



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**ACORRALAMIENTO DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA:
APROVECHANDO INTERACCIONES ENTRE PRESIONES SELECTIVAS
OPUESTAS EN LA REGIÓN POL PR-RT**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
JUAN BLANCO HEREDIA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. GUSTAVO REYES TERÁN
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR:
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
FACULTAD DE MEDICINA**

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi madre
Maria Guadalupe Heredia Paredes,
a quién le debo todo...

AGRADECIMIENTOS

Dr. Gustavo Reyes Terán, tutor principal, aprecio la invaluable oportunidad de trabajar en éste increíble grupo que es el CIENI, por confiar e invertir en mi y hacerme crecer como investigador.

Dr. Santiago Ávila Ríos, el mejor mentor que pude tener, éste trabajo no existiría sin las infinitas horas que pacientemente me dedicaste.

Al LDV y toma de muestra, especialmente a Ramón Hernández, Edna Rodríguez, Carolina Demeneghi, Mario Preciado, Silvia del Arenal y Raymundo González.

A los clínicos del CIENI, especialmente a Akio Murakami, María Gómez-Palacio y Karla Romero.

Al equipo administrativo del CIENI, en especial Zeidy Arenas y Sandra Zamora.

Al grupo de investigación, en especial Olivia Briceño, Humberto Valenzuela y Daniela Garrido.

Al Dr. Douglas Nixon quien es un guía y apoyo excepcional, así como a André Raposo y Miguel de Mulder.

A las personas involucradas en mi estancia en el IrsiCaixa de Barcelona, en especial Dr. Christian Brander, Anuska Llano y Javier Ibarrondo.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, sede de realización del presente proyecto.

Dr. Enrique Ortega Soto y Dr. Gilberto Vargas Alarcón por su asesoría académica como parte de mi comité tutorial.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por su apoyo para la realización de este proyecto.

A CONACyT por su apoyo económico (Becario #229424).

A todos los pacientes que voluntariamente decidieron participar en la presente investigación, su contribución fue invaluable para la generación de información sobre la epidemia de VIH/SIDA en el mundo, éste trabajo es suyo.

Este trabajo fue financiado por CONACyT (SALUD-2013-01-202475), Fundación México Vivo y la Comisión de Equidad y Género de la H. Cámara de Diputados.

Índice

0. Resumen	iv
1. Introducción	1
1.1. VIH	1
1.2. Estructura del VIH	2
1.3. SIDA	4
1.4. Origen y epidemiología molecular del VIH	6
1.5. Ciclo de replicación de VIH	9
1.6. Evolución de VIH	13
2. Planteamiento del problema	22
3. Hipótesis	23
4. Objetivo	24
5. Métodos	24
6. Resultados	32
6.1. Respuestas frecuentes observadas en epítomos DR	32
6.2. Alta proporción en el reconocimiento de epítomos DR	39
6.3. Respuestas inmunes no correlacionan con presencia viral	43
7. Discusión	48
8. Conclusiones	53
9. Perspectivas	54
10. Referencias	55
11. Anexos	66

0. RESUMEN

Antecedentes: Las vacunas terapéuticas contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), además de intensificar el tratamiento antirretroviral, podrían llegar a ser parte integral de las futuras estrategias para erradicar la infección.

Métodos: Se examinaron las respuestas anti-interferón gamma por ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos, conocido como ELISpot, en un panel con 218 péptidos de VIH basados en el consenso del subtipo B, diseñados para emular epítomos de linfocitos T citotóxicos o CTL, previamente descritos y predichos que sobrelapan posiciones de mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales, los cuales incluyeron tanto a la secuencia consenso como a la secuencia con la mutación de resistencia, en 49 individuos infectados con VIH sin tratamiento antirretroviral previo. Se utilizó secuenciación masiva de siguiente generación para evaluar la presencia de variantes minoritarias con mutaciones de resistencia en las poblaciones virales circulantes.

Resultados: Las respuestas a los péptidos con mutaciones de resistencia a fármacos fueron fuertes y frecuentes. No se encontró diferencia entre las medianas de las magnitudes de respuesta de los péptidos con mutaciones y los péptidos consenso. Interesantemente de los 22 péptidos reconocidos por mas del 15 por ciento de los participantes, dos tercios corresponden a péptidos con mutaciones de resistencia. Finalmente, mientras que el reconocimiento de los péptidos consenso coincidió con la presencia del epítomo en el virus circulante, el reconocimiento de los péptidos mutados no coincide con la población viral circulante, incluso en bajas frecuencias.

Conclusión: Nuestros resultados demuestran que los péptidos con mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales son inesperadamente inmunogénicos y que se debe dar atención a su posible uso en las estrategias de control del VIH como vacunas terapéuticas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 VIH

El síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) (1, 2), producto de la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), desde su descubrimiento (3) hasta la actualidad, se ha extendido prácticamente por todo el planeta, convirtiéndose en una de las epidemias más destructivas en la historia de la humanidad; hasta ahora se calculan 35 (33.2 – 37.2) millones de personas afectadas en todo el mundo (Figura 1.1) con 2.1 millones de nuevas infecciones y 1.5 millones de muertes relacionadas al año (UNAIDS, 2015). En México se estiman 180,000 personas viviendo con VIH, 9,300 personas infectadas anualmente y aproximadamente 50% de las personas infectadas no lo saben (CENSIDA, 2015) razón por la cual, es necesario realizar estudios que proporcionen información sobre el origen, evolución y epidemiología del VIH, los cuales serán indispensables para el establecimiento de estrategias de intervención adecuadas en la población mexicana.

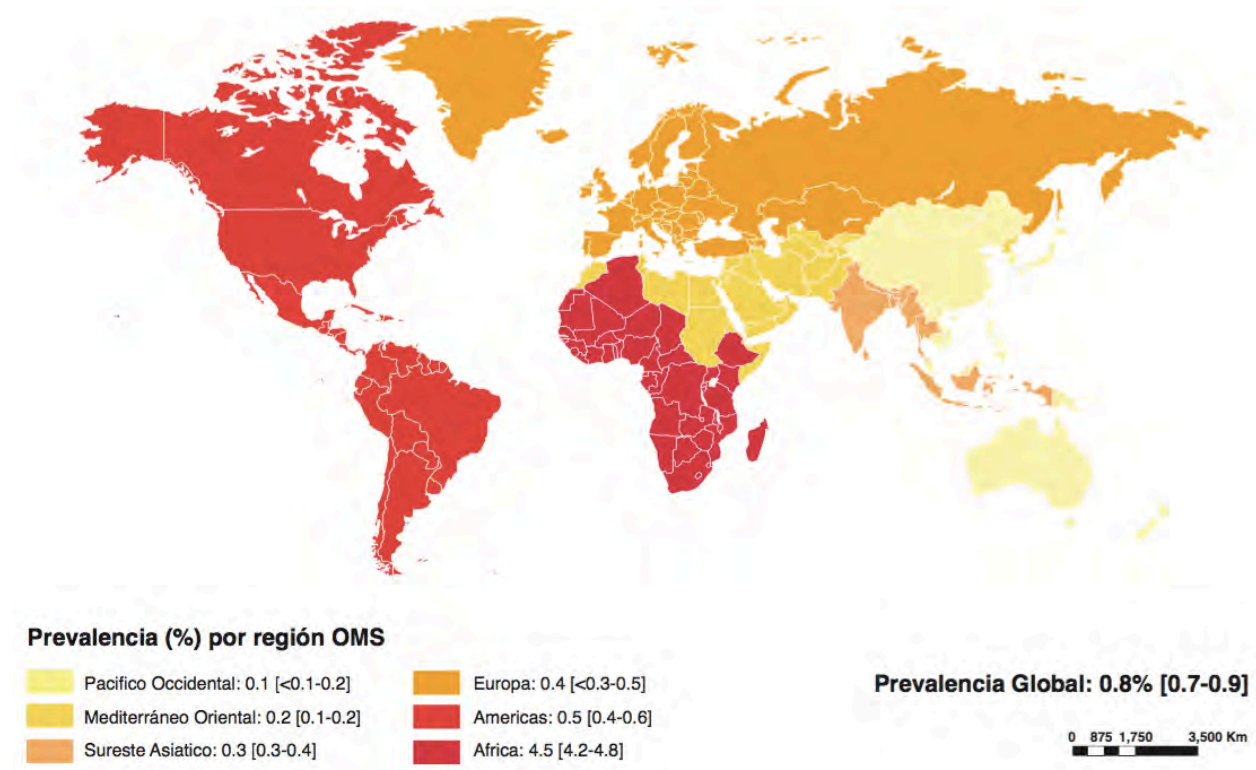


Figura 1.1 Prevalencia de adultos que viven con VIH a nivel mundial. Se considera adulto a personas entre 15 y 49 años de edad (UNAIDS, 2015).

1.2 ESTRUCTURA DEL VIH

El VIH es un virus envuelto de unos 110 nm de diámetro que contiene dos cadenas de RNA de 9,500 nucleótidos de largo. El dímero de RNA se asocia con las proteínas de la nucleocápside, p6/7. La nucleocápside a su vez se encuentra en el interior de la cápside proteica, p24, de forma cónica, la cual también contiene a las enzimas virales integrasa, proteasa y transcriptasa reversa. Ésta estructura se encuentra encapsulada por una capa de proteína matriz, p17, de simetría icosaédrica y está asociada con la bicapa lipídica que constituye la envoltura viral.

