

Métodos de determinación del tropismo viral: tests genotípicos y fenotípicos

Mayte Perez-Olmeda^a y Eva Poveda^b

^aUnidad de Inmunopatología del Sida. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

^bDepartamento de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III. Madrid. España.

La reciente aprobación del primer antagonista de CCR5, maraviroc (MVC, Celsentri®), con una actividad antiviral específica frente a variantes virales R5-trópicas ha generado la necesidad de disponer de ensayos para la determinación del tropismo viral en todos los pacientes candidatos a iniciar tratamiento con este nuevo fármaco. Aunque los métodos genotípicos parecen ser la herramienta más útil por su rapidez y sencillez, en el caso del tropismo viral, las técnicas fenotípicas son actualmente consideradas las más fiables. En los últimos años, se han desarrollado diferentes ensayos fenotípicos para la determinación del uso del correceptor. Sin embargo, el ensayo fenotípico de Trofile™ es el ensayo utilizado actualmente para la determinación de tropismo, ya que es el único que cuenta con validación clínica. Dado que la presencia de variantes X4-trópicas en la población viral se ha asociado con fracaso virológico a MVC, el principal reto de las herramientas tanto genotípicas como fenotípicas es optimizar su sensibilidad para la detección de variantes X4-trópicas presentes de forma minoritaria en la población viral. Al mismo tiempo, se está evaluando la correlación entre métodos genotípicos y fenotípicos para determinar si las herramientas genotípicas pueden utilizarse para tomar decisiones terapéuticas.

Palabras clave: VIH. Tropismo viral. Genotipo y fenotipo.

Methods for determining viral tropism: genotype and phenotype tests

The recent approval of the first CCR5 antagonist, Maraviroc (MVC, Celsentri®), with specific antiviral activity against R5-tropic virus variants has generated the need for studies to determine the viral tropism in all those patient candidates for starting treatment with this new drug. Although genotyping methods appear to be the most useful tool due to its speed and simplicity, in the case of viral tropism, phenotyping techniques are currently considered the most reliable. In the last few years,

different phenotyping assays have been developed to determine the use of the co-receptor. However, the Trofile™ phenotype assay is currently the one most used for the determination of tropism, since it is the only one that has been clinically validated. Given that the presence of X4-tropic variants in the viral population has been associated with virological failure to MVC, the main challenge of both genotyping and phenotyping tools is to optimise their sensitivity for detecting X4-tropic variants present in a minority of the viral population. At the same time, the correlation between genotyping/phenotyping methods is being evaluated to determine whether genotyping tools can be useful to make therapeutic decisions.

Key words: HIV. Viral tropism. Genotype and phenotype.

Introducción

Los estudios de tropismo han adquirido un especial interés desde el inicio del desarrollo clínico de fármacos antagonistas de los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, y más recientemente desde la aprobación del antagonista de CCR5, maraviroc (MVC, Celsentri®), para el tratamiento de la infección por el VIH^{1,2}.

MVC actúa inhibiendo específicamente la replicación de las variantes virales R5-trópicas. Además, la presencia de variantes X4-trópicas en la población viral de los pacientes se ha asociado con fracaso virológico a MVC^{3,4}. Por esta razón, se recomienda la realización de un estudio de tropismo antes de la prescripción de MVC en pacientes VIH positivos para asegurar la respuesta al tratamiento con este nuevo inhibidor de la entrada. El ensayo de Trofile (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA, Estados Unidos)⁵ es el utilizado actualmente para la determinación del uso del correceptor en todos los pacientes que planean iniciar una terapia con MVC como parte de su tratamiento antirretroviral. Sin embargo, en los últimos años el interés por los estudios de tropismo ha venido acompañado del diseño y desarrollo de nuevos ensayos fenotípicos para la determinación del uso del correceptor.

Los ensayos fenotípicos, a partir de aislados virales o virus recombinantes, son considerados los más fiables para la determinación del uso del correceptor. Sin embargo, se están buscando alternativas más económicas, rápidas y sencillas de desarrollar en los laboratorios especializados en VIH para la determinación del uso del correceptor en la práctica clínica. Los estudios genotípicos que predicen el uso del co-

Correspondencia: Dra. M. Pérez-Olmeda
Unidad de Inmunopatología del Sida. Instituto de Salud Carlos III.
Sinesio Delgado, 6. 28029 Madrid. España.
Correo electrónico: mayteperez@isciii.es

receptor según la secuencia de aminoácidos de una región de la envuelta viral podrían ser una buena alternativa. Actualmente existe un enorme interés en conocer la exactitud de las herramientas genotípicas para la determinación del uso del correceptor y evaluar su posible utilización para tomar decisiones terapéuticas.

En este capítulo se describen los diferentes métodos, tanto genotípicos como fenotípicos, actualmente disponibles para la determinación del uso del correceptor, así como sus ventajas y limitaciones para su utilización en la práctica clínica (tabla 1).

La región V3 de la envuelta viral: principal determinante del tropismo

La entrada del VIH en la célula consiste en una sucesión de interacciones entre la envuelta viral y receptores celulares. El primer paso en el proceso de entrada es la unión de la glucoproteína de la envuelta viral (gp120) con el receptor celular CD4 presente en la superficie celular. La interacción gp120-CD4 provoca cambios conformacionales en la envuelta viral que permiten al complejo gp120-CD4 interactuar con los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4, principalmente⁶. La región V3 de la gp120 es el principal dominio involucrado en esta interacción, aunque otras regiones de la envuelta como V1/V2 y C4 también están implicadas en esta interacción⁷.

La región V3 de gp120 se considera, por tanto, el principal determinante, aunque no el único, del uso del correceptor. La secuencia de aminoácidos de V3 determina en gran medida el uso preferencial del receptor CCR5 o CXCR4 por el VIH-1 para entrar en la célula^{8,9}. Algunos estudios han demostrado que la sustitución de la región V3 de la envuelta de un virus R5 por la región V3 de un virus X4-tropical es suficiente para cambiar el tropismo viral por los receptores de quimiocinas^{10,11}. De manera que por la secuencia de aminoácidos de la región V3 los aislados de VIH-1 pueden cla-

sificarse como CCR5-tropicos (R5), CXCR4-tropicos (X4) o duales/mixtos (R5-X4/R5+X4), dependiendo del correceptor utilizado para entrar en la célula¹².

