1_14DL .....R.....I.....K.N.....S H . D T . K T .
19_3_7DL .....R.....I.....K.N.....S H . D T . E T .
19_3_20DL .....A.KF....Q.E.S.D.AKP.....R.N.....S H . D T . K T .
19_2_9DL .....E.KF....K.E.S.D.TKP.....I.....R.N.....S H . D T . K T .
19_3_14DL .....E.E.D.TKP.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_12DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_24DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_10DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_13DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_6DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_15DL .....E.DF....K.E.S.D.TKP.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_19DL .....K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....K.N.....S H . D T . K T .
19_1_4DL .....K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....K.N.....S H . D T . K T .
19_1_7DL .....E.NF....E.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_9DL .....E.KL....E.E.D.TKP.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_25DL .....E.KFD...E.E.S.D.TRP.....I.....K.N.....S H . D T . K T .
19_2_24DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_19DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_11DL .....S.K.DL....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_18DL .....S.K.DL....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_10DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_21DL .....S.K.DL....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_4DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_13DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_1DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_8DL .....S.K.DFD...K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_2DL .....E.DF....K.E.S.D.TKP.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_2_3DL .....A.KF....Q.D.AKP.....I.....R.K.....S H . D T . K T .
19_2_17DL .....E.KF....E.E.S.K.TKP.....I.....R.K.....S H . T . K T .
19_2_5DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_3_11DL .....S.K.DL....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_3_6DL .....S.K.DL....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T K .
19_3_4DL .....S.K.DL....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_3_13DL .....S.K.DL....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_3_2DL .....S.K.DF....K.E.S.D.TKL.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_3_21DL .....E.KL....E.E.K.TKP.....I.....R.K.....S H . D T . K T .
19_2_7DL .....E.KF....E.E.P.K.TKP.....I.....R.K.....S H . D T . K T .
19_1_27DL .....E.KL....E.E.TKP.....I.....R.K.....S H . D T . K T .
19_3_12DL .....E.KL....E.E.K.TKP.....I.....R.K.....S H . D T . K T .
19_3_5DL .....E.KL....E.E.K.TKP.....I.....R.K.....S H . D T . K T .
19_3_9DL .....E.KL....E.E.K.TKP.....I.....R.K.....S H . D T . K T .
19_3_1DL .....E.KF....E.E.S.D.TKP.....I.....R.N.....S H . D T . K T .
19_1_17DL .....E.KF....E.E.S.K.TKP.....I.....N.N.....S H . D T . K T .
19_1_20DL .....E.KF....E.E.S.D.TKP.....I.....R.N.....S H . D T . K T .
19_1_28DL .....E.F....K.I.....I.....R.I.....R H . D T . K T V .
19_1_22DL .....G.F.T.S.W.N.S.E.G.S...A.K..T.....R.N.....S N . E T T --
19_1_8DL .....G.F.T.S.W.N.S.E.G.S...A.K..T.....R.N.....S N . E T T --
19_3_17DL .....G.F.T.S.W.N.S.E.G.S...A.K..T.....R.N.....S N . E T T --

```


30_8_6 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.T.....I..TE...I.VAG...RLRER.E--T.....MYR.T...G.....
30_7_13 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.T.....I..TE...I.VAG...RLRER.E--T.A.....MYR.T.....
30_7_17 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.T.....I..TE...I.VAG...KRLRER.E--T.....MYR.T.....
30_7_7 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.T.....I..TE...I.VAG...KRLRER.E--T.....MYR.T.....
30_11_02 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.T.N.....I..TE...I.VAG...RLRER.E--T.....MYR.T.....
30_8_10 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.T.N.....I..T...I.VAG...---R.E--T.....MYR.T.....
30_8_16 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.T.N.....I..T...I.VAG...---R.E--T.....MYR.T.....
30_8_8 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.T.N.....I..T...I.VAG...---R.E--T.....MYR.T.....
30_8_12 .N.....NNF.V.....QL...I.A.Q.A.N.....I..T...I.VAR...---R.E--T.....MYR.T.....D
30_4_16 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I..T.N.I.A.G...---R.EE--TT.....EY.....
30_4_15 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I..T.N.I.A.G...---R.EE--TT.....EY.....
30_7_12 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...G---R.E--T.....MYR.T.....D
30_7_2 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...G---R.E--T.....Y.....
30_11_11 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.....K...G.....D---TS.....MYR.T.....
30_4_11 G.....N...V.D.I.G.....A.Q.T.N.....K.A..G..K.AG...---K---RT.....Y.....
30_4_18 G.....N...V.D.I.G.....AA.Q.T.N.....K.A..G..K.AG...---K---T.....Y.....
30_4_10 G.....N...V.D.I.G.....A.Q.T.N.....K.A..G..K.AG...---K---T.....Y.....
30_1_4 .I.....NN.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....G.A..G..K.AG...---R.E--T.....SY.....T
30_1_5 .I.....NN.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....G.A..G..K.AG...---R.E--T.....SY.....T
30_1_10 .I.....NN.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....AR.G..K.AG...---R.E--T.....SY.....T
30_1_21 .I.....NN.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....A..G..K.AG...---R.E--T.....SY.....T
30_1_15 .I.....NN.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....A..G..K.AG...---R.E--T.....SY.....T
30_3_1 .I.....NN.V.....G...R.P...I.A.R.T.....A..G..K.AG...---R.E--T.....Y.....
30_3_20 .I.....NN.V.....G...R.P...I.A.R.T.....A..G..K.AG...---R.E--T.....Y.....
30_3_7 .I.....NN.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....A..G..K.AG...---R.E--T.....Y.....
30_6_11 .S.....NN.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....A..G..K.AG...---R.E--T.....Y.....
30_6_18 .S.....NN.V.....G...R.P...IAA.Q.T.....A..G..KVAG...---R.E--T.....Y.....