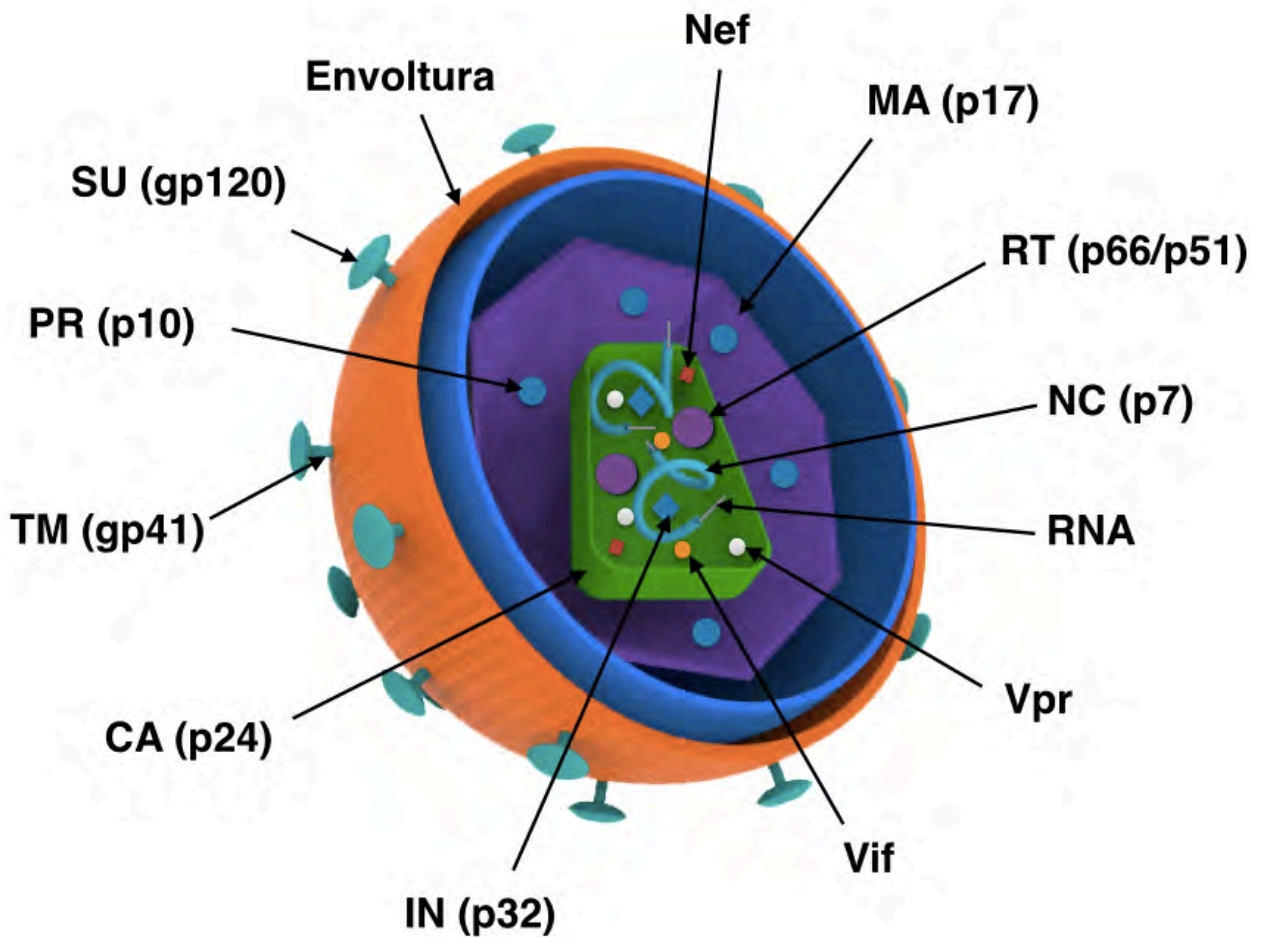


Figura 1.2 Virión de VIH. El virión con envoltura contiene dos cadenas de RNA idénticas, las cuales se relacionan con moléculas de transcriptasa reversa (p64) y proteínas de nucleótido p10, una proteasa y p32, una integrasa.

La envoltura del VIH se deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera y se obtiene cuando el virus gema a través de la membrana de la célula. Las glicoproteínas del VIH asociadas con la envoltura son gp120 y gp41.

La primera funciona como ligando de los receptores y correceptores del virus en la superficie celular, mientras que gp41 contiene el dominio de fusión que favorece la entrada de virus a la célula hospedera al permitir la unión de las membranas viral y celular. Mientras que gp41 es una proteína transmembranal, gp120 está presente sobre la superficie exterior y está unida no covalentemente a gp41. (Figura 1.2)

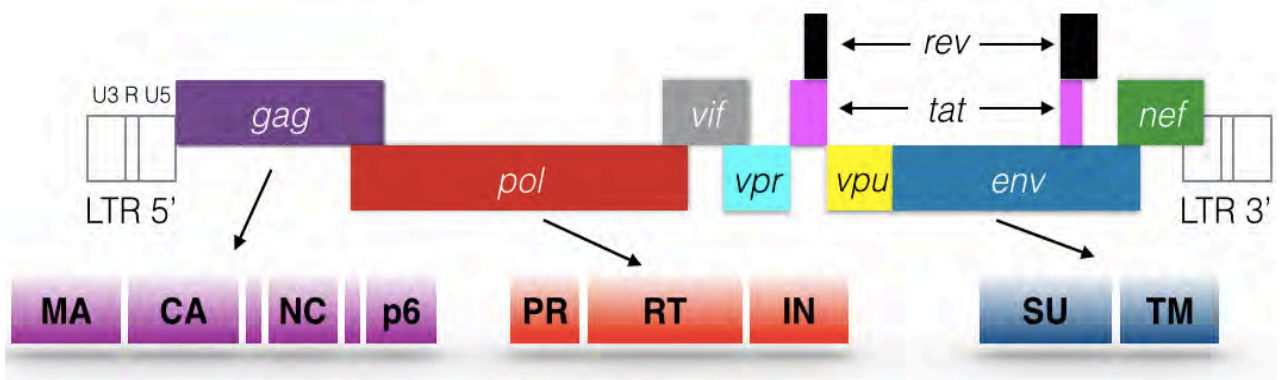


Figura 1.3 Representación esquemática de las regiones genéticas del VIH

El genoma del VIH comparte la disposición básica de secuencias de ácidos nucleicos característica de todos los retrovirus conocidos, que incluye los siguientes elementos: repeticiones terminales largas (LTR) al final de cada genoma, que regulan la integración viral en el genoma del huésped, la expresión génica del virus y la replicación viral; los genes *gag* que codifican las proteínas estructurales del core, los genes *pol* que codifican para la transcriptasa reversa, integrasa y proteasa virales requeridas para la replicación viral y los genes *env* que codifican las glicoproteínas de envoltura gp 120 y gp 41, requeridas para la infección de las células. Además de estos genes, el VIH incluye al menos seis genes reguladores, que incluyen: *vpr*, *vif*, *tat*, *rev*, *nef* y *vpu*, cuyos productos controlan la replicación viral de varias maneras. (Figura 1.3)

1.3 SIDA

A pesar de que el VIH es capaz de infectar a varios tipos de células, el SIDA resulta de la reducción de linfocitos T CD4+ que son un componente clave del sistema inmune humano. La disminución de células CD4+ en sangre típicamente se da a una velocidad de 100 células por microlitro al año, sin embargo la infección elimina rápidamente a las células que residen en las mucosas. Aunque la mayoría de las células CD4+ residen en estos sitios, la magnitud de éste ataque sobre el sistema inmune no se ve reflejado en sangre periférica (4).

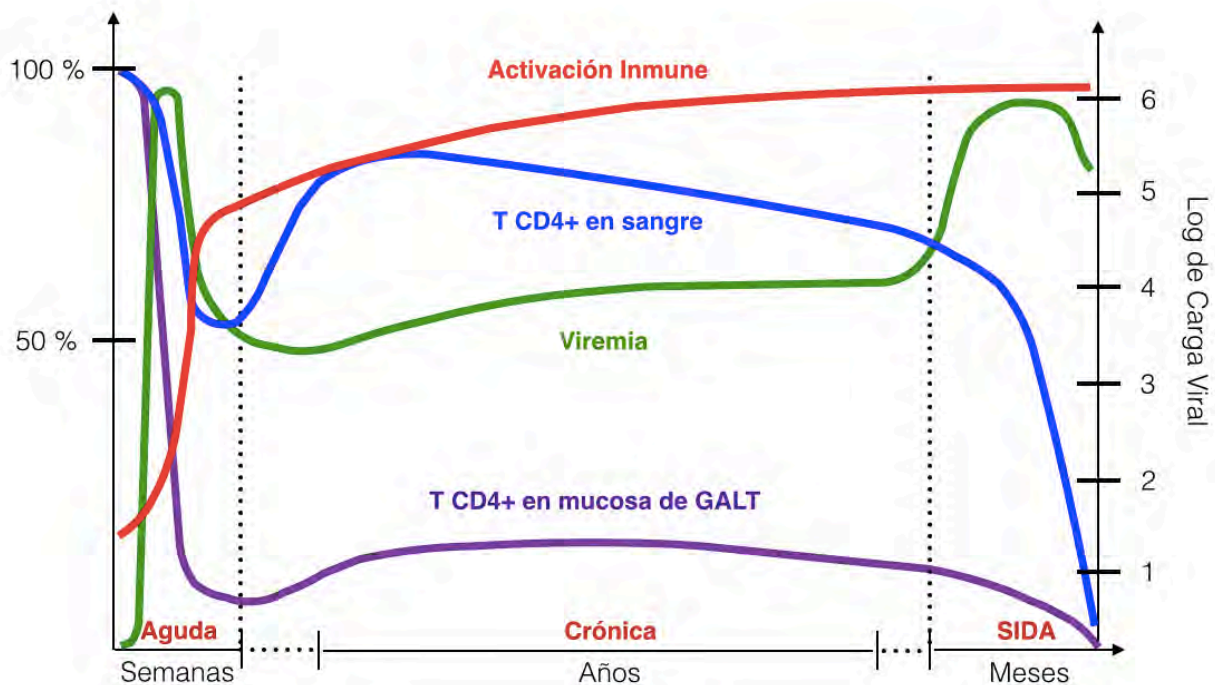


Figura 1.4 Historia natural de la infección por VIH. En esta figura se muestran esquemáticamente los cambios numéricos en células T CD4+ en mucosas y sangre, así como el nivel de viremia sobre el curso de la infección por VIH. En la fase aguda (parte izquierda), las células T en mucosa (violeta) se pierden rápidamente, la viremia (verde) alcanza rápidamente su máximo, el conteo sanguíneo de células CD4+ (azul) presenta una aguda disminución debido al secuestro en tejidos linfoides pero luego sube de nuevo a un nivel moderadamente normal. En la fase crónica el estado de activación inmune se incrementa constantemente, las células T CD4+ en mucosa permanecen bajas, los niveles de CD4+ en sangre lentamente disminuyen y la viremia aumenta, asimismo, la capacidad regenerativa se pierde gradualmente hacia la parte final de la fase crónica y la selectividad de células blanco se restringe a células CXCR4+. En la fase de SIDA la viremia aumenta rápidamente, los niveles de células CD4+ tanto en mucosa como en sangre decaen aceleradamente apareciendo las enfermedades oportunistas características del SIDA que provocan finalmente la muerte. Adaptado de (5).

El tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT, por sus siglas en inglés) es un sitio importante para la replicación temprana del VIH y la depleción severa de células CD4+, con la formación de un posible reservorio de variantes virales en este compartimiento, pudiendo, incluso contribuir al desarrollo de resistencia hacia fármacos antirretrovirales al almacenar variantes con mutaciones de resistencia (6). En la figura 1.4 se muestra la progresión de la infección por VIH desde la infección hasta la etapa de SIDA.