Tanto la región V3 como los receptores CCR5 y CXCR4 están cargados debido a la presencia de aminoácidos básicos como la arginina (R) o la lisina (K) y aminoácidos ácidos como el ácido aspártico (D) o el ácido glutámico (E). Las interacciones electrostáticas entre la envuelta viral y los receptores de quimiocinas van a determinar la eficacia y la especificidad de la unión. Los aislados R5 tropicos normalmente presentan una menor carga neta en la región V3 que las variantes X4, lo cual se relaciona con el hecho de que el receptor CCR5 tenga mayor carga positiva que el receptor CXCR4. Se han descrito mutaciones que afectan a la carga neta de la región V3 que se han relacionado con la utilización de un receptor u otro. De igual forma, otros cambios que no afectan a la carga neta también se han asociado con la utilización de un receptor u otro, indicando que constricciones estructurales también son relevantes para la interacción gp120-correceptor¹³⁻¹⁵.

Herramientas genotípicas actualmente disponibles para la predicción del uso del correceptor

Desde principios de los años noventa, se han descrito y desarrollado diferentes reglas y algoritmos de interpretación para la determinación del tropismo viral basados fundamentalmente en las características de la secuencia de aminoácidos de región V3 de la envuelta viral¹⁶.

La «regla 11/25» fue el primer algoritmo de interpretación propuesto, además de ser uno de los más sencillos y populares. Dicha regla se basa en la observación de que los virus que en la región V3 presentan aminoácidos básicos (R o K), es decir, cargados positivamente, en las posiciones 11 y/o 25 se asocian a un fenotipo X4-tropical o SI (figura 1). Si

TABLA 1. Herramientas para la determinación del tropismo viral. Principales obstáculos para su introducción en la práctica clínica

Ensayos	Metodología	Limitaciones
MT-2	Capacidad de los aislados virales de formar sincitios en células MT-2	Obtención de aislados virales
Líneas celulares	Capacidad de los aislados primarios o virus recombinantes de explicar en líneas celulares que expresan los receptores CCR5 y CXCR4 en su superficie	Diferentes valores de correceptores entre las líneas celulares y las dianas naturales del VIH
Virus recombinantes	Trofile (Monogram Bioscience, San Francisco, CA, Estados Unidos) PhenoScript (Eurofins-VirAlliance, Kalamazoo, MI) Antivirogram (Virco BVBA, Mechelen, Bélgica) PhenX-R (InPheno, Basilea, Suiza)	Umbral de detección de virus X4 en una población mixta de virus (R5 + X4), aunque mejorando Necesidad de instalaciones y personal cualificado para su desarrollo en centros de referencia
Genotipo	Identificación de residuos de aminoácidos en V3 que influyen en el uso viral del correceptor	Baja sensibilidad para la determinación de variantes X4 Pocos datos que relacionan el fenotipo virtual y el fenotipo real

por el contrario en estas posiciones no aparece ningún aminoácido básico, los virus son clasificados como R5-trópicos o NSI¹⁵. En general, se ha observado que esta regla presenta una gran especificidad (80-90%) pero baja sensibilidad (30-40%) para clasificar virus X4-trópicos^{17,18}.

Recientemente se ha propuesto una modificación de la regla 11/25 que mejora el valor predictivo para la determinación del tropismo según la secuencia de V3. Se trata de la «regla 11/24/25», que considera a una secuencia como X4 cuando en la posición 11, 24 o 25 aparece un aminoácido básico, en caso contrario se identificará como R5-trópicos¹⁹.

La «regla de la carga neta» es un sencillo algoritmo de interpretación que consiste en calcular la carga neta global de la región V3, según la siguiente fórmula: $(K + R) - (D + E)$. Si el resultado es mayor o igual que 5 el virus es clasificado como X4-trópico, mientras que si es menor de 5 se considera R5-trópico. Hay una fórmula alternativa para el cálculo de la carga neta, que es tener en cuenta el aminoácido básico histidina $(K + R + H) - (D + E)$; sin embargo, se ha observado que esta alternativa es menos exacta. De la misma forma que la regla 11/25, la regla de la carga neta presenta una gran especificidad para la clasificación de variantes X4-trópicas, aunque una baja sensibilidad^{20,21}.

La combinación de reglas tan sencillas como la 11/25 y la carga neta puede mejorar en el valor predictivo de estas sencillas herramientas genotípicas como demuestran los resultados presentados recientemente por Delobel et al²¹.

El estudio de la variabilidad natural en secuencias de V3 y su asociación con los fenotipos R5-trópicos o X4-trópicos ha permitido la identificación de nuevos residuos y patrones de aminoácidos en esta región relacionados con el tropismo viral por los receptores de quimiocinas. Con los datos obtenidos y a través de la utilización de sofisticados métodos estadísticos (*support vector machines* [SVM], *position specific scoring matrices* [PSSM]) se han diseñado diferentes algoritmos de interpretación que permiten predecir el uso del correceptor del VIH basándose en la secuencia genética de la región V3 de un determinado aislado viral^{17,22,23}. Algunos de ellos se encuentran disponibles en páginas web de libre acceso como son WetCat, geno2pheno_{coreceptor} y WebPSSM que describimos a continuación (tabla 2).

WetCat

Es un servidor desarrollado por la Universidad de California²⁴. El servidor WetCat ofrece la posibilidad de utilizar diferentes herramientas genotípicas que utilizan distintos métodos estadísticos para hacer sus predicciones, como son: la carga neta, C4.5, C4.5p8p12, PART y SVM.