30_3_9 .N.....N.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....A..G..K.AG...---R.E--T.....Y.....
30_1_6 .N.....NN.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....D..G..KMAG...---R.E--T.....Y.....
30_3_15 .N.....NNF.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....D..G..K.AG...---R.E--T.....Y.....
30_1_13 .N.....NNF.V.....G...R.P...I.A.Q.T.....D..G..K.AG...---R.E--T.....Y.....
30_8_13 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...G---R.E--T.....Y.....
30_8_2 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...G---R.E--T.....Y.....
30_7_9 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...G---R.E--T.....Y.....
30_8_9 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...---R.E--T.....Y.....
30_8_5 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...---R.E--T.....Y.....
30_11_25 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...K---Q.E--T.A.....Y.....
30_11_09 .N.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...K---Q.E--T.A.....Y.....
30_11_33 .N.....DNF.V.....G...QL...I.A.Q.T.....TD..RA..IKL.R..QK---Q.E--S.....
30_11_10 .N.....DNY.V.....G...QL...I.A.Q.T.....D..E..IKL.K..Q---Q.EE--TT.....EC.....
30_11_12 .N.....DKY.V.....G...QL...I.A.Q.T.....D..E..IKL.K..Q---Q.EE--TT.....EY.....
30_11_14 .N.....DNY.V.....G...QL...I.A.Q.T.N.....DI.KT..N.R.AG...---R.E--T.....Y.....
30_11_19 .N.....DNY.V.....G...G.QL...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...---R.E--T.....Y.....
30_11_23 .N.....DNY.V.....G...G.QL...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...---R.E--T.....V..Y.....
30_11_31 .N.....DNY.V.....G...G.QL...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...I---R.E--T.....Y.....
30_11_13 .N.....DNY.V.....G...G.QL...I.A.Q.T.N.....V.KT..N.R.AG...---R.E--T.....Y.....
30_11_28 .N.....DNY.V.....G...QL...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...---R.E--T.....Y.....
30_11_30 .N.....DKY.V.....G...QL...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.A...---R.ER--TT.....EY.....G.....
30_11_38 .N.....DNY.V.....G...QL...I.A.Q.T.N.....I.KP..N.R.AG...---R.E--T.A.....TY.....
30_11_39 .NM.....NNY.V.....G...R.P...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...I---R.E--T.....Y.....
30_11_36NNY.V.....G...QL...I.A.Q.T.N.....I.KT..N.R.AG...---R.E--T.....Y.L.....

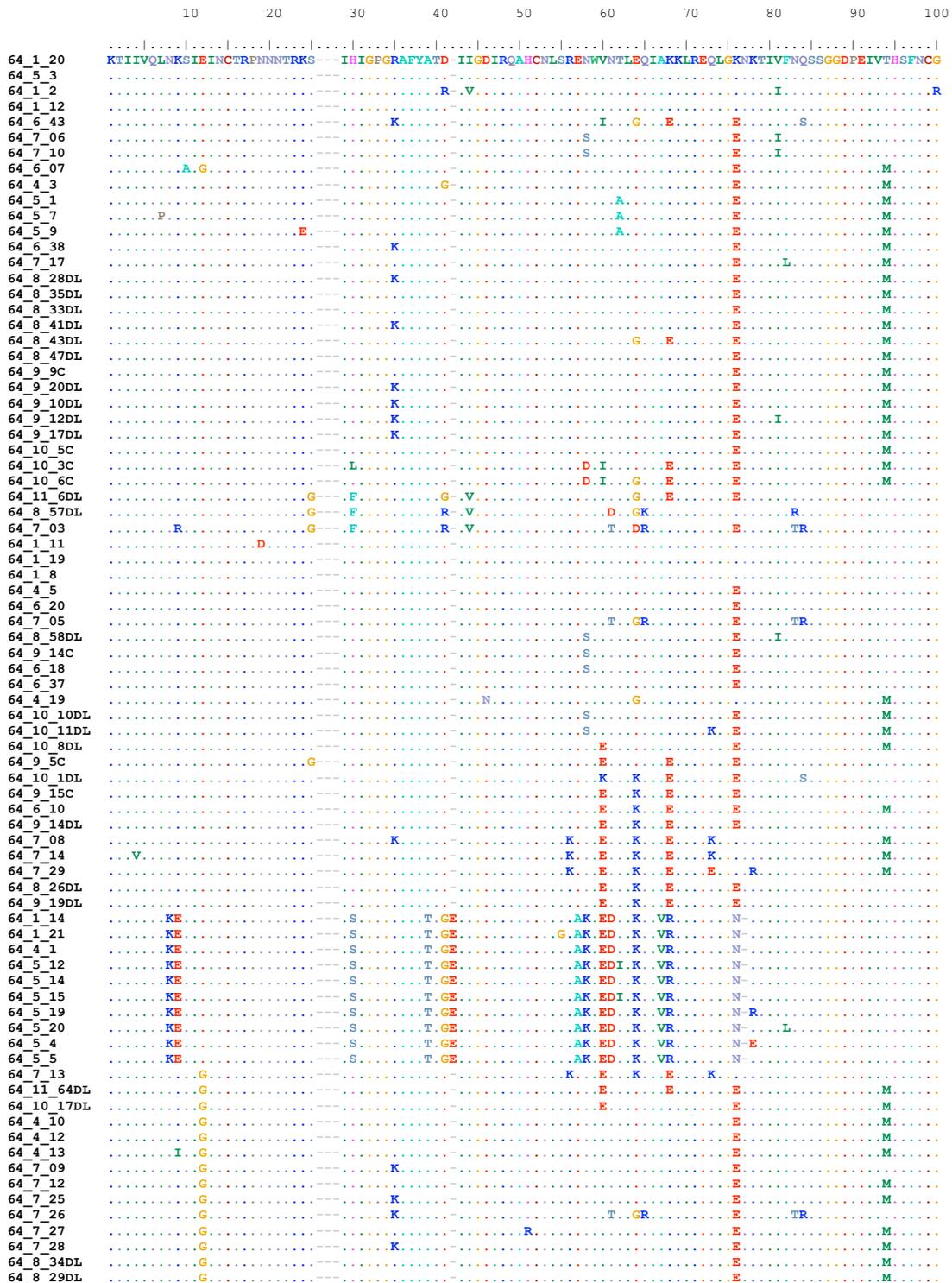
30_8_6 ..P..G.Q.K.N.TA.-NY..S---T..Q.....K...V...S..N.....DFNKT---G---
 30_7_13 ..P..G.Q.K.N.TA.-NY..S---DT..Q.....K...I...S..N.....DFNKT---N---
 30_7_17 ..P..G.Q.K.N.TA.-NY..S---T..Q.....K...I...S.Y.N.....INKT.GSD---
 30_7_7 ..P..G.Q.K.N.TA.-NY..S---T..Q.....K...I...S.Y.N.....INKT.GSD---
 30_11_02 AP..G.Q.K.N.TAK-NY.K.S---DT..Q.....K...I...S..N.....INKT.ETHI---
 30_8_10 ..P..G.Q.K.N.TA.-NY..S---T..Q.....K...I...S..N.....INETGKNG---
 30_8_16 ..P..G.Q.K.N.TA.-NY..S---T..Q.....K...I...S..N.....INETGKNG---
 30_8_8 ..P..G.Q.K.N.TA.-NY..S---T..Q.....K...I...S..N.....INETGKNG---
 30_8_12 ..P..G.Q.K.N.TVK-ND..S---T..Q.....K...I...S..N.....INKT.GSD-T-
 30_4_16 ..P..G.Q.K.N.TV.VND..S---DT..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GSD---
 30_4_15 ..P..G.Q.K.N.TV.VND..S---DT..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GSD---
 30_7_12 ..P..G.Q.K.N.TA.-NY..S---T..Q.....K...I...S..N.....DIFKNHT---
 30_7_2 ..P..G.Q.K.N.TA.-NH..S---T..Q.....K...I...S..N.....INKT.ETH---
 30_11_11 ..K..D---G.....ENKNET---
 30_4_11 ..G.R.D.T.L---DT.....K.....NET.KND---V-
 30_4_18 ..G.R.D.T.L---DT.....K.....NET.KND---V-
 30_4_10 ..G.R.D.T.L---DT.....K.....KNKNKT---
 30_1_4 ..L..G.Q.S.T.A---T.....K...I...S.Y.N...V.....SNET.GDD---
 30_1_5 ..L..G.Q.S.T.A---T.....K...I...S.Y.N...V.....SNET.GDD---
 30_1_10 ..L..G.Q.S.T.A---T.....K...I...S.Y.N.....SNET.GDD---
 30_1_21 ..L..G.Q.S.T.A---T.....K...I...S.Y.N.....SNET.GDD---
 30_1_15 ..L..G.Q.S.T.A---T.....K...I...S.Y.N.....SNET.GDD---
 30_3_1 ..L..G.R.SNT.V---T.....K...I...G..S..K.....SNETRRND---
 30_3_20 ..L..G.R.SNT.V---T.....K...I...S..S..K.....SNETRRND---
 30_3_7 ..L..G.R.S.T.V---T.....K...I...S..S..K.....SNETRRND---
 30_6_11 ..L..G.R.S.T.L---D.K.D---RT..Q.....K...I...S..S..K.....SNETRRND---
 30_6_18 ..L..G.R.S.T.L---D.K.D---RT..Q.....K...I...S..S..K.....SNETRRND---
 30_3_9 ..L..G.R.S.T.L---V.K.G---RT..Q.....K...I...S..S..K.....SNETRRND---
 30_1_6 ..L..G.R.S---L---I.KED---RT..Q.....K...I...S.Y.N.....SNET.GTN---
 30_3_15 ..L..G..S---T---M.K.E---RT..Q.....K...I...S.Y.N.....SNET.GSD---
 30_1_13 ..L..G.R.S---T---M.K.D---RT..Q.....K...I...S.Y.N.....SNET.GDD---