En una infección típica se identifican tres fases: una fase aguda caracterizada por síntomas inespecíficos; una fase crónica, en la que ocurre una replicación constante del virus, asociada a una destrucción/regeneración continua de células T CD4+ para disminuir hasta niveles incapaces de mantener una función inmune adecuada, promoviendo la aparición de enfermedades oportunistas y neoplasias en la etapa denominada SIDA. En la fase aguda, las células T en mucosas se pierden rápidamente, la viremia alcanza un máximo y después disminuye para mantenerse en un valor estable, mientras que el conteo sanguíneo de células CD4+ presenta una disminución aguda debido al secuestro en tejidos linfoides para luego subir de nuevo moderadamente normal. En la fase crónica el estado de activación inmune se incrementa constantemente, las células T CD4+ en mucosa permanecen bajas, los niveles de CD4+ en sangre disminuyen lentamente y la viremia aumenta como consecuencia de una replicación viral constante, asimismo, la capacidad regenerativa se pierde gradualmente hacia la parte final de la fase crónica y el tropismo del virus se restringe a células CXCR4+. En la fase de SIDA la viremia aumenta poco a poco y los niveles de células CD4+, tanto en mucosa como en sangre, decaen progresivamente apareciendo las enfermedades oportunistas características del SIDA que provocan finalmente la muerte (5) (Figura 1.4).

1. 4 ORIGEN Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIH

Poco después de los primeros reportes de SIDA en los Estados Unidos durante 1981 (7) y el aislamiento del VIH-1 dos años después (3) se descubrió la enfermedad establecida en poblaciones heterosexuales del centro y este de África (8, 9), sugiriendo un origen mucho más “antiguo” y hasta ese punto desconocido, de la pandemia en África (10).

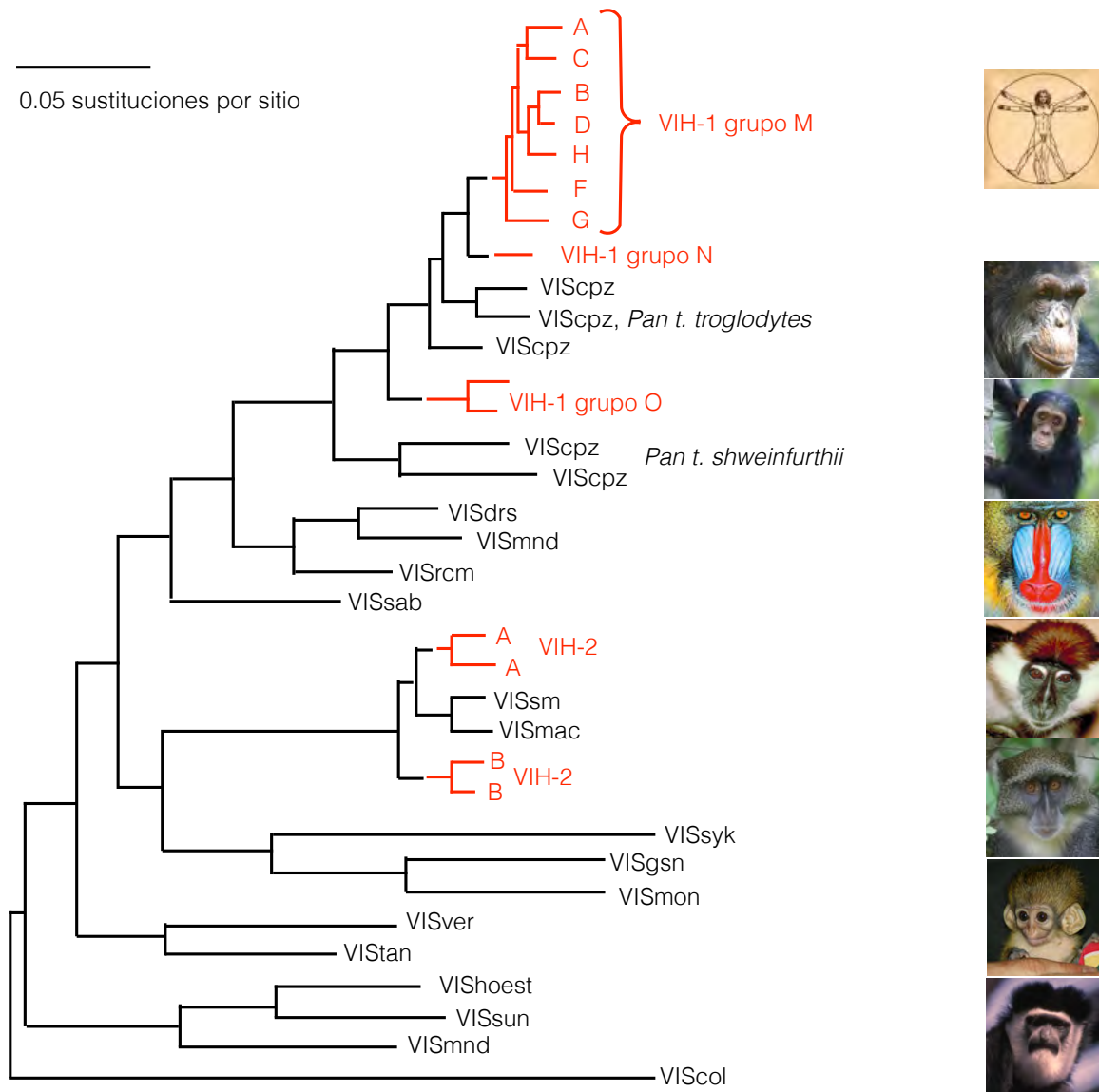


Figura 1.5 Árbol filogenético de los lentivirus de primates. Se observa la agrupación del VIH-1 con el virus del chimpancé (SIC cpz) y del VIH-2 con virus de monos mangabey ahumados (SIV sm). Asimismo, es clara la agrupación de los diferentes subtipos o clados del grupo M y su asociación con los virus del grupo N y O. Adaptado de (11).

Las teorías sobre el origen y la evolución del virus son variadas, las más actuales y aceptadas dictan que el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2) se ha adaptado al ser humano tras una larga evolución, se han derivado de un clado de lentivirus (VISs, virus de la inmunodeficiencia en simios) encontrados naturalmente en más de 40 especies de primates no-humanos en África subsahariana. (12, 13)

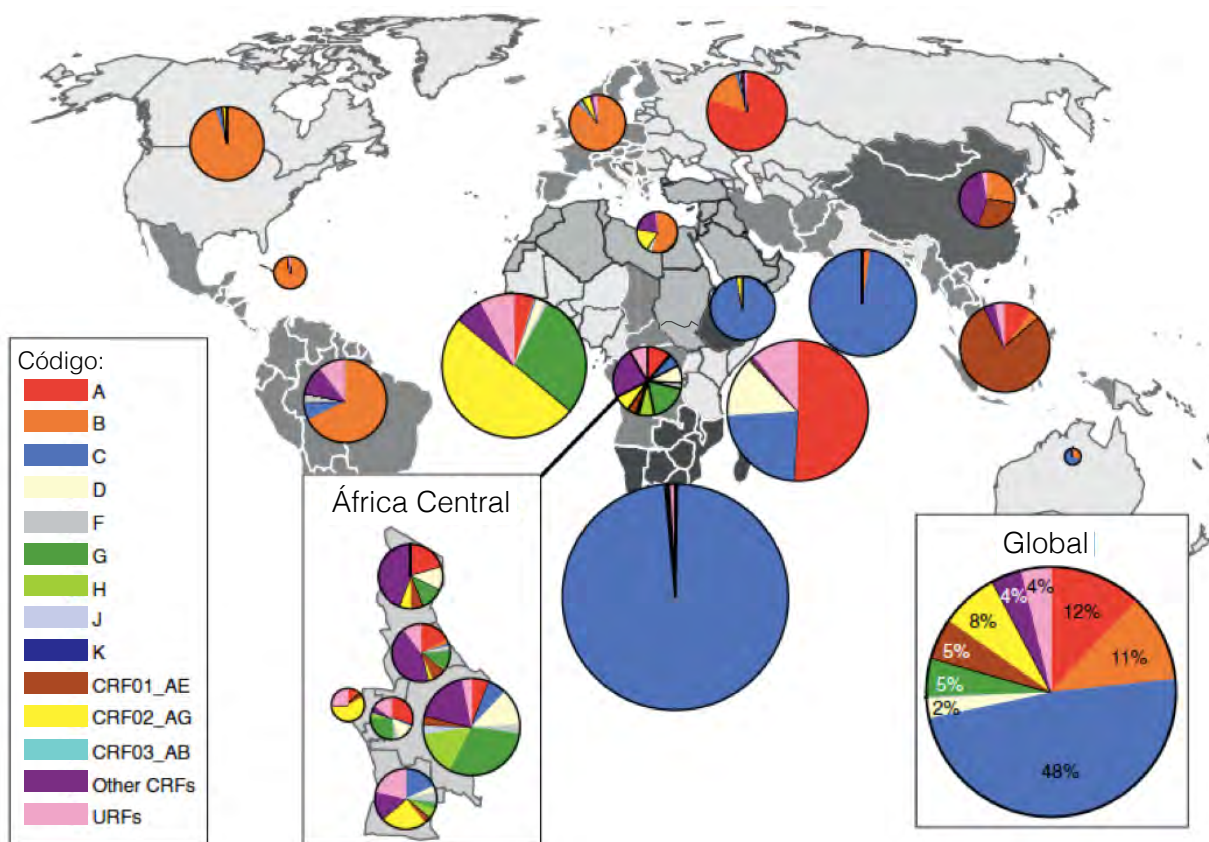


Figura 1.6 Mapa de patrones de distribución mundial de subtipos de VIH. Se muestran las distribuciones de subtipos de VIH-1 y formas recombinantes por región, de acuerdo a datos de 23,874 muestras de 70 países reunidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO/UNAIDS) en 2004. Las regiones consideradas están sombreadas con diferentes matices. Las gráficas de pastel muestran las distribuciones características de subtipos de VIH-1 por región. El tamaño de los gráficos es proporcional al número relativo de personas viviendo con VIH en cada región. Tomado y adaptado de (14).

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*, y al género de los Lentivirus. Éste género comprende ambos tipos de VIH (VIH-1 y VIH-2), además de un gran número de virus de inmunodeficiencia en simios (VIS) que infectan de manera natural a diferentes especies de primates no humanos en el continente africano (15, 16). En sus hospederos

naturales, los VIS rara vez causan el colapso del sistema inmune, y las características detalladas de esta relación patógeno-hospedero permanecen poco claras.

El origen del VIH en humanos fue rastreado a múltiples infecciones zoonóticas, posiblemente a través del contacto de cazadores y carniceros con fluidos corporales de los primates no humanos infectados con VIS (17, 18). Los dos tipos de VIH tienen diferentes orígenes. Las cepas de VIH-1 son más cercanas al VIS que de manera natural infecta a los chimpancés (VIS cpz) (19), mientras que las cepas de VIH-2 se relacionan con el VIS de monos mangabey (VIS sm) (20, 21).

Con base en análisis filogenéticos de numerosos virus aislados de regiones geográficas diferentes, el VIH se ha clasificado en tipos, grupos, subtipos o clados, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (FRCs) y formas recombinantes únicas (FRUs) (22).