TABLA 2. Páginas web de acceso público que predicen el uso del correceptor del VIH basándose en la secuencia genética de la región V3

WetCat	www.genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/v3.html
Geno2pheno _{coreceptor}	www.geno2pheno.org
WebPSSM	www.ubik.microbiol.washington.edu/computing/pssm

En este caso la predicción del tropismo viral se obtiene a partir de la secuencia de aminoácidos de la región V3 de la muestra problema en un formato específico que se describe en la página web, con el fin de que las secuencias problemas estén alineadas con la secuencia consenso para posteriormente hacer la predicción. Esto supone una importante desventaja para esta herramienta, ya que además de ser un proceso laborioso y manual puede llevar a cometer errores. Una de las ventajas que presenta WetCat para el usuario es que permite hacer predicciones conjuntas de varias secuencias de V3. La base de datos en la que WetCat basa sus predicciones está compuesta por un total de 292 secuencias de V3: 168 secuencias que se corresponden con un fenotipo R5, 103 con un fenotipo X4 y 21 secuencias con fenotipo R5X4, obtenidas de la base de datos de Los Álamos. La inclusión de nuevas secuencias de V3 con el correspondiente dato fenotípico podría mejorar en gran medida la capacidad de predicción de esta herramienta.

WebPSSM

Ha sido desarrollado en la Universidad de Washington y realiza sus predicciones a partir de la secuencia de aminoácidos en formato FASTA de la región V3 utilizando el método estadístico PSSM²⁵. En este caso no es necesario manipular la secuencia de aminoácidos de la región V3 como en el caso anterior, ya que el programa incluye un algoritmo que realiza directamente el alineamiento de las secuencias problema con la secuencia consenso antes de hacer las predicciones. El usuario del programa puede elegir entre varias matrices para hacer las predicciones: la matriz R5X4 y la matriz SINSI para subtipo B y la matriz SINSI para subtipo C. La matriz R5X4 basa sus predicciones en un conjunto de 213 secuencias de V3 subtipo B: 168 secuencias con fenotipo R5, 17 con fenotipo X4 y 28 con fenotipo R5X4. La matriz SINSI está formada por 257 secuencias de V3: 70 secuencias corresponden a un fenotipo SI y 187 a un fenotipo NSI. Para predecir el tropismo viral en secuencias V3 subtipo C, webPSSM dispone de una matriz SINSI formada por 279 secuencias de V3 subtipo C: 228 se corresponden a un fenotipo NSI y 51 a un fenotipo SI²⁶. Al igual que WetCat, webPSSM permite analizar conjuntamente diferentes secuencias de V3.

Geno2pheno_{coreceptor}

Se ha desarrollado conjuntamente entre la Universidad de Colonia y el Instituto Max-Planck de Alemania²⁷. El método estadístico que utiliza para hacer sus predicciones es SVM. Geno2pheno puede realizar las predicciones tanto a partir de la secuencia de nucleótidos como de aminoácidos de la región V3. Una de las desventajas de este método es que no permite analizar múltiples secuencias simultáneamente, de manera que las secuencias V3 problema deben introducirse de forma individual. La base de datos en la que basa geno2pheno sus predicciones consiste en un total de 1100 secuencias de V3: 769 secuencias de V3 que se corresponden con un fenotipo R5, 210 con un fenotipo X4 y 131 secuencias con fenotipo R5X4, principalmente obtenidas de la base de datos de Los Álamos. La mayoría de estas secuencias son subtipo B, aunque también incluye algunas secuencias de otros subtipos genéticos. Una novedad incluida en la última versión de geno2pheno es la posibilidad de introducir datos clínicos

como la carga viral, número de CD4 y la presencia o ausencia de la delección de 32 pares de bases para el receptor CCR5, con el fin de mejorar las predicciones.

Herramientas fenotípicas disponibles para la determinación del tropismo viral

Para describir los ensayos fenotípicos podemos realizar una estratificación en función de la sucesión de metodologías utilizadas cronológicamente. Los primeros ensayos fenotípicos se realizaron en los años ochenta. Si bien es cierto que este tipo de ensayos se limitaba principalmente a investigación y establecieron importantes resultados, como la relación entre el tropismo viral y la historia natural de la infección. De manera que en primoinfección el tropismo viral es esencialmente un tropismo R5, mientras que en estadios más avanzados de la enfermedad el tropismo es principalmente dual R5X4 o X4. Actualmente este tipo de ensayos ha pasado a tener un papel principal en tanto en cuanto es necesario conocer el tropismo viral antes de iniciar cualquier pauta con antagonistas de correceptores.

Ensayos clásicos

Este tipo de ensayos constituye uno de los más representativos por ser esencialmente los primeros y más utilizados. El ejemplo más representativo es el método MT-2²⁸ (fig. 1). El ensayo permite determinar el efecto citopático de los aislados del VIH y de esta manera establecer la clasificación de virus sincitiales (SI) que actualmente se denominan virus CXCR4 o virus con tropismo dual R5X4 y los no sincitiales (NSI), denominados CCR5^{29,30}. El método está basado en la expresión única de CXCR4 pero no de CCR5 en la superficie de este tipo celular. La principal limitación del método consiste la generar *stocks* virales a partir de células de sangre periférica (PBMC) de pacientes. En la actualidad el método MT-2 prácticamente está en desuso para la determinación de tropismo en muestras de pacientes susceptibles al tratamiento con antagonistas de correceptores.

Ensayos con virus recombinantes

Es precisamente el desarrollo de una nueva familia de fármacos, los antagonistas de correceptores, lo que ha generado la necesidad de disponer de pruebas que permitan determinar el tropismo viral antes de indicar el tratamiento con este tipo de fármacos. Limitado el uso de metodologías clásicas comentadas anteriormente, son los ensayos basados en la generación de virus recombinantes los que constituyen uno de los principales abordajes metodológicos para el diseño de nuevos ensayos en la determina-

ción de tropismo viral. Básicamente este tipo de ensayo consiste en amplificar el gen de la envuelta del VIH del plasma del paciente y generar virus recombinantes que portan este gen y que son utilizados para infectar líneas celulares que expresan el receptor CD4 y el correceptor CCR5 o CXCR4 lo que determinará el tropismo del virus.