 30_8_13 ..P..D.R.S.-SV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKTDGSD---
 30_8_2 ..P..D.R.S.-SV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKTDGSD---
 30_7_9 ..P..D.R.S.-SV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GSD---
 30_8_9 ..P..D.R.S.-SV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GND---
 30_8_5 ..P..D.R.S.-SV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GND---
 30_11_25 ..P..D.R.S.-NL---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GNG---
 30_11_09 ..P..D.R.S.-NL---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GNG---
 30_11_33 ..R.....KNKN.T---
 30_11_10 ..P..G.Q.K.N.TAT-N..S---T..Q.....K...I...S.Y.N.....SNTPSGGNI---
 30_11_12 ..P..G.Q.K.N.TAT-ND..S---T..Q.....K...I...S.Y.N.....SN.ASRGNI---
 30_11_14 ..P..N...S.-NV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GDD---
 30_11_19 ..P..N...S.-NV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GDDP---
 30_11_23 ..P..N...S.-NV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GDDP---
 30_11_31 ..P..N...S.-NV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GDDP---
 30_11_13 ..P..N...S.-NV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT.GDDP---
 30_11_28 ..P..N...S.-NV---I.ED---ST..Q.....K...I...S..N.....INKT.GSD---
 30_11_30 ..P..G.Q.K.N.TAS-ND..S---T..Q.....K...I...S.Y.N.....-T.DGG---
 30_11_38 ..P..N...S.-NV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKTYGND---
 30_11_39 ..P..D.R.S.-SV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....SNKT---NI---
 30_11_36 ..P..N...S.-NV---I.ED---ST..Q.....K...I...S.Y.N.....A...SNKT.GDD---

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
45_8_2				A.DI	TIN	TE	E	R	R	Q
45_8_4				A.DI	TIN	TE	E	R	R	Q
45_5_3				A.DI	F	T	N	T	E	R
45_4_25				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_24				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_2				A.DI	Y	R	T	N	T	E
45_4_26				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_5_15				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_5_6				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_5_8				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_7_15				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_10	V	DR		A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_14				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_2				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_23				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_4_11				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_1				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_7				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_5_4			V	A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_7_11				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_7_12				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_5_2			V	A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_24				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_7_13				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_8_19				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_18				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_21				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_1_19				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_5_5				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_4_8	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_4	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_27	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_1	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_6	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_7	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_21	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_5_1	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_20	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_16	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_17	MV			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_19	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_4_5	M			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_11_5DL				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_11_7DL				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_11_4DL				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45-11_9DL				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_11_3DL				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_11_1C				A.DI	I	N	T	E	R	H
45_11_2C				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_11_4C				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_15_11DL				A.DIV	Y	T	N	T	E	R