1.5 CICLO DE REPLICACION DE VIH

1.5.1 Entrada

El VIH hace contacto con las células blanco en el hospedero a través de la molécula CD4, la cual funciona como receptor principal del virus. Así, el VIH puede infectar a linfocitos T ayudadores CD4+, células CD4+ del linaje de los macrófagos y a algunas poblaciones de células dendríticas. CD4 se une a su receptor: la glicoproteína de superficie viral gp120; mientras que dos receptores de quimiocinas son usados como correceptores en el hospedero: CCR5 en macrófagos y CXCR4 en linfocitos T ayudadores CD4+ (23) (Figura 1.7).

La unión secuencial de CD4 y los receptores de quimiocinas a gp120 produce cambios conformacionales que exponen el dominio de fusión de gp41, la proteína transmembranal de la envoltura viral. Al igual que gp120, gp41 se asocia en trímeros para formar la región transmembranal de las espículas virales. Después de la unión de gp120 a CD4 y a los correceptores de quimiocinas el dominio de fusión se expone y proyecta hacia la célula hospedera de manera parecida a un arpón. Esto trae como consecuencia el acercamiento e interacción de las tres moléculas gp41 asociadas, para formar una estructura en forma de racimo con seis hélices antiparalelas. Este movimiento análogo al de un pasador permite el acercamiento de la membrana viral a la membrana celular y provoca su fusión, liberando al virus en el interior de la célula (24).

1.5.2 Eventos tempranos después de la entrada

Actualmente se cree que la desencapsidación del virus no ocurre inmediatamente después de la entrada (25). Se ha demostrado que las cápsides completas viajan hacia el núcleo dirigidas, en un principio, por microtúbulos y posteriormente por filamentos de actina en las proximidades del núcleo. Movimientos lentos dirigidos por actina llevan a las cápsides a encallar en los poros nucleares (Figura 1.7). La transcripción reversa del genoma viral ocurre en el llamado complejo de retrotranscripción (RTC), dentro de la cápside, en el poro nuclear. La desencapsidación ocurre a nivel del poro nuclear una vez retrotranscrito el genoma viral.

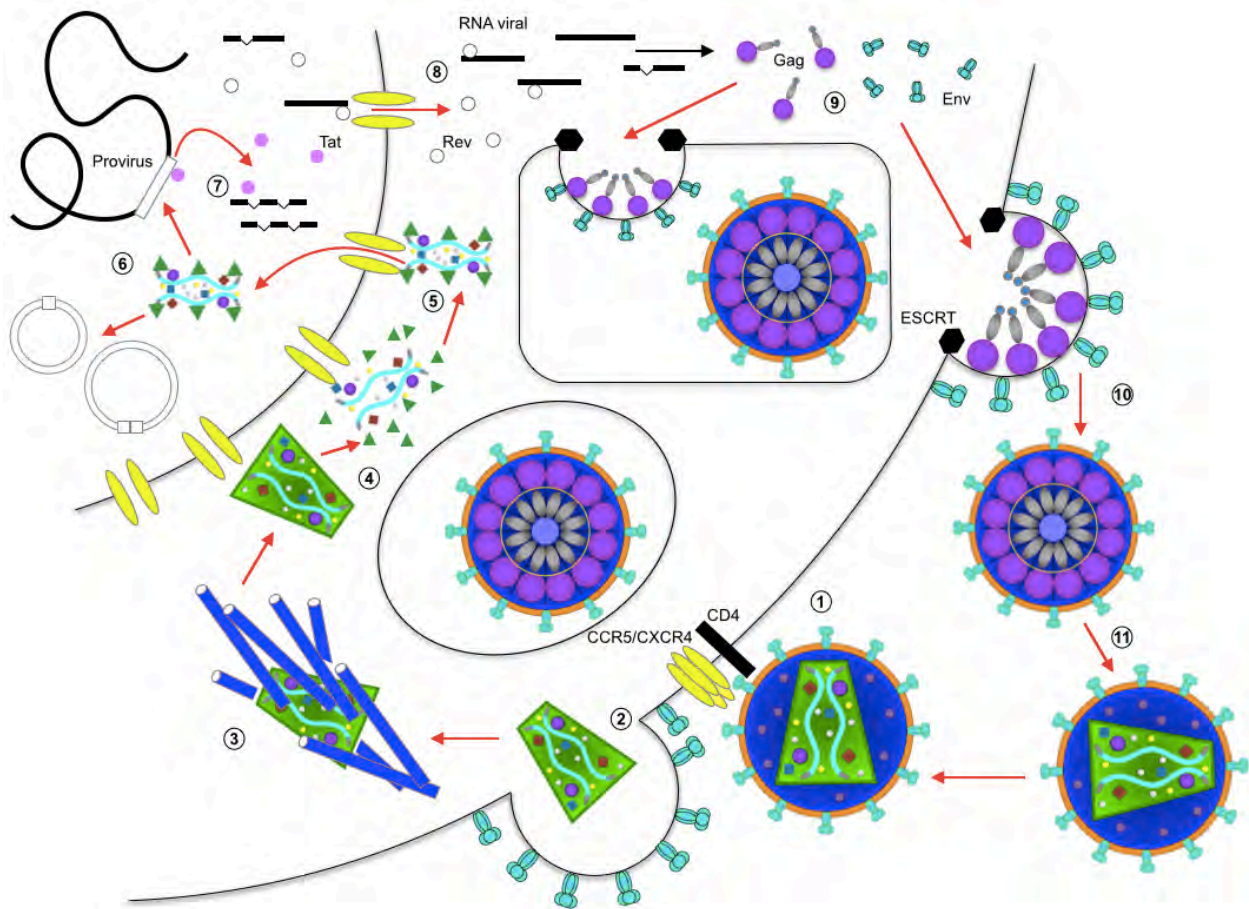


Figura 1.7 Ciclo de replicación del VIH. 1) Al unirse gp120 a CD4, receptor principal del VIH en células del hospedero, ocurren cambios conformacionales en gp120 que exponen los dominios de unión al correceptor en gp120. Los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 funcionan como los principales correceptores del virus. 2) La unión del correceptor causa otro cambio conformacional que expone el dominio de fusión en gp41, a través del cual se unen las membranas celular y viral, permitiendo la entrada del virus a la célula. 3) La cápsida viaja a través de microtúbulos para anclarse en el poro nuclear. 4) Al ocurrir la transcripción inversa del genoma viral y formarse el ala central de DNA, ocurre la desencapsidación y se forma el complejo de preintegración (PIC), incluyendo a MA, RT, IN y Vpr. 5) El PIC es transportado al interior del núcleo gracias a señales de localización nuclear en MA, IN y Vpr. 6) Una vez en el núcleo, el DNA viral puede integrarse en la cromatina de la célula por la actividad de la integrasa. De manera alternativa, el DNA viral puede permanecer en forma episomal como círculos de dos LTRs, círculos de un LTR, y formas circulares rearrregladas. Estas formas episomales no generan infecciones productivas. 7) Una vez integrado, el genoma viral es transcrito, produciéndose RNAs con múltiples eventos de corte y empalme (splicing) en etapas tempranas. Estos RNAs tempranos originan a las proteínas reguladoras Tat, Rev y Nef. Tat funciona como transactivador de la transcripción de los genes virales, permitiendo la formación de transcritos largos. En etapas tardías de la transcripción se forman RNAs con uno o sin ningún evento de corte y empalme, los cuales originan a las proteínas estructurales Env, Pol y Env así como a las proteínas accesorias Vif, Vpr y Vpu. 8) Los RNAs tardíos son transportados al citoplasma por Rev, evitando así los eventos de corte y empalme. 9) Los precursores de las proteínas estructurales y los genomas virales se ensamblan en balsas lipídicas en membranas de endosomas tardíos o en la membrana plasmática. MA se dirige a membranas por su característica miristilación. 10) Para la salida de nuevos viriones de la célula, el virus usurpa a los sistemas ESCRT, ordenadores del tránsito intracelular de vesículas. Gracias a interacciones con proteínas celulares ESCRT y a la contribución de la proteína viral Vpu, los nuevos viriones pueden gemar hacia el exterior a partir de la membrana plasmática o gemar hacia el lumen de cuerpos multivesiculares (MVB), para después ser liberados por fusión de estas vesículas con la membrana plasmática. 11) Los nuevos viriones deben madurar para ser infecciosos. La proteasa viral lleva a cabo este proceso cortando las poliproteínas Gag y Gag-Pol, para generar proteínas maduras (26) Modificado de (27).

1.5.3 Integración

El DNA viral, acompañado por algunas proteínas virales formando el complejo de preintegración, migra al núcleo y es insertado en el DNA celular por la enzima integrasa. Esta enzima remueve dos nucleótidos de los extremos del genoma viral, para después catalizar la reacción de transferencia de hebra de DNA, generando un corte escalonado en el DNA del hospedero y uniendo el DNA viral al DNA del hospedero (26). El DNA viral puede tener otros tres destinos que no generan infecciones productivas: los dos extremos del DNA viral pueden unirse, formando círculos de 2 LTR (Repetición Terminal Larga, *Long Terminal Repeat*); el genoma viral puede sufrir recombinación homóloga, originando círculos de un LTR o el genoma viral puede integrarse en él mismo, produciendo una estructura circular rearmada (28).

1.5.4 Transcripción del genoma viral

El LTR 5' del virus funciona de manera similar a como lo hacen las unidades transcripcionales eucarióticas. El LTR contiene secuencias promotoras y potenciadores con sitios de unión para varios factores de transcripción y una señal de poliadenilación (29). La región U3 del LTR, previa al sitio R de inicio de la transcripción, también presenta una región reguladora conocida como elemento de respuesta de transactivación (TAR).

Esta estructura de RNA presente en todos los mensajeros virales se une a la proteína reguladora viral Tat (proteína transactivadora). Es importante señalar que los eventos de corte y empalme son fundamentales para la producción de diversas especies de mRNA, responsables de la síntesis de las proteínas virales durante el ciclo de replicación del VIH; mRNA con pocos eventos de corte y empalme originan las proteínas estructurales virales, mientras que mRNA con múltiples eventos de corte y empalme originan típicamente a las proteínas accesorias / reguladoras.

La cantidad relativa de mRNA con múltiples eventos de corte y empalme contra los no cortados o con un solo evento de corte y empalme, es controlada por la proteína Rev (regulador de la expresión viral). Rev es una pequeña proteína que interacciona con un asa compleja de RNA presente en el gen Env llamada RRE (elemento de respuesta a

Rev), permitiendo la exportación de mRNA con pocos eventos de corte y empalme fuera del núcleo para la formación de las proteínas estructurales necesarias para el ensamble de nuevos viriones (26) (Figura 1.7).