A pesar de las ventajas de este tipo de metodologías, alguno de los ensayos hasta ahora desarrollados (tablas 1 y 3) presenta una limitación principal relacionada con el umbral de sensibilidad. Este aspecto es «clave» para la indicación del antagonista, ya que los pacientes portadores de variantes X4, en poblaciones mixtas/duales o puras quedarían descartados a la indicación del MVC. La sensibilidad de la técnica, por tanto, es esencial para la correcta indicación de los antagonistas de correceptores. En este sentido, un paciente puede ser tratado con antagonistas de CCR5, ante un resultado de tropismo R5, y existir una emergencia de variante X4 preexistente en la muestra basal que no fue detectada. Esta no detección de variantes minoritarias en torno a un 5-10% desencadenará un fracaso terapéutico evitable usando un método de sensibilidad para detectar poblaciones minoritarias en torno al 1%. Es precisamente este aspecto en el que se está trabajando en los sistemas disponibles, comerciales o no, y en los que se encuentran en desarrollo.

Actualmente existen diferentes métodos basados en la generación de virus recombinantes. La principal característica por la que podrían diferenciarse estos métodos (tabla 3) recae en la posibilidad de generar virus recombinantes de ciclo múltiple o ciclo. Según esta clasificación los métodos de ciclo múltiple estarían representados por el ensayo PhenoX-R (InPheno AG, Basilea, Suiza)³¹ (fig. 2A), que deriva del método PhenoTect para la determinación de resistencias a antirretrovirales, y el método de Virco® type HIV-1 (Virco BVBA, Mechelen, Bélgica)³² (fig. 2B). A esta familia se ha incorporado recientemente un ensayo desarrollado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y la Fundación FIPSE (Tropitest VIH)³³, que se describe más adelante (fig. 2E). El resto, Trofile™ (Monogram Biosciences, San Francisco, California, Estados Unidos)³⁴⁻³⁶ (fig. 2C) y Phenoscript Env™ (VIRalliance, París, Francia), representa al grupo de los que generan virus de ciclo único (fig. 2D). La importancia de generar virus de ciclo único o múltiple tiene una repercusión importante en la sensibilidad del ensayo en tanto en cuanto estamos permitiendo al virus generar varios ciclos de replicación, lo que puede permitir la detección de poblaciones que estén en una proporción minoritaria.

PhenoX-R (InPheno AG, Basilea, Suiza)

El método combina dos tipos de ensayos, la hibridación a sondas (X-TrackC) y el método fenotípico (PhenX-R) (fig. 2A). El primero permite la identificación rápida de variantes R5 y/o X4 gracias al diseño de sondas marcadas específicas para cada variante que migra de forma diferente y permite visualizar picos en un electroferograma diferente para cada tropismo. Las muestras «dudosas» de variantes duales (R5X4) o mezcla de variantes con tropismo R5 y X4 se analizarán con el método fenotípico. Como ya se ha comentado anteriormente el método genera virus recombinantes que realizan 3-4 ciclos de replicación. La secuencia que se amplifica del gen de la envuelta del VIH del paciente corresponde a las regiones variables de la envuelta

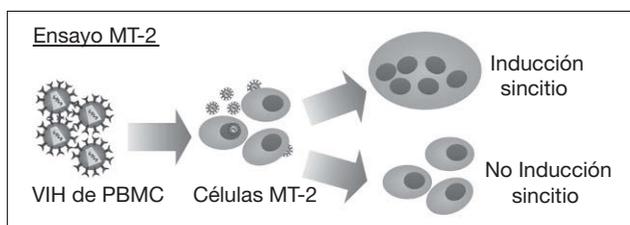


Figura 1. Método de fenotípicos MT-2.

TABLA 3. Métodos fenotípicos basados en generación de virus recombinantes

	VIRalliance Phenoscript	Xtrack[®]/PhenX-R In Pheno AG	Virco NH₂-V4 gp120	Monogram Biosciences Trofile[™]	ISCHII-FIPSE, TropiTest
Amplicón	V1-V3 gp120 (900 pb)	V1-V3 (1,1 kb)	NH ₂ -V4 gp120 (1,3 kb)	gp160 (2,5 kb)	gp160 (2,5 kb)
Vector	pNL4-3 defectivo en V1-V3	pNL4-3 defectivo env	pHXB2D-ΔNH2-V4-eGFP	pCAX-PXMX (expresión env) + RTV1.F-lucP. CND0δU3	pNL4-3-lacZ/env-Ren
Construcción vector	Recombinación homóloga	Clonación	Recombinación	Clonación	Clonación
Células productoras	HEK 293	HEK 293	HEK 293	HEK 293	HEK 293
Células diana	U373-CD4-CCR5 U373-CD4-CXCR4	CXCR4 CCR5/CXCR4	U87.CD4.CCR5 U87.CD4.CXCR4	U87.CD4.CCR5 U87.CD4.CXCR4	U87/Ghost/PBMc CD4.CCR5U87/Ghost/PBMc CD4.CXCR4
Gen marcador	β-galactosidasa	β-galactosidasa	GFP	Luciferasa	Luciferasa
Replicación	Ciclo único	Ciclo múltiple	Ciclo múltiple	Ciclo único	Ciclo múltiple
Detección variantes minoritarias	5-10%	1%	5-10%	5-10%	< 1%

V1-V3 que se clonan en un vector NL4.3 que tiene deletado el gen de la envuelta y el clon proviral generado se transfecta a células Tat-LacZ que expresan X4 o X4/R5.

La principal ventaja del sistema es la generación de virus recombinantes que realizan 3-4 ciclos de replicación lo que permite una mayor sensibilidad para la detección de variantes minoritarias. Otra ventaja del sistema sería la capacidad de discernir entre variantes duales o mezcla de variantes de diferente tropismo. Los tiempos son relativamente óptimos, se requieren de 4 días para el ensayo de hibridación y 14 días para el ensayo los cuales estarían dentro de los tiempos estimados para la realización de los métodos fenotípicos. La principal limitación está de acuerdo con la limitación descrita para todos los métodos fenotípicos y que tiene que ver con la necesidad de laboratorios de nivel 3 y personal altamente cualificado (tabla 1).