45_15_2DL				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_15_3DL				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_8_15				A.DV	Y	T	N	T	E	R
45_8_18				A.DI	T	I	N	T	E	R
45_1_17				A.DI	L	Y	T	N	T	E
45_11_6DL				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_11_5C				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_11_10DL				A.DI	I	N	T	E	R	H
45_11_2DL				A.DI	T	I	N	T	E	R
45_11_13DL	T			A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_15_16DL				A.DI	Y	T	N	T	E	R
45_15_22DL				A.DI	T	I	N	T	E	R
45_15_27DL	H			A.DI	T	I	N	T	E	R
45_15_12C		Y		AA	A	D	I			
45_15_31DL	K	Y		AA	D	I	V			
45_15_13DL	S	Y		AA	A	D	I			
45_15_15DL		Y		A	D	I				
45_15_20DL	VRA	WRK	Y	AA	D	I				
45_15_21DL		Y		A	D	I				
45_15_32DL		Y		AA	A	D	I			
45_15_33DL		Y	Q	AA	D	I	V			

	110	120	130	140	150	160	170	180	190
45_1_15	FFYCNSTQLFNSTQLFN	STWR	NGTEGSNND	FILPCRIKQI	INMWOEVGKAMY	APPPIRGQIRCS	SSNITGLLLTRGGGN	~NNN	ETENFRP
45_4_23		R		T				D	~I
45_4_12		R		T		S		D	~I
45_4_9		R		T				D	~I
45_1_22								D	~I
45_1_6							L	D	GN T GN T
45_1_20		N.G	S.R	R				D	GN T T
45_11_22DL		WR.G.EG	SNNPTKIG	T				D	~I
45_11_12DL		WR.G.EG	SNNPTK	T				D	~I
45_1_5	P.SN	N.G	S.R	R				D	~T I
45_1_3	P.SN	N.G	S.R	R				D	~T I
45_1_11	P.SND.K	D	R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_10_9	P.SNN.I.L.N		TRPE		F		K.L.V	D	~TT.N.T
45_8_12	P.SNN.R.L.N		ARPD		F		K.L.V	D	~TT.N.T
45_7_8	P.N	E.L.R	RPK	L	F		K.L.V	D	~TT.N.T
45_7_5	P.N	E.L.R	RPK	L	F		K.L.L	D	GN TT ~N.T
45_10_7	P.SHN.I.L.G		K	L	F		K.L.N.L	D	DN TT ~N.T
45_8_16	P.SNN.I.L.G		K	L	F		VK.L.V	D	~TT.N.T
45_8_3	P.SNN.I.L.G		K	L	F		K.LV.V	D	~TT.N.T
45_10_3	P.SNN.R.L.G		K	T	F		K.L.VP	P	DN TSGN.T
45_8_11	P.SNN.R.L.N		ARPD		F		K.L.V	D	~TT.N.T
45_7_16	P.SNN.R.L.D		ARPE		F		K.L.V	D	~TT.N.T
45_8_1	P.SNN.R.L.N		ARPD		F		K.L.L	D	GN T R I
45_8_5	P.	E	D	R.K.G.M	F		K.L.V	D	~TTOGN.T
45_8_14	P.	E	D	R.K.G.M	F		K.L.V	D	~TTOGN.T
45_8_6	P.	E	D	R.K.G.M	F		K.L.V	D	~TTOGN.T
45_8_13	P.	E	D	R.K.G.M	F		K.L.V	D	~TTOGN.T
45_5_10	P.SND.R.L.D		VR.E		F		K.L.L	D	~T.GN.T
45_5_7	P.SND.R.L.D		VR.E		F		K.L.L	D	~T.GN.T
45_5_11	P.SND.R.L.D		VR.E		F		K.L.L	D	~T.GN.T
45_5_13	P.SND.R.L.D		VR.E		F		K.L.L	D	~T.GN.T
45_5_19	P.SND.R.L.D		VR.E		F		K.L.RL	D	~T.GN.T
45_5_17	P.SND.R.L.D		ARPK		F		K.L.L	D	~TT.GN.T
45_5_9	P.SND.R.L.D		ARPK		F		K.L.L	D	~TT.GN.T
45_5_18	P.SNN.I.N		KLK	T	F		K.L.L	D	~A.GN.T
45_7_19	P.SND.K.D		R.K.G	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_7_22	P.SND.K.D		R.K.G	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_7_17	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_7_18	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_1_12	P.SN	E.L.R	R.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_5_14	P.SN	E.S.R	RLK	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_1_9	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_7_20	P.N	E.L.R	RPK	L	F		K.L.V	N	~TT.N.T
45_7_23	P.N	E.L.R	RPK	L	F		K.L.V	N	~TT.N.T
45_7_9	P.N	E.L.R	RPK	L	F		K.L.L	D	GN T ~N.T
45_5_12	P.SND.K.D	EG-RR	R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.V
45_10_1	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.LP	D	GN T GN T
45_10_17	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_8_10	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_10_12	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_10_19	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_10_4	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_10_20	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_10_10	P.SND.I.SN		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_10_14	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_10_16	P.SNG.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_10_18	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_8_7	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_8_8	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	GN T GN T
45_8_17	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	~DT R I
45_8_21	P.SND.I.N		KR.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_10_11	P.SDD.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_8_9	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.V	D	~TT.NGT
45_7_7	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_10_6	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_7_3	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_10_2	P.SND.K.D		R.K	L	F		R.K.L.L	D	~T.G.T