1.5.5 Salida del virus de las células

Estudios con microscopía electrónica han mostrado que el ensamble y salida del VIH ocurre usualmente en la membrana plasmática. Sin embargo, también es claro que en algunos tipos de células (principalmente monocitos-macrófagos), el ensamble y gemación de los viriones ocurre en compartimentos intracelulares definidos como endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVB) (30, 31) (Figura 1.7). Se necesitan de 2000 a 4000 copias de la poliproteína Gag para el ensamble de la cápside viral. La proteína madura CA forma la cápside viral después de que el precursor Gag es procesado por la proteasa viral (32). Estudios *in vitro* de inhibidores del ensamblaje de la cápside han mostrado que la alteración de las interfases de dimerización de CA evitan la formación de las redes de proteína que constituyen la cápside madura. Estos estudios demuestran que la cápside es un blanco factible para la inhibición de la replicación del virus (33, 34).

La matriz (MA) se dirige a las membranas por sus características de miristilación. Para la salida de nuevos viriones de la célula, el virus secuestra a los complejos de salida endosomal requeridos para la transportación (*endosomal sorting complexes required for transport* ESCRT), encargados del tránsito intracelular de vesículas (35). Gracias a interacciones con proteínas celulares ESCRT y a la contribución de la proteína viral Vpu, los nuevos viriones pueden gemar hacia el exterior a partir de la membrana plasmática o gemar hacia el lumen de cuerpos multivesiculares (MVB), para después ser liberados al fusionarse estas vesículas con la membrana plasmática. Los nuevos viriones deben madurar para ser infecciosos. La proteasa viral lleva a cabo este proceso cortando las poliproteínas Gag y Gag-Pol para genera proteínas maduras (35). A partir de éste momento el ciclo se repite cuando el virión maduro e infectivo se encuentra con una nueva célula blanco.

1.6 EVOLUCIÓN DEL VIH

Entender la evolución del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es crucial para reconstruir su origen, descifrar su interacción con el sistema inmune y desarrollar estrategias de control efectivas.

El VIH es un virus con una capacidad notable de variación y por tanto con una capacidad excepcional de evolucionar. La alta heterogeneidad del virus es originada por la alta tasa de incorrecta substitución de nucleótidos durante la transcripción inversa del VIH (de 10^{-4} a 10^{-5} mutaciones por nucleótido, por ciclo de replicación) (36), alta dinámica de replicación (de 10^9 a 10^{10} viriones por día) (37, 38), altos números de células infectadas (de 10^7 a 10^8 células infectadas) (39) y un alto nivel de recombinación (40-42).

La alta tasa de mutación asociada con la replicación del VIH-1, como en otros virus de ARN, resulta en la creación de diversas “cuasiespecies” virales (43-45). Estas cuasiespecies son un sustrato fértil para la presión por selección darwiniana favoreciendo a los virus mejor adaptados, es decir, las variantes genéticas con la mayor aptitud replicativa o “*fitness*”, en un conjunto de circunstancias en un momento determinado. Los esfuerzos para desarrollar tratamientos efectivos y vacunas deben abarcar las dinámicas evolutivas complejas en los individuos infectados por VIH y en las poblaciones afectadas (46) ya que la genética poblacional también influye en la evolución viral (47).

1.6.1 Los linfocitos T citotóxicos en la evolución del VIH

La consideración de factores inmunogenéticos es básica para explicar la diversificación y evolución del VIH en diversas poblaciones y entre ellos, el sistema inmune humano juega un papel primordial como presión evolutiva sobre el virus. La respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) es fundamental en el control de la viremia durante la infección por el VIH, ejerciendo una fuerte presión selectiva sobre el virus (48-52). Las moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA) definen y restringen las respuestas de CTL. Estas moléculas tienen la función de presentar péptidos provenientes del

procesamiento de patógenos intracitoplásmicos en células infectadas, los cuales son reconocidos por clonas de linfocitos T CD8+ específicas, a través de sus receptores de células T (TCR), induciéndose su función efectora como CTL mediada por la liberación de perforina y granzimas que llevan a la muerte de la célula infectada (Figura 1.8). Las moléculas HLA son codificadas por un grupo de genes que se encuentran en el brazo corto del cromosoma seis (53). Ésta región se conoce como el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El MHC contiene más de 200 genes y gran parte de ellos están relacionados con la respuesta inmune (54-57). Estas moléculas determinan qué secuencias específicas de péptidos (epítomos) podrán ser reconocidas por las células T CD8+ y CD4+ del hospedero. En la confrontación entre las variantes genéticamente diversas del VIH y la diversidad genética de los hospederos humanos, las variantes virales pueden ser seleccionadas por mutaciones en epítomos virales específicos que permiten el escape al reconocimiento de las células inmuno-efectoras del hospedero, adaptándose de ésta manera a la presión selectiva impuesta por el sistema inmune (46).

En éste sentido, la importancia de los CTL como fuerza selectiva sobre el VIH es evidente por la aparición y propagación de variantes de escape en un individuo desde etapas tempranas de la infección, las cuales impiden que los CTL reconozcan efectivamente células infectadas, frecuentemente con la subsecuente pérdida de control inmune sobre el virus. Estas mutaciones promueven el escape inmune al evitar la unión de los péptidos virales a las moléculas HLA, intervenir con el procesamiento de los epítomos antes de ser presentados o disminuir la afinidad de la unión de los TCR con los complejos péptido-HLA. Sin embargo, las mutaciones de escape frecuentemente se asocian a un costo sustancial en la aptitud replicativa del virus y revierten al ser transmitidas a un individuo carente del alelo HLA selector (58-60). En muchos de estos casos, la recuperación en aptitud replicativa se logra mediante la aparición de mutaciones compensatorias asociadas a la mutación de escape (61).

La influencia de la respuesta CTL en la evolución del VIH es un mecanismo complejo ya que frecuentemente coinciden múltiples epítomos en la misma región de la secuencia viral pudiéndose generar fuerzas selectivas opuestas (62, 63). A pesar de esto, algunos

estudios han demostrado que la fijación de mutaciones de escape seleccionadas por HLA, puede ser predecible y capaz de impactar la evolución del virus a nivel poblacional. Moore y colaboradores (64) fueron los primeros en encontrar asociaciones correlativas entre la presencia de ciertos alelos HLA de clase I y polimorfismos en la secuencia consenso del virus, lo que apoya la evidencia de la acción de la respuesta T citotóxica como fuerza evolutiva sobre el virus a nivel poblacional. Asimismo, se han encontrado asociaciones entre la presencia de determinados alelos HLA y la conservación de la secuencia viral. Estas asociaciones “negativas” han sido explicadas como sitios donde existían epítomos previos que se extinguieron debido a la selección de mutaciones de escape por alelos HLA presentes en altas frecuencias, al madurar la epidemia en una población determinada (59, 65, 66).

Los esfuerzos por desarrollar una vacuna efectiva contra el VIH se han enfocado fuertemente a la inducción de la respuesta inmune celular (especialmente de la células T CD8+) hacia antígenos de VIH. A pesar de la selectividad de la vacuna, las respuestas de CTL son insuficientes para prevenir la infección, sin embargo se espera que puedan controlar la replicación viral, disminuir la velocidad de progresión a SIDA y declinar la transmisión secundaria.

Ésta esperanza ha sido mitigada por estudios recientes que sugieren que con el tiempo y sucesivos eventos de transmisión, las mutaciones de escape a CTL pueden llegar a fijarse en los virus circulantes como consecuencia de la presión selectiva de respuestas de CTL restringidas por los alelos HLA más prevalentes (63, 64). Si estas inferencias son correctas, poblaciones de VIH evolucionarán para adaptarse eventualmente a las respuestas de CTL dificultando el diseño de vacunas. Para que eso ocurra a nivel poblacional las variantes de escape a CTL tendrían que persistir y ser favorecidas, mientras el virus es transmitido de una persona a otra, aún cuando el alelo selector HLA no se encuentre presente en el individuo recién infectado (67).