Virco[®] type HIV-1 (Virco BVBA, Mechelen, Bélgica)

Virco ha desarrollado una plataforma de 4 métodos que permiten la determinación del tropismo viral³³ de forma cualitativa (predicción del genotipo basado en la secuencia genotípica de V3 o en el fenotipo de la región NH₂-V4 gp120, ambos estudios realizados en población) y cuantitativa (análisis clonal de la región NH₂-V4 gp120 por secuenciación o en el ensayo fenotípico). Todos ellos requieren de una amplificación previa por RT-PCR y la utilización de cada uno depende del objetivo del estudio. El método fenotípico consiste en la recombinación *in vitro* de un vector pHXB2D-ΔNH2V4-eGFP y el producto amplificado de la región NH2-V4 del virus del paciente. La construcción se transforma y se transfectan células 293T para la producción de virus recombinantes (fig. 2B). Este *stock* de virus recombinantes se utiliza para infectar células U87-CD4 que expresan el receptor CXCR4 o CCR5. El resultado del tropismo viral viene determinado por el nivel de GFP que se obtiene en cada tipo celular.

La ventaja principal del sistema recae, como en el caso anterior, en la obtención de virus que realizan más de un ciclo de replicación. Aunque el sistema permite la detección de poblaciones minoritarias, en torno a un 5-10% en

muestras de pacientes con viremia superior a 4 log U/ml³⁴ (aprox. 2.000 copias/ml), se requiere de ensayos en muestras de pacientes con viremias de 2 log U/ml (aprox. 20 copias/ml) y también estudios más amplios para evaluar muestras de diferente subtipo.

En una visión práctica de su sistema, Virco plantea generar un algoritmo (similar al que generaron para fenotipo virtual para resistencias a antirretrovirales) basado en la predicción del fenotipo según las secuencias generadas de NH₂-V4 gp120 de estudios clonales.

Trofile[™] and Trofile[™] ES (Monogram Biosciences, San Francisco, California, Estados Unidos)

Es uno de los métodos basados en la generación de virus recombinantes de ciclo único^{35, 36, 37} (fig. 2C). Actualmente es el único método validado y, por tanto, utilizado para la determinación del tropismo viral en las muestras de pacientes candidatos a tratamiento en uso compasivo del MVC.

El método requiere la amplificación del gen de la envuelta del virus del paciente. El producto amplificado liga con un vector del VIH que porta el gen de expresión de la luciferasa. El producto resultante se cotransfecta con un vector de expresión de envuelta en células 293. La producción viral obtenida es utilizada para infectar células U87 que expresan CXCR4 o CCR5. El resultado, obtenido aproximadamente en 16 días, se mide por la luz y es controlada por la presencia del antagonista (fig. 2C). A pesar de ser elegido como método para la determinación del tropismo viral en los ensayos clínicos, los últimos resultados han revelado una deficiencia a la hora de detectar poblaciones minoritarias. Consciente de su limitación, en el 17.º congreso internacional de resistencias celebrado en Sitges se ha presentado la validación de una nueva versión de este sistema en la que se ha conseguido aumentar el nivel de sensibilidad para detectar variantes minoritarias X4 o R5X4 en torno al 0,3%³⁸.

El hecho de haber sido elegido para evaluar el tropismo de la gran mayoría de ensayos clínicos le ha permitido no sólo ser el primer método validado, sino que ha demostrado su capacidad para la detección de diferentes subtipos como el A, B, C, D, E y EA.

Una característica importante que hay que tener en cuenta en este método es que se amplifica la envuelta completa del VIH del paciente. Este aspecto es relevante ya que, aunque algunos autores aseguran que es la región V3 la principal responsable del tropismo viral, existen otras regiones en la envuelta que han demostrado jugar un papel en el tropismo viral.

HIV-1 Phenoscript Env™ (VIRalliance, París, Francia)

Se trata de un ensayo para inhibidores de la entrada que permite evaluar la susceptibilidad del VIH a estos nuevos fármacos, así como el tropismo viral. El fragmento a amplificar va a ser diferente dependiendo del ensayo que realizar. De manera que en el caso de la determinación de

tropismo y resistencia a inhibidores de la entrada se amplifica una secuencia de la envuelta de 2.180 pb o la región V1-V3 del gen de la envuelta (900 pb) si únicamente se quiere determinar el tropismo viral³⁹. El producto amplificado se clona en un plásmido pNL4-3 que tiene deletado el gen de la envuelta, en concreto gp120 y el ectodominio de gp41, posiciones 6480-8263. La replicación de los virus recombinantes se producen en las células HEK293 por recombinación homóloga (fig. 2D). Este stock infecta células U373MG-CD4 que expresan CCR5 o CXCR4 y contienen la *cassette* LTR-lacZ que permite la cuantificación de la infección única mediante un resultado colorimétrico basado en la expresión de β-galactosidasa inducida por Tat.