45_7_2	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_10_13	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_7_10	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_7_21	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_10_8	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_7_1	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T
45_10_5	P.SND.K.D		R.K	L	F		K.L.L	D	~T.G.T

45_10_15	110	120	130	140	150	160	170	180	190
	P..SND.K...D		R.K	L..F		K.L..L		D	TT...T
45_8_2	P..SNN.R..L.N	ARPD		F		K.L..V		D	TT..N.T
45_8_4	P..SNN.R..L.N	ARPD		F		K.L..V		D	TT..N.T
45_5_3	P..SND.R..L.D	ARLK		F		K.L..V		D	TT.GNGT
45_4_25	P..SNN.I...D		R.K	F		K.L..L		D	T.GN.T
45_4_24	P..SNN.I...D		R.K	F		K.L..L		D	T.GN.T
45_4_2	P..SNN.I...D		R.K	F		L..L		D	T.GN.T
45_4_26	P..SND.I...D		R.K	F		K.L..L		D	T.GN.T
45_5_15	P..SNN.I...N	KLK	T	F		K.L..L		D	T.GN.T
45_5_6	P..SNN.I...N	TR.E		F		K.L..L		D	T.GN.T
45_5_8	P..SNN.I...N	TR.E		F		K.L..L		D	T.GN.T
45_7_15	P..N..E..L.R	RPK	L	F		K.L..L		D	GN.T~N.T
45_1_10	P..SN..E..L.R	R.K	L	F		K.L..L		D	GN.T..T
45_1_14	P..SN..E..L.R	R.K	L	F		K.L..L		D	GN.T.G..T
45_1_2	P..SN..E..L.R	R.K	L	F		K.L..L		D	GN.T.GN.T.G
45_1_23	P..SN..E..L.R	R.K	L	F		K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_4_11	P..SN..E..L.R	R.K	L	F		K.L..L		D	GN.T.G..T
45_1_1	P..SN..E..R.R	RLK	L	F		K.L..L		D	TT.GN.T
45_1_7	P..SN..E..R.R	RLK	L	F		K.L..L		D	TT.GN.T
45_5_4	P..SN..E..S.R	RLK	L	F		K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_7_11	P..SN..G..L.K	R.K	L	F		K.L..L		D	GNTT.G..I
45_7_12	P..SN..G..L.K	R.K	L	F		K.L..L	X.D	D	GNTT.G..I
45_5_2	P..SNN.I..L.R	R.E	L	F		V..K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_1_24	S..P..SND.K..D		R.K	L	F	K.L..L		D	GN.T..I
45_7_13	P..SND.K..D		R.K	L	F	K.L..L		D	T.G..T
45_8_19	P..SND.K..D		R.K	L	F	K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_1_18	P..SND.K..D		R.K	L	F	K.L..L		D	T.G..T
45_1_21	P..SND.K..D		R.K	L	F	K.L..L		D	T.G..T
45_1_19	P..SND.K..D		R.K	L	F	K.L..L		D	T.G..T
45_5_5	P..SNN.K..D	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.G..I
45_4_8	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_4	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_27	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_1	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_6	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_7	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_21	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_5_1	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_20	P..SN..E..	EG-KS	R.K	M.L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_16	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_17	P..SD..E..N	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_4_19	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L	T	D	T.KP.I
45_4_5	P..SN..E..	EG-KS	R.K	L	F	K..L		D	T.KP.I
45_11_5DL	P..SND.I...N		KR.K	L	F	K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_11_7DL	P..SND.I...N		KR.K	L	F	K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_11_4DL	P..SND.I...N		KR.K	L	F	K.L..L		D	GN.T.GN.T
45-11_9DL	P..SND.I...N		KR.K	L	F	K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_11_3DL	P..SND.I...N		KR.K	L	F	K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_11_1C	P..K..NDT	ERP	T..M	F		K.L..V		D	TTQGN.T
45_11_2C	P..SND.I...N		KR.K	L	F	K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_11_4C	P..SND.I...N		KR.K	L	F	K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_15_11DL	P..SN..K..D	EG-S	R.K	L	F	K.R..L		D	SS..I
45_15_2DL	P..SN..E..L.G	GR.K	L	F		K.L..L		D	GN.T.GN.T
45_15_3DL	P..SND...D		R.K	L	F	K.L..L		D	T.G..T
45_8_15	P..SN..E..L.N	EG	R.K	L	F	K.L..L		D	DT.R..I
45_8_18	P..SN..E..L.N	EG	R.K	L	F	K.L..L		D	DT.R..I
45_1_17	P..N...N	D	TR	T.L				D	..I
45_11_6DL	P..SND.R..L.D		RPK	L	F	K.L..V		D	TT.GN.T
45_11_5C	P..IN..K..Q.R		RQK	T	F	K.L..V		D	DNDT.GN.T
45_11_10DL	P..SNN.R..L.N	STRPE		F		K.L..V		D	GNDTSGN.T
45_11_2DL	P..SNN.I..L.G		K..T	F		K.L..V		D	TT..N.T
45_11_13DL	P..SNN.R..L.D	ARPE		F		K.L..V		D	TT..N.T
45_15_16DL	P..N..E..L.D	AR.K.G		F		K.L..V		D	DT.GN.T
45_15_22DL	P..SND.R..L		N.G	T	F	K.L.N.L		D	SNDT.G..T
45_15_27DL	P..SHN.K..L.G		S.K	L	F	K.L.N.L		D	DN.TSGN.T
45_15_12C	P..K..L.N		GKL	K	F	K.LV..V		D	IT..N.T
45_15_31DL	P..K..DEG		PKNGT	G..T	F	K.LV..V		D	IT..N.T
45_15_13DL	P..K..L.N		GKL	K	F	K.LV..V		D	TTQGN.T
45_15_15DL	P..K..DEE		PKN	G..T	F	K.L.N.L		D	SNDT.GN.T
45_15_20DL	P..SN..E..R.K		DRLK	T	F	K.L..V		D	DNDT.GN.T
45_15_21DL	L..P..K..DEE		PKN	G..T	F	K.L.N.L		D	SNDT.GN.T
45_15_32DL	P..K..N.T		GKL	K	F	K.LVK.I		D	IT..N.T
45_15_33DL	P..SNN.M..L.R		RK.E.G	T	F	K.L.N.L		D	SSDT.GN.T

Alineamiento de las secuencias del virus LTNP 64.