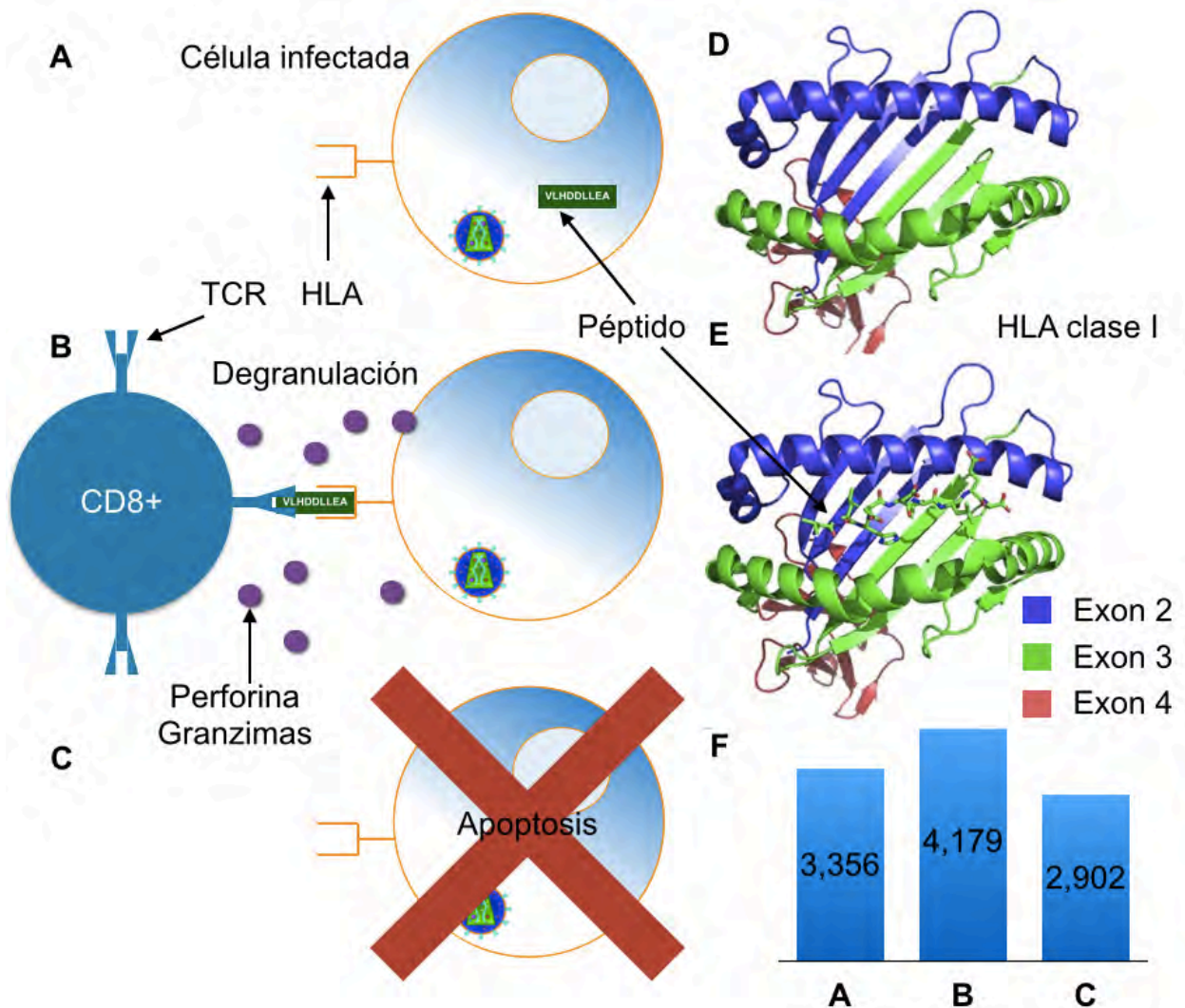


Figura 1.8 Funcionamiento óptimo del CTL. Se muestra (A) cómo en la célula infectada, las proteínas virales son procesadas y se crea un péptido (B) que se adhiere a la molécula HLA en la superficie de la célula, el péptido unido a la molécula HLA es reconocido por la célula T CD8+ y ésta a su vez secreta los gránulos que contienen las perforinas y granzimas por lo que (C) la célula infectada muere por apoptosis. Modificado y adaptado de (27) (D) Estructura de la porción extracelular de la molécula HLA-A*02:01:01 indicando las regiones codificadas por los exones 2 (azul), 3 (verde) y 4 (rojo) del alelo A*02:01:01 del gen *HLA-A*. (E) Estructura de HLA-A*02:01:01 con el péptido VLHDDLLEA. Modificado y adaptado de (68) (F) En las barras azules se observan los alelos definidos, hasta la realización de la presente tesis, para el grupo A (3,356), B (4,179) y C (2,902) (69).

Las razones por las cuales algunos epítomos blanco de CTL derivan en mutaciones de escape y otros no, no se comprenden completamente y pueden estar ligadas a fenómenos de inmunodominancia o costos en aptitud replicativa para el virus. En algunos casos, las estructuras en las funciones virales dominantes hacen ciertas mutaciones potenciales de escape incompatibles con la replicación del virus (alto costo

en aptitud replicativa), sin embargo algunos epítomos menos comprometidos de CTL pueden persistir pero no ser funcionales (70).

Las mutaciones en los epítomos blanco por diversas respuestas de CTL pueden presentarse con una cinética extensamente variable. Las variantes que rápidamente emergen son aquellas que probablemente hacen frente a una “barrera genética baja” (requiriendo solamente uno o pocos cambios de nucleótidos) y tener un costo bajo de aptitud replicativa. En cambio, las mutaciones que se presentan más adelante es probable que tengan un costo más alto de aptitud replicativa y deban superar barreras genéticas más altas, requiriendo mutaciones compensatorias adicionales, para permitir una réplica viral apreciable. Se espera que las mutaciones con un costo relativamente bajo de la aptitud replicativa reviertan lentamente o no en absoluto en la transferencia a un siguiente hospedero, carente del alelo HLA selector. Es de ésta manera como las mutaciones de escape se pueden propagar a través de una población (63, 64, 71) como también se ha observado en el virus de la influenza A (72).

La comprensión e identificación de sitios específicos y patrones de escape inmune en el VIH-1 permitirá un aumento en la comprensión de cómo la selección inmune contribuye a la alta diversidad viral (64, 73) y también permitirá la identificación de regiones virales específicas bajo alta presión selectiva. Esto proveerá información relevante para nuevas metodologías de tratamiento así como en el desarrollo de vacunas contra VIH-1 (74).

1.6.2 Los fármacos antirretrovirales como presión selectiva sobre el VIH.

La selección por fármacos antirretrovirales (ARV) (Tabla 1.1) a nivel individual es evidente por la aparición de mutaciones de resistencia que causan un incremento en los niveles de replicación viral o falla virológica en pacientes bajo tratamiento (75, 76). Al igual que en el caso de las mutaciones de escape a CTL, las mutaciones de resistencia a fármacos ARV implican generalmente un costo en capacidad replicativa para el virus y tienden a revertir al suspenderse la terapia ARV.

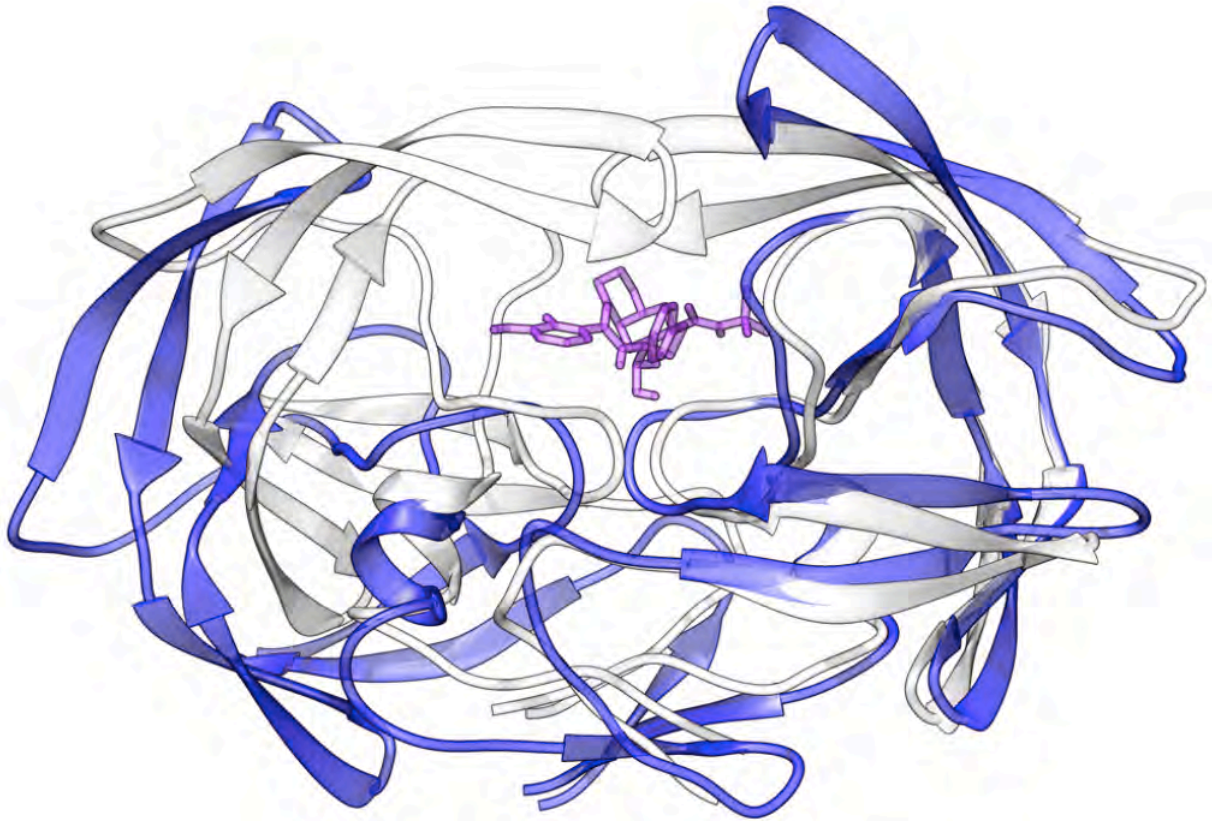


Figura 1.9 Escape de proteasa a Nelfinavir. Se muestra como el fármaco inhibidor de proteasa Nelfinavir (en morado) cumple su función inhibiendo la apertura de la proteasa silvestre “*wild type*” (WT) mostrada en blanco; un conjunto de mutaciones de resistencia provocarían cambios conformacionales en la proteasa sin alterar su función pero brindándole resistencia al fármaco, como se observa en la proteasa azul “*drug resistant*” (DT). Tomado de (77).

Es necesario conocer la medida en que la terapia ARV puede influir en la evolución del VIH a nivel poblacional. Se ha observado la presencia de mutaciones de resistencia en pacientes que no han recibido tratamiento alguno e incluso, la frecuencia de estas mutaciones de resistencia primaria ha aumentado al incrementarse el uso de fármacos ARV. Esto sugiere que algunas de estas mutaciones pueden ser transmitidas y mantenidas sin la presencia del fármaco selector (78, 79). La dinámica en las mutaciones de resistencia es diferente entre proteasa y transcriptasa inversa. En el caso de la transcriptasa inversa una sola mutación puede conferirle resistencia a un fármaco o incluso a un grupo de fármacos, mientras que en el caso de la proteasa se requieren varias mutaciones en puntos específicos de la proteína (Figura 1.9), para brindarle a la proteasa resistencia a los fármacos ARV (61).

Tabla 1.1 Familias de fármacos antirretrovirales

Fármacos Antirretrovirales						
Inhibidores de Transcriptasa Inversa						
Inhibidores Análogos de Nucleósidos	Inhibidores No Análogos de Nucleósidos	Inhibidores Análogos de Nucleótidos	Inhibidores de Proteasa	Inhibidores de Fusión	Antagonistas de CCR5	Inhibidores de Integrasa
Zidovudina	Nevirapina	Tenofovir	Saquinavir	Eufuvirtide	Maraviroc	Raltegravir
Didanosina	Delavirdina	Adefovir	Ritonavir			
Zalcitabina	Efavirenz		Indinavir			
Estavudina			Nelfinavir			
Lamivudina			Amprenavir			
Abacavir			Lopinavir			
Emtricitabina			Atazanavir			
			Fosamprenavir			
			Tipranavir			
			Darunavir			

1.6.3 Interacción entre presiones de selección.

Dentro de un marco de múltiples presiones de selección actuando sobre el VIH, es factible pensar en la interacción de algunas presiones en un momento determinado. En especial, la posible interacción de CTL y la terapia antirretroviral, que son dos de las presiones selectivas más fuertes actuando sobre el virus en la epidemia actual y que ya han empezado a ser exploradas (78, 80, 81). Los efectos de ésta interacción pueden ser tanto sinergistas como antagonistas; así, mutaciones de resistencia a ARV pueden reducir, mantener o aumentar la sensibilidad a la respuesta de CTL o incluso modificar su especificidad, y en sentido opuesto, alelos HLA determinados podrían seleccionar mutaciones que funcionarán a la vez como mutaciones de escape inmune y de resistencia a antirretrovirales (Figura 1.10). La identificación de epítomos de CTL que contengan mutaciones de resistencia coincidentes con mutaciones de escape no solo es útil para el diseño de vacunas y la individualización del tratamiento ARV sino que también puede ayudar a predecir posibles modulaciones en la respuesta citotóxica anti-VIH inducida por el tratamiento. A nivel poblacional, existen evidencias de la posible interacción de la terapia ARV con la respuesta de CTL, ya que se han encontrado sitios en *pol* que muestran asociaciones correlativas entre la aparición de ciertas mutaciones de resistencia a ARV y la presencia de determinados alelos HLA (80-82).