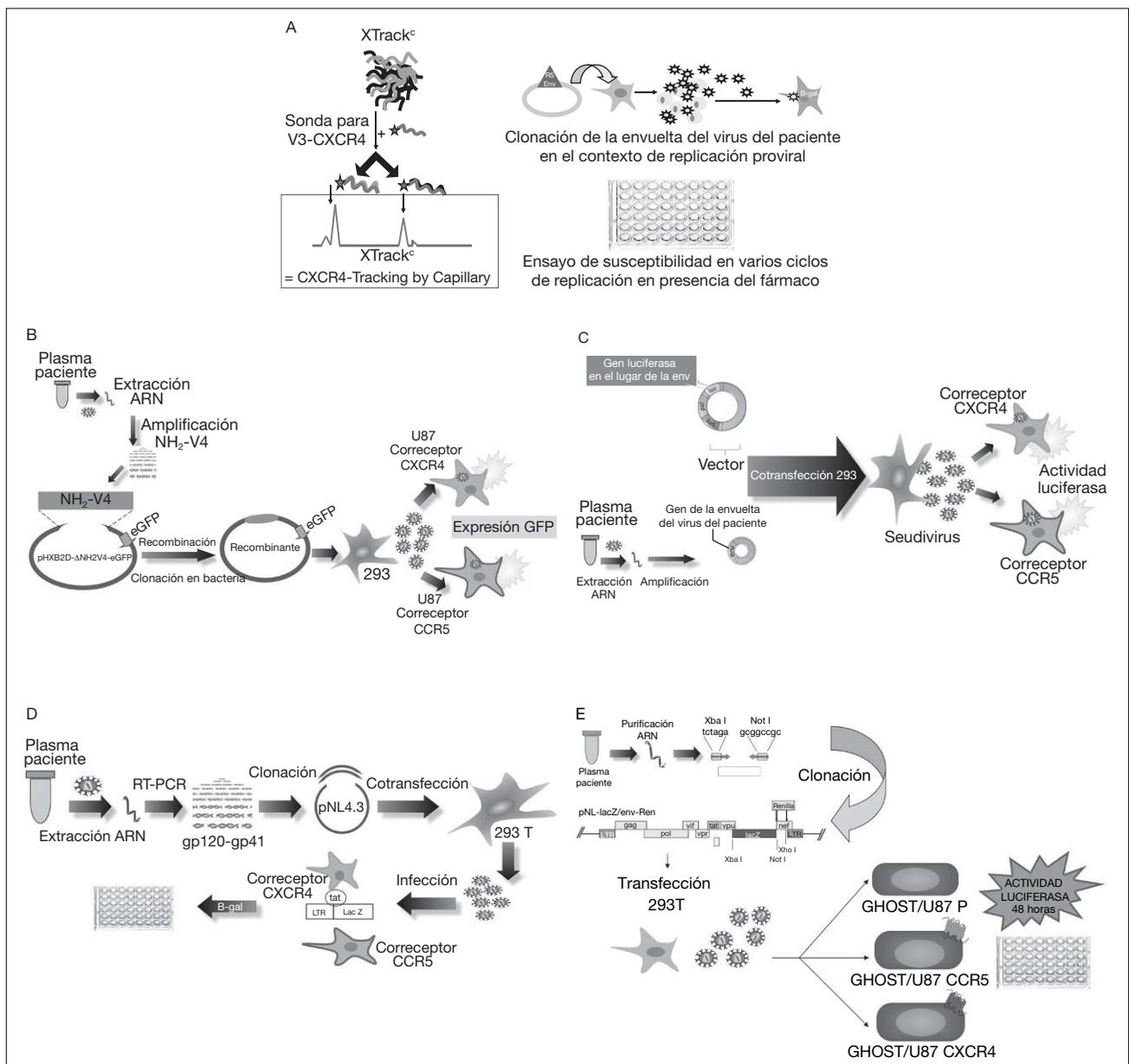


Figura 2. Métodos fenotípicos basados en varios recombinantes. A: principio del ensayo X-TrackC-Phen o X-R. Figura modificada del Método del Pheno X-R de InPheno. B: método Virco® type HIV-1 de Virco. C: método de Trofile™ de Monogram Biosciences. D: método de Phenoscript Env™ de VIRalliance. E: método TropiTest desarrollado por ISCIII-FIPSE (Unidad de inmunopatología. Instituto de Salud Carlos III).

El principio del ensayo es muy similar al método de Trofile aunque difiere en la detección del resultado. La sensibilidad para la detección de variantes minoritarias es del 5% y los resultados presentan una buena reproducibilidad. Una de las limitaciones que comparte con los otros métodos que requieren de una amplificación previa es la incapacidad de amplificación en muestras de pacientes que presentan viremias inferiores a 2 log U/ml.

TropiTest VIH (Unidad de Inmunopatología, Instituto de Salud Carlos III-FISPE, Madrid)

Recientemente, se ha patentado un sistema basado en la generación de virus recombinantes con diferentes aplicaciones, una de las cuales está dedicada a la determinación del tropismo viral³³.

En el diseño de este método la estrategia radica principalmente en la amplificación completa del gen de la envuelta del VIH del paciente; por otro lado, se ha generado un vector que contiene el genoma del VIH a excepción de la envuelta y el gen de expresión luciferasa. El clon proviral generado porta la envuelta del virus del paciente, el resto de los genes del VIH y el gen de expresión de luciferasa. Este clon proviral se transfecta a células 293T que generan una producción de virus recombinantes que se utiliza para infectar células U87-CD4 con diferente expresión de correceptores.

La principal ventaja de este sistema es precisamente que los virus recombinantes que se generan son virus de ciclo múltiple, lo que permite bajar el umbral de sensibilidad para la detección de poblaciones minoritarias a < 1%. Otra ventaja que es compartida con el método de trofile es que amplifican el gen completo de la envuelta.

Existen en marcha estudios en muestras clínicas que van a permitir validar el sistema y, por tanto, si la validación resulta positiva, será considerado un nuevo candidato a la determinación del tropismo viral. Poder disponer de un método que presenta las ventajas de los métodos anteriores y mejora las limitaciones de otros métodos puede tener una repercusión importante, entre otros, por el coste de la determinación que disminuiría considerablemente.

Otros ensayos

Sensi-Trop™ HIV Co-Receptor Tropism Assay (Pathway Diagnostics, Malibú, California, Estados Unidos)

El método Sensi-Trop™ II Se basa en una mejora de un sistema desarrollado por Pathway Diagnostics ya validado. Una de las principales ventajas del sistema además de su sensibilidad es la rapidez del ensayo que se ha estimado en 2-4 días. El método ha sido presentado en el CROI celebrado recientemente en Boston.⁴⁰ En el mismo congreso se presentaron los datos de un estudio en el que se comparaban los resultados obtenidos con el método de Sensi-Trop™ y los de Trofile™.⁴¹ En este estudio Sensi-Trop™ mostró una peor sensibilidad para detectar variantes DM/X4. Recientemente, se ha comunicado una mejora en la sensibilidad del sistema que mejoraría esta sensibilidad para detectar variantes DM o X4 aunque hasta el momento no han sido publicados en ningún medio científico.