	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100						
64_8_50DL	G							E		M						
64_8_52DL	G		F					E		M						
64_7_01	G					I	G	VE	P	M						
64_4_14	K							E	I	M						
64_4_2	K						E	E		M						
64_9_1DL	K		L					E		M						
64_9_21DL	A	K		K				E	I	M						
64_7_04	K			K				E		M						
64_8_48DL	K		L					E		M						
64_8_31DL	K							E		M						
64_8_25DL	K		L			D	I	G	E	M						
64_8_32DL	Q	K				D	I	G	E	M						
64_8_36DL	K					D	I	G	E	M						
64_8_42DL	K					D	I	G	E	M						
64_9_9DL	K					D	I	G	E	M						
64_9_8DL	K					D	I	G	E	M						
64_9_15DL	K					D	I	G	E	M						
64_9_4DL	K					D	I	G	E	M						
64_9_11C	K					D	I	G	E	M						
64_9_5DL	K					D	I	G	E	M						
64_10_7DL	K					D	I	G	E	M						
64_10_4DL	K					E		E		M						
64_10_13DL	K					E		E		M						
64_10_5DL	K					E	K	E		M						
64_10_2DL	K					E	K	E		M						
64_11_2DL	K					E	K	E		M						
64_11_63DL	K					E	K	E		M						
64_11_62DL	E	G	F	K	G	V	D	ET	R	Q	V	E	M			
64_10_4C	E	G	F		V		T	R		E		M				
64_11_1DL	E	G	F		V		T	R		E		M				
64_11_52DL	E	G	F		R	VV		T	GR		E	TR	M			
64_5_18	E	G	F		R	V		IT	DR		E	IT	M			
64_5_22	E	G	F		R	V		T	RM		E	TR	M			
64_6_02	E	K	G	F		R	V		T	DR		E	IR	M		
64_6_34	E	K	G	F		R	V		K	T	DR		E	IR	M	
64_6_13	E	K	G	F		R	V		T	GR		E	TR	M		
64_6_17	E	K	G	F		R	V		T	DR		E	IR	M		
64_8_15DL	E	K	G	F		R	V		T	DR		E	IT	M		
64_8_23DL	E	K	G	F		R	V		T	DR		E	IT	M		
64_9_6C	E	K	G	F		R	V		T	DR		E	IR	M		
64_9_13C	E	K	G	F		R	V		T	DR		E	IR	M		
64_9_2DL	E	K	G	F		R	V		D	GK		E	TR	M		
64_10_16DL	E	K	G	F		R	V		H	T	DR		E	IR	M	
64_11_8DL	E	K	G	F		R	V		T	R		E		M		
64_11_4DL	E	K	G	F	K	R	V		D	T	GR	Q	E	K	M	
64_11_10DL	E	K	G	F	K	G	V		D	T	GR	Q	E	K	M	
64_11_3DL	E	K	G	F	E	R	V		T	GR	Q	E	K	M		
64_11_39DL	E	K	G	F		R	V		T	GR		E	IR	M		
64_11_50DL	E	K	G	F		R	V		T	GR		E	IR	M		
64_11_53DL	E	E	K	G	F	K	R	V		D	T	GR	Q	E	K	M
64_11_57DL	E	K	G	F		R	V		T	GR		E	TR	M		
64_11_58DL	E	Q	K	G	F	K	R	V		D	T	GR	Q	E	K	M
64_11_59DL	E	K	G	F		R	V		T	DR		E	IR	M		
64_11_60DL	E	K	G	F		R	V		T	GR		E	IR	M		
64_11_65DL	E	K	G	F	K	R	V		D	T	GR	Q	E	K	M	
64_6_11	E	G	F		R	V		T	DR		E	IT	M			
64_6_39	E	G	F		R	V		T	GR		E	TR	M			
64_6_35	E	G	F		R	V		AT	GR	T		R	M			
64_6_42	E	G	F		R	V		AT	GR	T		R	M			
64_4_6	E	G	F		R	V			KR	E		E	R	M		
64_4_7	E	G	F		R	V			KR	E		E	R	M		
64_4_8	SE	G	F		R	E			T	R		E	R	M		
64_4_21	E	G	F		R	V			T	R		E	R	M		
64_8_45DL	E	G	F		R	V			T	GR		E	TR	M		
64_4_17	E	G	F		R	V			D	GK		E	R	M		
64_4_11	E	G	F		R	V			I	K	T	R		M		
64_4_15	E	G	F		R	V			D	GK		R	A	M		
64_11_7DL	E		F		G	V			ET	R		E	M	M		
64_1_10	E				R	V				K		A	M	M		
64_1_13	E				R	V								M		
64_1_17	E			K		E								M		
64_1_18	E				R								K	M		
64_1_3	E				G					K				E	M	
64_1_1	E				R	V								M		
64_1_15	E				R	V								M		
64_1_5	E			Y		R	V			R				M		
64_1_6	E				R	V				R			K	M		
64_4_9	E									K			I	M		
64_4_18	E			T		R	V			IG	K		E	A	K	
64_4_16	E			T		R	V			D	GK		E	R	M	

```

110      120      130      140      150      160      170      180      190
GEFFFCNSTQLFNSTWYGNCT--NNTARN--GTTLPCKRIKQILNMWQEVGKAMYAPPPIKGPIRCSSNITGILLTRDGG--NDSSEAEFRP
64_1_20
64_5_3      .....K.....E.....V.....E.....A.....L.....G.....
