

**Título:** MARCADORES MOLECULARES EN LA IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS ASOCIADOS A LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1) Y SU UTILIDAD EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

**Nombre:** Rodríguez Da Silva, Alfredo

**Universidad:** Universidad de Vigo

**Departamento:** Bioquímica, genética e inmunología

**Fecha de lectura:** 16/07/2015

**Programa de doctorado:** CIENCIAS DE LA SALUD

**Dirección:**

> **Director:** ANTONIO OCAMPO HERMIDA

> **Director:** DIANA VALVERDE PEREZ

**Tribunal:**

> **presidente:** Antonio ANTELA LÓPEZ

> **secretario:** ANTONIO AGUILERA GUIRAO

> **vocal:** BEATRIZ HERNÁNDEZ NOVOA

**Descriptor:**

> RETROVIRUS

> GENETICA CLINICA

> GENETICA HUMANA

> SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

**El fichero de tesis** no ha sido incorporado al sistema.

**Resumen:** La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) constituye un problema sanitario de primer orden a nivel mundial. La mayoría de los pacientes infectados por el VIH-1 (80-85%) progresan a síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en ausencia de tratamiento de gran actividad (TARGA), en un periodo de entre 8-10 años (progresores crónicos), debido a una caída progresiva en el número de linfocitos T CD4+.

En base a la velocidad de la progresión de la infección se identifica a un subgrupo de pacientes (5-15%) conocidos como "no progresores a largo plazo" (LTNPs), cuya evolución transcurre más lentamente. Este subgrupo de pacientes se caracterizó por permanecer clínicamente asintomáticos y/o inmunológicamente estables, con un recuento de linfocitos T CD4+ normal, durante al menos 8 años. Gracias a la determinación de la carga viral, se comprobó que los LTNPs poseían características fenotípicas que los diferenciaban a su vez, en otros 3 subtipos: "no controladores de viremia" (LTNP-NC), "controladores de viremia" (LTNP-CV) y "controladores élite" (LTNP-EC). Este último representa un porcentaje (<1%) del total de los pacientes infectados por el VIH y se caracterizan por mantener la carga viral indetectable sin TARGA.

Esta progresión lenta de la infección por VIH-1 depende de las interacciones existentes entre el virus, el huésped y el medio ambiente. Entre los factores genéticos del huésped más estudiados se encuentran: 1) los polimorfismos que afectan a la capacidad de entrada del virus al interior celular, como sucede con la delección de 32pb en el gen que codifica para el co-receptor CCR5 (CCR5-A32) y 2) los haplotipos asociados a la región de presentación de los antígenos leucocitarios humanos (HLA), como el alelo HLA-B\*5701 (SNP: rs2395029), el alelo HLA-B\*27 y la homocigosis C/C del SNP: rs9264942 del HLA-C, que regulan la respuesta inmune específica de la infección en el huésped.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue elaborar un estudio descriptivo para analizar las características epidemiológicas, clínicas y analíticas de los pacientes infectados por VIH-1 que están en seguimiento en la consulta de VIH del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo-Xeral (CHUVI), además de estimar la prevalencia de los marcadores genéticos asociados a la lenta progresión [CCR5-A32, HLA-B\*5701 (SNP: rs2395029), HLA-B\*27 y la homocigosis C/C del SNP: rs9264942 del HLA-C] y evaluar su relación con la progresión de la infección.

Para ello se incluyeron a 408 pacientes que acudieron a la consulta entre enero de 2007 y enero de 2009. La recogida de los datos desde el diagnóstico de la infección y su posterior seguimiento transcurrieron desde la inclusión del paciente en el estudio hasta enero de 2013.

El análisis descriptivo de los diferentes marcadores genéticos relacionados con la lenta progresión mostró que el SNP: rs9264942 en homocigosis C/C del gen HLA-C presentaba una prevalencia del 17,9%, la delección del gen CCR5-A32 del 11,5%, obteniéndose en el 100% de los casos el genotipo heterocigoto (CCR5wt/A32), la del alelo HLA-B\*5701 (SNP: rs2395029) fue del 7,6% y la del alelo HLA-B\*27 del 6,4%.

Del total de los pacientes analizados, 354 pacientes fueron clasificados como progresores y 46 como LTNPs (N=400), observándose que todos los marcadores genéticos determinados en este estudio, exceptuando el alelo HLA-B\*27, guardaban una relación con la lenta progresión, al presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos [CCR5wt/A32 ( $p=0,011$ ), SNP: rs2395029 (HLA-B\*5701) ( $p<0,0001$ ) y homocigosis C/C del SNP: rs9264942 del HLA-C ( $p<0,0001$ )], así como la asociación entre más de uno de estos marcadores ( $p<0,0001$ ) [OR=18,229 IC95% (6,335-52,283)].

De este subgrupo de 400 pacientes se seleccionó a 331 individuos de raza caucásica o hispana con ascendencia europea, de los cuales se disponía de toda la información necesaria al diagnóstico de la infección por el VIH-1, para el desarrollo de un modelo matemático que sirviese en el pronóstico de la lenta progresión de la infección.