Metodológicamente se trata de una técnica de hibridación basada en la tecnología de heterodúplex para identificar la presencia de variantes X4 por la formación y separación de heterodúplex a sondas R5 trópicas. Una vez

extraído el ARN viral se realiza una reacción en cadena de la polimerasa transcripción inversa (RT-PCR) para amplificar la región V3 de la envuelta viral y se somete a condiciones de hibridación sobre sondas de ADN V3 trópicas. Finalmente, se realiza una separación por electroforesis y los heterodúplex se detectan en gel de poliacrilamida.

Correlación entre herramientas genotípicas y fenotípicas

Los ensayos fenotípicos, a partir de aislados virales primarios o virus recombinantes, se consideran actualmente las herramientas más fiables para la determinación del uso del correceptor en muestras clínicas. Sin embargo, se trata de una metodología muy sofisticada y laboriosa que requiere de instalaciones especiales y personal muy cualificado. Las herramientas genotípicas, más rápidas, sencillas de desarrollar y disponibles ampliamente en todos los laboratorios especializados en el VIH, se presentan como una interesante alternativa a la utilización de los ensayos fenotípicos.

Actualmente existe un gran interés en conocer la exactitud de las herramientas genotípicas para la determinación del uso del correceptor en muestras clínicas y evaluar su posible utilización para tomar decisiones terapéuticas con relación a la prescripción de maraviroc (MVC) o futuros antagonistas de CCR5.

Recientemente se han presentado diferentes estudios en los que se comparan herramientas genotípicas y fenotípicas para la determinación del tropismo viral. Low et al¹⁸ determinaron el tropismo viral utilizando diferentes algoritmos genotípicos en 977 muestras clínicas de pacientes *naive* a tratamiento antirretroviral en las que previamente se había determinado el tropismo utilizando el ensayo fenotípico de Trofile (Monogram Biosciences, CA, Estados Unidos). Aunque las herramientas genotípicas presentaron una alta especificidad (88-97%) para la identificación de variantes X4-trópicas, la sensibilidad fue muy baja (22-45%). Sin embargo, estudios posteriores realizados en otros grupos de pacientes y utilizando otros ensayos fenotípicos han demostrado una mejor sensibilidad para la detección de variantes X4 utilizando métodos genotípicos específicos^{17,18,40}. De estos estudios se ha concluido que los mejores resultados de sensibilidad y especificidad para la detección de variantes X4-trópicas se obtienen en pacientes pretratados infectados con subtipos B, siendo webPSSM el método genotípico que presenta los mejores resultados de concordancia. Sin embargo, parece que las herramientas genotípicas son menos sensibles para la detección de variantes X4-trópicas en muestras clínicas de pacientes infectados con subtipo no-B.

Una de las limitaciones de los métodos genotípicos, con respecto a los fenotípicos, tiene que ver con la identificación de las variantes duales R5X4, que pueden clasificarse como dual-R o dual-X, dependiendo del correceptor que utilizan las variantes virales con mayor eficiencia. Mientras que los métodos fenotípicos son capaces de diferenciar entre el fenotipo dual-R y dual-X, genotípicamente estas variantes serían clasificadas como R5-trópicas y X4-trópicas, respectivamente. Sin embargo, hasta el momento no hay datos suficientes acerca del impacto clínico de la presencia de variantes dual-R en la respuesta a MVC.

La utilización de herramientas genotípicas para la determinación del tropismo en la práctica clínica necesita de mejoras y de la realización de evaluaciones adicionales que comparen herramientas genotípicas y las fenotípicas en un amplio número de muestras clínicas para finalmente decidir si estas herramientas podrían ser utilizadas para tomar decisiones terapéuticas.

Conclusión

La determinación del tropismo viral está indicada antes de la prescripción de MVC en pacientes VIH positivos con el fin de asegurar la eficacia virológica de este nuevo fármaco. Aunque los ensayos genotípicos son los métodos de elección en la evaluación de la resistencia a los fármacos antirretrovirales, en la determinación del tropismo los métodos fenotípicos, en concreto el método de Trofile™, es el único aprobado actualmente para uso clínico. Existen otros métodos fenotípicos pendientes de ser validados y que podrían competir con Trofile™, ya que han demostrado presentar una sensibilidad parecida para la detección de variantes X4-tropicas asociadas a fracaso terapéutico con MVC. Los estudios de correlación entre herramientas genotípicas y fenotípicas nos indican que las herramientas genotípicas actuales necesitan de mejoras y de la realización de evaluaciones clínicas adicionales de su introducción en la práctica clínica. De la misma forma, queda por evaluar la concordancia entre los diferentes métodos fenotípicos disponibles en muestras clínicas para valorar su utilización en la práctica clínica y las posibles ventajas que pueden ofrecer frente a Trofile™ que es el método de elección en la actualidad.