64_1_2      .....V.....G.....V.....E.....A.....L.....G.....
64_1_12     .....V.....G.....VS.....V.....E.....A.....L.....
64_6_43     .....V.....G.....V.....E.....A.....L.....V.....
64_7_06     .....V.....D.VG--DV.....V.....E.....E.....L.....IN.....
64_7_10     .....V.....D.VG--DV.....V.....E.....E.....L.....IN.....
64_6_07     .....G.....D.....V.....E.....L.....G.....
64_4_3      .....F.....V.....G.....V.....E.....A.....V.....
64_5_1      .....V.....G.....V.....E.....A.....V.....
64_5_7      .....V.....G.....V.....E.....A.....V.....
64_5_9      .....V.....G.....V.....E.....A.....V.....
64_6_38     .....V.....D.G.....V.....E.....A.....V.....
64_7_17     .....V.....D.VG--DI.....V.....E.....E.....L.....IN.....
64_8_28DL   .....S.G.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....
64_8_35DL   .....T.G.....V.....E.....E.....NDSG.....
64_8_33DL   .....T.G.....V.....E.....A.....NG.....V.....
64_8_41DL   .....T.G.....V.....E.....E.....L.....T.....
64_8_43DL   .....G.....V.....E.....E.....L.....G.....
64_8_47DL   .....S.G.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....
64_9_9C     .....V.....T.G.....V.....E.....A.....M.....V.....
64_9_20DL   .....T.G.....L.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....
64_9_10DL   .....S.G.....V.....E.....E.....L.....NG.....R.V.....
64_9_12DL   .....V.....D.VG--DI.....V.....E.....A.....
64_9_17DL   .....G.....V.....E.....E.....L.....
64_10_5C    .....T.G.....V.....E.....E.....NGD.G.V.....
64_10_3C    .....T.G.....V.....E.....E.....NG.....V.....
64_10_6C    .....T.G.....V.....E.....E.....NG.....V.....
64_11_6DL   .....T.G.....A.....S.R.VH.....E.....E.....NG.....V.....
64_8_57DL   .....A.....TRP.D.....K.....VI.....G.....
64_7_03     .....A.....TGS.D.T.....K.....K.....I.....G.G.....N.....
64_1_11     .....A.....TGS.D.VK.....A.L.....N.NKT.....
64_1_19     .....A.....TGS.D.VK.....L.....N.NKT.....
64_1_8      .....A.....TGS.D.VK.....L.....N.NKT.....
64_4_5      .....A.....TGS.D.VKT--D.....L.....IN.....
64_6_20     .....A.....TGS.D.VE--D.....N.....
64_7_05     .....R.....A.....TGS.D.T.....K.....R.....S.....I.....SN.....
64_8_58DL   .....HA.....TGS.D.TET--DI.I.....L.....IN.....
64_9_14C    .....A.....TGS.D.VE--D.....L.....IN.....
64_6_18     .....A.....TGS.D.VE--D.....L.....K.NKT.....
64_6_37     .....A.....TGS.D.VE--D.....L.....IN.....
64_4_19     .....G.....V.....E.....A.....
64_10_10DL  .....T.G.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....G.....
64_10_11DL  .....T.G.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....
64_10_8DL   .....T.G.....V.....E.....E.....L.....D.V.....T.....
64_9_5C     .....A.....T.G.....V.....E.....A.....L.....N.....V.....
64_10_1DL   .....A.....T.G.....V.....E.....E.....L.....NDS.G.ID.....
64_9_15C    .....V.S.--S.G.....V.....E.....A.....L.....
64_6_10     .....G.....V.....E.....E.....L.....
64_9_14DL   .....M.....G.....V.....E.....A.....L.....
64_7_08     .....G.....V.....E.....A.....L.....V.....
64_7_14     .....G.....S.....V.....E.....A.....L.....
64_7_29     .....G.....V.....E.....A.....L.....V.....
64_8_26DL   .....G.....V.....E.....A.....L.....
64_9_19DL   .....V.S.--G.....V.....E.....E.....L.....G.....
64_1_14     .....NVTV.EGS..EG--T.L.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_1_21     .....NVTV.EGS..EG--T.L.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_4_1      .....NVTV.EGS..EG--T.L.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_5_12     .....NVTV.EGS..EG--T.L.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_5_14     .....NVTV.EGS..EG--T.L.....R.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_5_15     .....NVTV.EGS..EG--T.L.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_5_19     .....NVTV.EGS..EG--T.L.....V.....R.Q.....L.....SNNN.T.I.....
64_5_20     .....NVTV.GGS..EG--T.L.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_5_4      .....K.R.....NVTV.EGS..EG--T.L.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_5_5      .....NVTV.EGS..EG--T.L.....R.Q.....L.....NNN.T.I.....
64_7_13     .....L.....V.....E.....A.....L.....
64_11_64DL  .....T.G.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....
64_10_17DL  .....T.G.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....
64_4_10     .....V.....G.....V.....E.....A.....L.....V.....
64_4_12     .....V.....G.....V.....E.....A.....L.....V.....