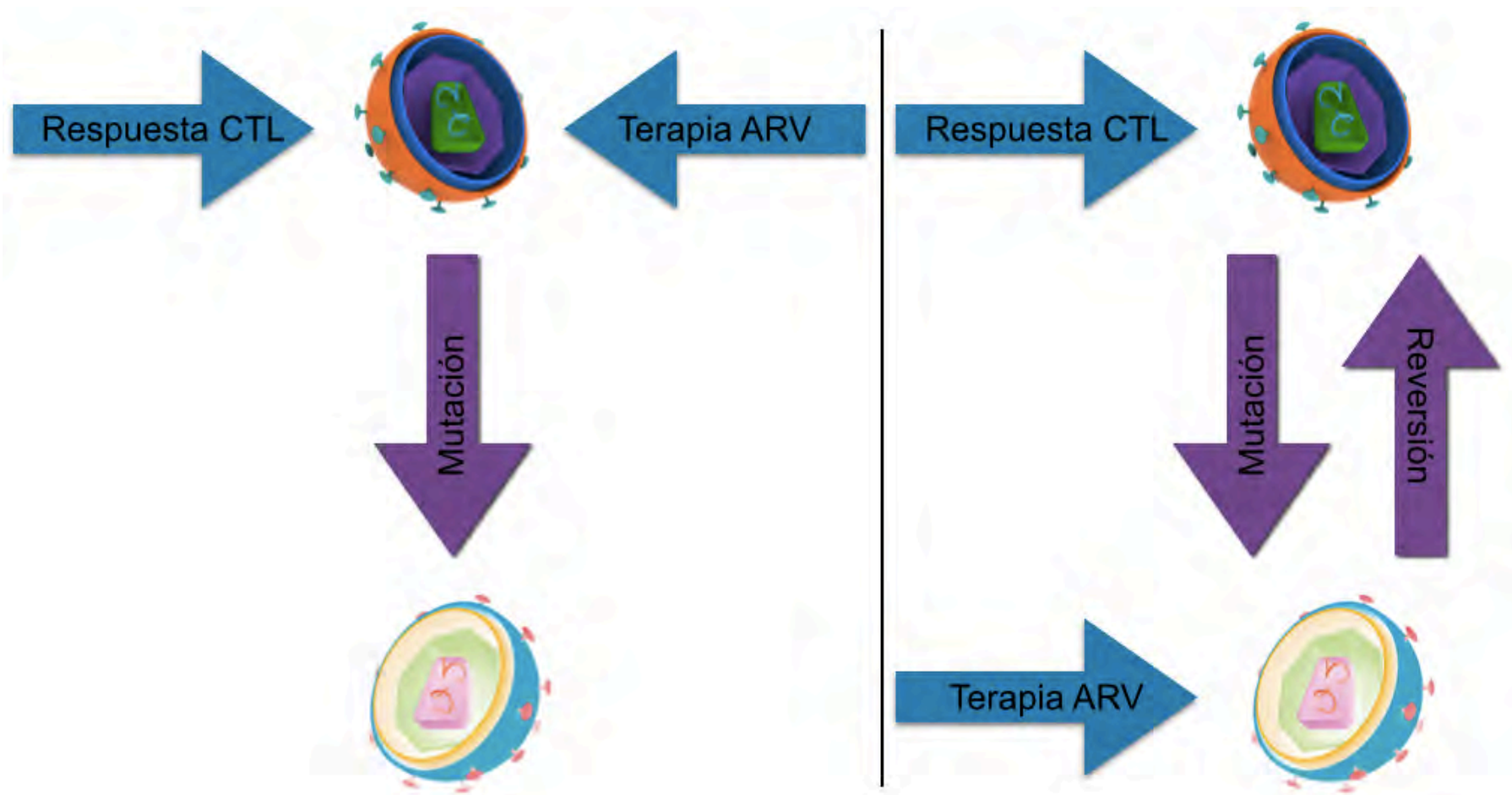


Figura 1.10 Modelo de acorralamiento. En el presente modelo se muestra del lado izquierdo un virus silvestre o “wild type” (WT) siendo blanco de dos presiones selectivas opuestas, en este ejemplo la respuesta a CTL y a la terapia ARV lo cual lo lleva a seleccionar una mutación de escape que le otorga resistencia a ambas presiones confiriéndole “un doble escape” y se convierte en un virus resistente a fármacos ARV o “drug resistant” (DR). En el lado derecho el virus WT es blanco de la respuesta CTL lo cual lo lleva a seleccionar una mutación de escape pero ahora el virus DR es blanco de la terapia ART lo que obliga al virus a una reversión y de nuevo ser blanco la primera presión selectiva, así el virus queda acorralado entre dos presiones selectivas opuestas. Modificado de (83).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de vacunas terapéuticas contra el VIH ha ganado interés en los últimos años como parte de las estrategias de curación y como una ayuda para el tratamiento de las personas que ya están infectadas (84, 85). Aunque la terapia ARV puede controlar eficazmente la replicación del VIH-1 y extiende la vida de los individuos infectados a periodos cercanos a los observados en población general (86, 87), el régimen terapéutico debe mantenerse durante toda la vida; la interrupción del tratamiento resulta en un rebote viral inmediato. Además, la terapia ARV por sí sola no puede eliminar la infección por VIH debido a la capacidad del virus para persistir en los individuos a través de la formación y mantenimiento de reservorios virales latentes y la replicación viral residual (88). Esto representa un reto considerable para el paciente ya que implica la necesidad de una estricta adherencia, pues existe la posibilidad de que el fármaco se vuelva tóxico a largo plazo y el VIH genere resistencia a los medicamentos. También desafía a los sistemas de salud pública, con la carga económica y logística del mantenimiento de los regímenes terapéuticos durante largos periodos y la necesidad de un seguimiento clínico y de laboratorio del paciente. Teniendo en cuenta este escenario, el desarrollo de una vacuna terapéutica que podría aumentar la eficacia antirretroviral para controlar la replicación residual o que incluso podría sustituir a la terapia ARV es por demás, deseable. Además, la vacunación terapéutica también podría proporcionar los medios para estrategias de curación combinadas basadas en purgar el reservorio viral latente con agentes de reversión de latencia y la eliminación de células reactivadas por CTL (89).

Sin embargo, la extraordinaria adaptabilidad del VIH, asociada con una alta mutación y las altas tasas de recombinación y capacidad de replicación, han complicado el desarrollo de vacunas eficaces. De hecho, ha sido bien documentado que el VIH-1 puede escapar fácilmente a linfocitos T CD8+ específicos del virus restringidos por los alelos HLA de clase I, por la selección de mutaciones capaces de prevenir: el procesamiento adecuado de epítopos virales,

la unión del epítopo a moléculas HLA o el reconocimiento por receptores específicos de células T (90). Se han realizado avances significativos en la identificación de epítomos virales que provocan fuertes respuestas citotóxicas y que comúnmente se encuentran en una proporción significativa de la población siendo menos propensos a la variación y, sí mutan, llevan a los virus mutantes a reducir de manera significativa su capacidad replicativa (91).

Hemos propuesto anteriormente la hipótesis de que *in vivo* la replicación del VIH y el escape del control farmacológico e inmune podría estar limitado por el uso concertado de presiones selectivas opuestas que actúen sobre el virus simultáneamente y que éste concepto podría ser utilizado para la selección de inmunógenos putativos para el diseño de un candidato a vacuna (83). En concreto, hemos propuesto un escenario en el que las variantes virales resistentes a la terapia ARV podrían ser los objetivos de la respuesta CTL específica. Y con el fin de escapar de la respuesta específica CTL el virus tendría que volver a su forma original, que a su vez lo haría blanco de la terapia ARV. Por lo tanto, en presencia de la terapia ARV, el virus estaría acorralado entre las presiones selectivas inmunológica y farmacológica. Aunque por otro lado, también podrían existir mutaciones que permitan al virus escapar tanto la respuesta de CTL como de la terapia ARV. Sin embargo, la deficiente capacidad replicativa del virus, podría reducir considerablemente la ventaja de este doble escape (83, 92).

3. HIPÓTESIS

Debido a la gran presión farmacológica sobre el gen Pol, aunado a la existencia de epítomos de CTLs para una gran variedad de alelos HLA, la región Pol PR-RT presentará sitios potenciales de acorralamiento para el VIH.

4. OBJETIVO

Probar péptidos virales con y sin mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales para comprobar su inmunogenicidad, para evaluar la capacidad de variación del virus al acorralarlo entre presiones selectivas opuestas y escoger a los mejores como candidatos para vacunas terapéuticas.

5. METODOS

Declaración de Ética. El presente estudio fue evaluado y aprobado por los Comités de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en la Ciudad de México y el Instituto de Investigación del SIDA IrsiCaixa en Barcelona, España, y se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento escrito antes de la donación de una muestra de sangre.

Uso de laboratorios de Bioseguridad Nivel 3. El proyecto se realizó después de completar el entrenamiento para trabajar en laboratorios de Bioseguridad Nivel 3 tanto, en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en Ciudad de México, México, como en el Institut de Recerca de la SIDA (IrsiCaixa) del Hospital Germans Trias i Pujol en Barcelona, España.

Sujetos de estudio. Un total de 49 individuos infectados con VIH-1 subtipo B y sin tratamiento antirretroviral previo, fueron incluidos en el presente estudio, de los cuales 24 provienen de IrsiCaixa y 25 del CIENI. Las muestras de sangre donadas por los participantes fueron utilizados para aislar y almacenar el plasma y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Diseño de péptidos. Se diseñaron dos conjuntos de péptidos, que suman un total de 218, los cuales fueron utilizados para la detección de respuestas de células T específicas para el VIH. Un primer conjunto de 128 péptidos (Set "b") fue diseñado basado en la secuencia consenso de VIH subtipo B (93) encontrando 33 epítomos de CTL óptimamente definidos tanto en la proteasa del VIH (PR) como en la transcriptasa reversa (RT), previamente reportados en la base de datos del laboratorio de Los Alamos (Los Alamos National Laboratory, Nuevo Mexico, Estados Unidos) (94), que incluyen por lo menos un sitio de resistencia a fármacos ARV. A partir de estos epítomos se sintetizaron péptidos individuales; uno que contiene el aminoácido silvestre o "*wild type*" (WT) y otro con el aminoácido que otorga resistencia a los fármacos ARV (DR), cuando varios sitios de resistencia aparecen en el mismo epítomo se sintetizaron conjuntos de péptidos con diferentes combinaciones de aminoácidos WT y DR (Figura 5.1 A y B). Un segundo conjunto de 90 péptidos (Set "a") basados en el subtipo B (93) fue diseñado para estudiar cinco sitios de resistencia a fármacos ARV en la región PR-RT que habían sido previamente asociados con presión selectiva por HLA, pero para los cuales no se ha descrito el epítomo óptimo (95). Para cada uno de estos 5 sitios, se sintetizaron conjuntos de péptidos 9-mer sobrelapando 8 aminoácidos incluyendo el sitio DR de interés en cada una de las posiciones del péptido (Figura 5.1 A y C). Con el fin de comparar la inmunogenicidad, los péptidos con y sin mutaciones DR se dispusieron en 140 pares. En el "Set b", un único péptido WT podría tener más de un péptido homólogo DR, por lo que en total suma 95 pares de péptidos, por el otro lado en el "Set a" cada uno de los 45 WT péptidos fue emparejado con su péptido DR correspondiente, sumando 45 pares de péptidos. La lista completa de los péptidos evaluados esta en el Anexo 1. Todos los péptidos se sintetizaron en JPT Peptide Innovative Solutions (Berlín, Alemania).