Declaración de conflicto de intereses

Las autoras han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Poveda E, Briz V, Quinones-Mateu M, Soriano V. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS*. 2006;20:1359-67.
- FDA approves maraviroc tablets. *AIDS Patient Care STD*. 2007;21:702.
- Mayer H, Van der Ryst E, Saag M, Clotet B, Fatkenheuer G, Clumeck N, et al. Safety and efficacy of maraviroc, a novel CCR5 antagonist, when used in combination with optimized background therapy for the treatment of antiretroviral-experienced subjects with dual/mixed-tropic HIV-1:24-week results of a phase 2b exploratory trial. XVI International AIDS Conference. Toronto, Canada, 2006 [abstract THLB0215].
- Heera J, Saag M, Ive P, Whitcomb J, Lewis M, McFadyen L, et al. Virological correlates associated with treatment failure at week 48 in the phase 3 study of Maraviroc in treatment-naïve patients. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, MA, 2008 [abstract 40LB].
- Whitcomb J, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine HIV type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:566-75.
- Briz V, Poveda E, Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:619-27.
- Comier E, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in HIV type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol*. 2002;76:8953-7.
- Chan S, Speck R, Power C, Gaffen S, Chesebro B, Godsmith M. V3 recombinants indicate a central role for CCR5 as coreceptor in tissue infection by HIV type 1. *J Virol*. 1999;73:2350-8.
- Jensen M, Van't Wout A. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev*. 2003;19:145-9.
- Biscione M, Miamidian J, Muchiri J, Baik S, Lee F, Doms R, et al. Functional impact of HIV coreceptor-binding site mutations. *Virology*. 2006;351:226-36.
- Hwang S, Boyle T, Lyerly H, Cullen B. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science*. 1991;253:71-4.
- Berger E, Doms R, Fenyo E, Korber B, Litman F, Moore J, et al. A new classification for HIV-1. *Nature*. 1998;391:240.
- De Jong J, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Huisman H, Miedema F, et al. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol*. 1992;66:6777-80.
- Fouchier R, Groenink M, Kootstra N, Tersmette M, Huisman H, Miedema F, et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol*. 1992;66:3183-7.
- Isaka Y, Sato A, Miki S, Kawachi S, Sakaida H, Hori T, et al. Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology*. 1999;264:237-43.
- Jensen M, Van't Wout A. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev*. 2003;5:104-12.
- Seclén E, Poveda E, Garrido C, Roulet V, Skrabal K, Faudon J, et al. High sensitivity to detect X4 variants using specific genotypic tools in antiretroviral-experienced HIV patients suitable to CCR5 antagonists therapy. 6th European HIV Drug Resistance Workshop. Budapest, 2008 [abstract 84].
- Low A, Dong W, Chan D, Sing T, Swanstrom R, Jensen M, et al. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS*. 2007;1:F17-24.
- Cardozo T, Kimura T, Philpott S, Weiser B, Burger H, Zolla-Pazner S. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2006;23:415-26.
- Briggs D, Tuttle D, Sleasman J, Goodenow M. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS*. 2000;14:2937-9.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, et al. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1572-80.
- Hoffman N, Sillier-Moisewitsch F, Anh J, Walker J, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol*. 2002;76:3852-64.
- Pillai S, Good B, Richman D, Corbeil J. A new perspective on V3 phenotype prediction. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19:145-9.
- Jensen M, Li F, Van't Wout A, Nickle D, Shriner D, He H, et al. Improved co-receptor usage prediction and genotypic monitoring of R5 to X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol*. 2003;77:13376-88.
- Jensen M, Coetzer M, Van't Wout A, Morris L, Mullins J. A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol*. 2006;80:4698-704.
- Sing T, Low A, Beerenwinkel N, Sander O, Cheung P, Domingues F, et al. Predicting HIV co-receptor usage based on genetic and clinical covariates. *Antivir Ther*. 2007;12:1097-106.
- Poveda E, Briz V, Roulet V, Del Mar Gonzalez M, Faudon J, Skrabal K, et al. Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatics tools for determining HIV coreceptor use. *AIDS*. 2007;21:1487-90.
- Louder M, Mascola J. Determination of syncytium-inducing phenotype of primary HIV-1 isolates using MT-2 cells. En: Nelson M, Kim JH, editors. *HIV protocols*. New York: Human Press; 1999. p. 23-7.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature*. 1998;15:391:240.
- Soda Y, Shimizu N, Jinno A, Liu HY, Kanbe K, Kitamura T, et al. Establishment of a new system for determination of coreceptor usages of HIV based on the human glioma NP-2 cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258:313-21.
- Hamy F, Vidal V, Hubert S, Klimkait T. Hybridization-based assay and replicative phenotyping as diagnostic platform for determination of coreceptor tropism. 5th European HIV Drug Resistance Workshop; 2007 [abstract 60].
- Van Baelen K, Vandenbroucke I, Rondelez E, Van Eygen V, Vermeiren H, Stuyver L. HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J Virol Methods*. 2007;146:61-73.
- Van Eygen V, Rondelez E, Van Baelen K, Vandenbroucke I, Stuyver L. Sensitivity of a clonal genotypic and population based phenotypic HIV-1 tropism testing platform. 5th European HIV Drug Resistance Workshop; 2007 [abstract 78].

34. González N, Pérez-Olmeda M, García-Pérez, Mateos E, Cascajero J, Álvarez A et al. Evaluation of HIV-1 tropism using a new and sensitive system based in recombinant viruses. XVII International HIV Drug Resistance Workshop. Sitges, Spain, June 10-14; 2008 [abstract 89].
35. Huang W, Wrin M, Yap J, Fransen S, Beauchaine J, Reddy M, et al. A rapid multi-factorial HIV-1 entry assay for measuring drug susceptibility, coreceptor tropism and antibody neutralization. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy. Chicago; 2001 [abstract 1968].
36. Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:566-75.
37. Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, et al. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol.* 2007;45:279-84.
38. Trinh L, Han D, Huang W, Wrin T, Larson J, Kiss L, et al. Technical validation of an enhanced sensitivity Trofile HIV coreceptor tropism assay for selecting patients for therapy with entry inhibitors targeting CCR5. XVII International HIV Drug Resistance Workshop. Sitges, Spain; June 10-14, 2008 [abstract 118].
39. Poveda E, Rodés B, Labernardiére JL, Benito JM, Toro C, González-Lahoz J, et al. Evolution of genotypic and phenotypic resistance to Enfuvirtide in HIV-infected patients experiencing prolonged virologic failure. *J Med Virol.* 2004;74:21-8.
40. Wenhui Li, Webb E, Nari L and Robins T. SensiTrop QT: A Novel Molecular Diagnostic Assay for the Detection and Quantification of HIV Co-receptor Tropism. Abstract 919. 15th conference on retroviruses and opportunistic infectious, Boston 3-6 feb 2008.
41. Tressler R, Valdez H, van der Ryst E, James I, Lewis M, Wheeler J and S Than. Comparison of Results from the SensiTrop™ vs Trofile™ Assays on 100 Samples from the Maraviroc Expanded Access Program. Abstract 920. 15th Conference on retroviruses and opportunistic infectious, Boston 3-6 feb 2008.
40. Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, et al. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different HIV-1 subtypes. *J Clin Microb.* 2008;61:694-98.