64_4_13     .....V.....G.....V.....E.....A.....L.....V.....
64_7_09     .....V.....G.....V.....E.....A.....L.....
64_7_12     .....T.G.....V.....E.....A.....L.....NG.....V.....
64_7_25     .....A.....REP.G.T.....K.....S.....VI.....G.NR.....
64_7_26     .....HA.....TGS.D.ET--DR.I.....L.....IN.....
64_7_27     .....V.....G.....D.....V.....E.....A.....L.....V.....
64_7_28     .....G.....V.....E.....A.....L.....
64_8_34DL   .....S.G.....L.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....
64_8_29DL   .....T.G.....V.....E.....E.....L.....G.....
64_8_50DL   .....S.G.....V.....E.....E.....L.....NG.....V.....

```

	110	120	130	140	150	160	170	180	190
64_8_52DL		S.G		V.V		A.E		L.NG	V.S
64_7_01	A.	TGS.D.T			K		S	L	SN
64_4_14	V	G.D		V		E.E		L	G
64_4_2	V	G		V		E.A		V	
64_9_1DL		A.G	V	VI		E.A		NG	G.V
64_9_21DL	V	D.VG	DI	V		E.E		L	S
64_7_04	L	V	D.VG	DI	V		E.E	L	IN
64_8_48DL		T.G		V		E.A		NGD	I
64_8_31DL	V	G		V		E.A	M		K.D
64_8_25DL	V.S	G.D		V		E.E	L		
64_8_32DL	V	G.D		V		E.E	L		G
64_8_36DL	V	G.D		V		E.A		N	
64_8_42DL	V	G.D		V		E.E	L		G
64_9_9DL		T.G		V		E.K.E	L		V
64_9_8DL		T.G		V		E.E	L		
64_9_15DL	V	G.D		V		E.E	L		G
64_9_4DL		T.G	F	V		E.E		NG	V
64_9_11C		T.G		V		E.E	L		G
64_9_5DL		T.G		V		E.E		NG	V
64_10_7DL		T.G		V		E.E		NG	V
64_10_4DL		T.G		V		E.E		NG	V
64_10_13DL		T.G		V		E.E	L		V
64_10_5DL	E	I.G		V		E.E	L		V
64_10_2DL		T.G		V		E.E		NG	V
64_11_2DL		T.G		V		E.E		NG	V
64_11_63DL		T.G		V		E.E		NG	V
64_11_62DL		T.G		V		E.E	L		V
64_10_4C	A.	A.G		V		E.A		NG.GG	VD
64_11_1DL		T.G	A	V.L		E.E	L	D.NG	V
64_11_52DL	A.	TG.SDDT	G		K	P	T.S	LI	G.NR
64_5_18	A.	IEP.D	VK		K	P	T.S	VI	G
64_5_22	A.	REP.D			K		K	I	G.G.T
64_6_02	A.	REP.D	T		K		VI		G.G.N
64_6_34	A.	REP.D	T		K		VI		G.G.N
64_6_13	A.	TGS.D	T		K		VI		SG.G.S
64_6_17	A.	REP.D	T		K		S	VI	SG.G.T.P
64_8_15DL	A.	REP.D	K.G.S		K		S	I	G.G.N
64_8_23DL	A.	REP.D	K.G.S		K		S	I	G.G.N
64_9_6C	A.	D	D		K	Q	S	VI	GG.G.N
64_9_13C	A.	REP.D	VK		K		K	LI	G.G.N
64_9_2DL	K	A.	REP.D	MT		K	Q	S	VI
64_10_16DL	K	A.	S	DA		K	Q	S	VI
64_11_8DL		A.G		V	K		E.S.A	M	NG.V
64_11_4DL		T.G		V		E.E	L		NG.V
64_11_10DL		T.G		V		E.E	L		NG.V
64_11_3DL		T.G		V		E.E	L		NG.V
64_11_39DL	A.	TG.S	DT		K		T.S	T	VI
64_11_50DL	A.	SATGANDTGN	L	IL		K		S	LI
64_11_53DL		T.G		V		E.T	E	L	NG.V
64_11_57DL	A.	TG.S	DT	L		K	S		VI
64_11_58DL		T.G		V		E.E	L		NG.V
64_11_59DL	A.	STTGSNDTRN			K		S	VI	G.N
64_11_60DL	A.	TG.S	DTG		K		S	VI	G.N
64_11_65DL		T.G		V		E.E	L		NG.V
64_6_11	A.	REP.D	T		K		VI		G.G.N
64_6_39	A.	TGS.D	T		K		VI		N
64_6_35	A.	TRP.D			K		VI		G
64_6_42	A.	TRP.D			K		VI		G
64_4_6	A.	TGS.D	TK		K		LP	VI	G.G.I
64_4_7	A.	TGS.D	TK		K		L	VI	G.G.I
64_4_8	A.	TGS.D	T		K		VI		G.G.I
64_4_21	G	A.	TGS.D	T		K		VI	G.G.I
64_8_45DL	A.	TGS.D	T		K		S	VI	G.N
64_4_17	A.	TGS.D	TK		K		E	VI	G.G.I
64_4_11	V	G		V		E.A	L		
64_4_15		D		V	K				G.G.T
64_11_7DL		T.G	V	S	V		E.V.R	VNG	GKV
64_1_10								L	I
64_1_13								L	I
64_1_17								L	I
64_1_18								L	G
64_1_3	A.	TGS.D	K				L		SN
64_1_1	A.	TGS.D							I
64_1_15	A.	TGS.D	V						I
64_1_5	A.	TGS.D					E		G
64_1_6	H	A.	TGS.D	K					G
64_4_9	A.	TGS.D	T		R.K		VI		G.G.I
64_4_18	A.	TGS.D	VKT	D			VT		G.G.I
64_4_16		D			K		VI		G.G.I

9. PUBLICACIONES.