Este modelo consiste en una regresión logística multivariante que evalúa la asociación entre el perfil genético presentado por cada paciente y la lenta progresión de la infección. Modelo que, a su vez, fue ajustado por los potenciales factores de influencia epidemiológica y clínica, así como por la variable de confusión, "fecha al diagnóstico", que sirvió para analizar las posibles interacciones entre las diferentes variables y su relación con el "efecto periodo". El modelo final resultante proporciona un valor pronóstico, al asignar diferentes probabilidades de lenta progresión a cada paciente, de acuerdo a su perfil al diagnóstico: (edad, cifra de linfocitos T CD4+,

delección CCR5A32, SNP: rs2395029 del alelo HLA-B\*5701 y la homocigosis C/C para el SNP: rs9264942 del HLA-C).

Para evaluar la capacidad pronóstico del modelo planteado, se procedió a la elaboración de una curva ROC, de la cual se obtuvo como resultado un AUC de 0,828, con un IC95% (0,783-0,867) y un valor de  $p < 0,0001$ . A partir de esta curva ROC, también se obtuvieron una serie de puntos de corte estimados para los diferentes porcentajes de sensibilidad y especificidad, que permiten clasificar a los pacientes como LTNPs o como progresores. Finalmente, se seleccionó como punto de corte al valor ( $\geq 0,0643$ ), el cual muestra una sensibilidad del 90,48% y una especificidad del 56,06%.

A continuación, se procedió a la elaboración de un estudio de cohorte con el fin de simular la evaluación de la fiabilidad del modelo matemático propuesto. En este subestudio se incluyeron a 159 pacientes procedentes del estudio descriptivo, que presentaban al diagnóstico una serie de características similares a la población diana (cifra de linfocitos T CD4+  $\geq 500$  células/microl y no presentar ningún criterio de progresión al diagnóstico). Este estudio de cohorte sirvió para testar el uso del modelo matemático que pronostica la lenta progresión de la infección por VIH-1 como herramienta clínica y además, para estimar los principales parámetros diagnósticos como son la sensibilidad, la especificidad, así como los distintos valores predictivos y los coeficientes de verosimilitud.

A tenor del valor de los principales parámetros diagnósticos obtenidos, tanto en el estudio elaborado para el desarrollo del modelo matemático como en el estudio de cohorte, se puede afirmar que cuando a un paciente determinado se le aplica dicho criterio seleccionado y éste obtiene un resultado negativo en el test se puede descartar con una alta probabilidad que el paciente se vaya a comportar como un LTNP, convirtiéndolo en un candidato ideal a iniciar el TARGA. Mientras que en aquellos pacientes en los que el resultado del test es positivo, habría que esperar un tiempo de seguimiento de 8 años para reconfirmar que realmente son LTNPs.

Por otra parte, fueron realizados un análisis de supervivencia de Kaplan Meier y de Regresión de Cox, con el fin de analizar y predecir el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por VIH-1 hasta la progresión de la infección. Como resultado de este análisis se obtuvo que los "linfocitos T CD4+ al diagnóstico", el "SNP: rs2395029 del HLA-B\*5701" y la "homocigosis C/C para el SNP: rs9264942 del HLA-C", se asociaron con un efecto protector de progresión. Es decir, la presencia de estos marcadores genéticos y la mayor cifra linfocitos T CD4+ al diagnóstico favorecieron el hecho de que los pacientes se comportasen como LTNPs.

Por el contrario, en este análisis se observó que los pacientes que no eran progresores al diagnóstico y que habían sido diagnosticados en la fase de primoinfección presentaban un mayor riesgo de progresar a estadios más avanzados de la infección, en relación con aquellos pacientes que no habían sido diagnosticados en dicha fase aguda.

Este análisis, también puso de manifiesto que tanto la variable "edad al diagnóstico" y la "delección CCR5-A32", son variables que están íntimamente relacionadas con el paso del tiempo y por lo tanto, a pesar de que en el análisis de regresión logística multivariante habían sido consideradas como factores de protección, en el análisis de supervivencia se observó que estas variables perdían su valor de protección.

Por último, se procedió a la realización de un subestudio en el que se analizó a los marcadores genéticos relacionados con la lenta progresión del VIH-1, que a su vez, también han sido relacionados con el aclaramiento espontáneo del VHC, como sucedió con los alelos HLA-B\*27 y HLA-B\*57. Tras la realización de este análisis, se realizó un segundo subestudio en el que se analizó la determinación del genotipo C/C de la IL28B como marcador genético del aclaramiento espontáneo del VHC y su relación con el control de la replicación viral y por consiguiente, con la lenta progresión del VIH-1.

Como resultado final de la realización de estos dos subestudios se concluye que el SNP: rs12979860 en homocigosis C/C del gen IL28B es el único marcador genético de todos los marcadores analizados, que se ha podido relacionar con el aclaramiento espontáneo del VHC. Pero, por el contrario, su presencia no se ha podido relacionar ni con la lenta progresión a estadios más avanzados de la infección del VIH-1, ni con el control de la replicación viral.