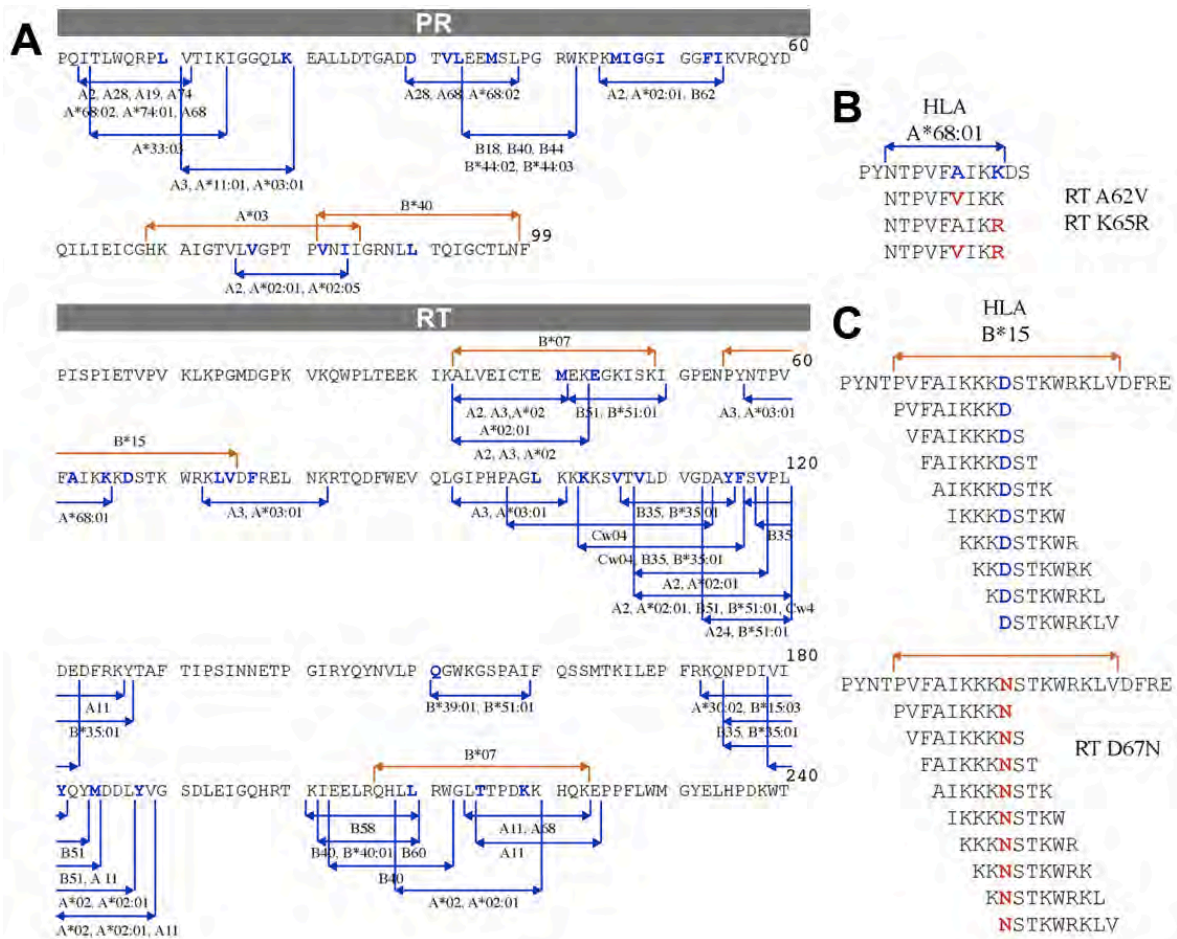


Figura 5.1 Diseño de péptidos. A. Mapa de epítomos CTL en PR y RT, para el diseño de péptidos. Los péptidos fueron diseñados con base en epítomos óptimos previamente descritos de CTL (líneas azules) y la sobreposición de epítomos predichos estadísticamente con posiciones asociadas a HLA (líneas naranja) (95). Los aminoácidos específicos en la secuencia WT donde su cambio por DR otorga resistencia a ARV se indican en azul. **B.** 128 péptidos fueron diseñados utilizando epítomos de CTL confirmados experimentalmente que se superponen a las posiciones asociadas con DR. Se sintetizaron, tanto los péptidos WT como sus variantes DR. En el ejemplo mostrado, dos mutaciones DR se reflejan en un epítopo restringido por HLA-A*68:01 por lo que se diseñaron cuatro péptidos para reflejar las diferentes combinaciones de mutaciones. **C.** Adicionalmente se diseñaron noventa péptidos basados en 5 regiones que contienen huellas de HLA y sitios de mutación reportados por Mina John *et al* (95). En el ejemplo se muestra el conjunto de péptidos diseñados tanto con el aminoácido WT (en azul) como el conjunto de péptidos con el aminoácido DR (en rojo) que en este caso tiene una huella por el HLA-B*15 y además es la posición para la mutación de resistencia RT D67N. Ambos péptidos, WT y DR se sintetizaron y se probaron individualmente.

Separación de PBMC Se obtuvieron PBMC de sangre completa mediante centrifugación en gradiente de densidad o Ficoll (Lymphoprep Axis-Shield Oslo, Noruega) en las 6 primeras horas después de la punción venosa; brevemente, el paquete globular se diluyó 1:2 en solución salina amortiguada de Hanks (HBSS) y

superpuesto sobre una alícuota de Ficoll. Después de obtener el gradiente de densidad por centrifugación a 2000 rpm durante 20 min, la capa de PBMC se aspiró y se lavó tres veces con HBSS. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se conservaron en medio de congelación (suero fetal bovino 90%, DMSO 10%) en nitrógeno líquido a -140°C hasta su uso.

Ensayos de ELISpot. Se descongelaron las células (PBMC), y se incubaron en RPMI 1640 que contiene suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (ambos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2 mM L-glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina y HEPES 10 mM (todos de Mediatech, Herndon, VA) en un volumen final de 50mL, a este medio se le conoce como R10. Las células descongeladas se dejaron reposar a 37° C y 5% de CO₂ durante 4 horas antes de su uso en ELISpot (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos). Después del tiempo de reposo, se contaron y se sembraron en placas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 96 pocillos (Millipore, Bedford, MA), que habían sido recubiertas previamente (por lo menos 8 horas antes) con 0,5µg/mL del anticuerpo monoclonal 1-D1K anti-interferón gamma (IFN-γ) (Mabtech Cell, Estocolmo, Suiza). Cada péptido se añadió individualmente a una concentración final de 14 µg/mL como se describió anteriormente (96). Se añadieron un total de 100,000 células por pocillo en 140 µL de R10. Para los controles negativos, las células se incubaron en medio solo. Se añadió el fragmento B de la enterotoxina estafilocócica (SEB) a 7 ng/mL (Sigma) para servir como control positivo en los experimentos llevados a cabo en el CIENI y fitohemaglutinina (PHA) a 10 mg/mL (Mabtech) en los experimentos realizados en el IrsiCaixa. Las células se incubaron durante la noche a 37° C con 5% de CO₂. A continuación, las placas se lavaron seis veces con solución salina tamponada con fosfato (sin Ca o Mg; Mediatech), y 0,5 µg/mL de anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ biotinilado, se añadió (7-B6-1 de Mabtech) durante 1 hora a temperatura ambiente . Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron con una dilución 1:2000 de estreptavidina acoplada (Mabtech) durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Las placas se lavaron de nuevo, y la producción de IFN-γ se detectó como manchas de color

azul oscuro después de una breve incubación con nitroazul de tetrazolio y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (Bio-Rad, Hercules, CA). La reacción de color se detuvo lavando las placas con agua del grifo. Las manchas se contaron usando el (CTL-ImmunoSpot Analyzer, C.T.L., USA) en IrsiCaixa y el (Bioreader 5600, Bio-Sys, Alemania) en el CIENI; los resultados se expresaron como células formadoras de puntos (SFC) por millón de células incubadas.

El punto de corte para las respuestas positivas se determinó; como al menos cinco puntos (50 SFC/10⁶ PBMC) por pozo, como el número de respuestas superiores a la media de pocillos negativos más 3 desviaciones estándar, o tres veces la media de los pozos de control negativo, cualquiera de los tres valores que fuese mayor.

PCR y secuenciación masiva de VIH PR-RT. El RNA viral se extrajo de 1 mL de plasma por columnas con membrana de sílica (QIAamp Viral RNA Kit; Qiagen, Valencia, CA). Un fragmento del gen *pol* viral incluyendo toda la proteasa (PR) y 334 codones de la transcriptasa reversa (RT) se amplificó mediante RT-PCR anidada con los *primers* PR_5'_OUTER_5'-CCCCTAGGAAAAGGGCTGTTG-3' (posiciones 2009-2030 en la secuencia consenso HXB2) y RT_3'_OUTER5'-GTTTTTCAGATTTTTTAAATGGCTCTTG-3' (3576-3602) para la primera ronda de amplificación, y PR_5'_INNER 5'-TGAAAGATTGTAAGAGACAGG-3' (2057-2080) y RT_3'_INNER 5'-GGCTCTTGATAAATTTGATATGTCC-3' (3559-3583) para la segunda ronda de amplificación. Se utilizaron, SuperScript III OneStep RT PCR (Invitrogen, Brown Deer, WI) y Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) para la primera y segunda ronda de PCR respectivamente, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante bajo las siguientes condiciones: 50° C durante 30 min (primera ronda solamente); 94° C durante 3 min; 35 ciclos de 94° C durante 30 seg, 60° C durante 30 seg, 72° C durante 2 min y una extensión final de 72° C durante 5 min.

La secuenciación masiva o NGS por sus siglas en inglés (Semiconductor Next Generation Sequencing) se llevó a cabo para identificar variantes con mutaciones de resistencia a fármacos dentro de las poblaciones virales de cada participante.

Los productos de PR-RT PCR fueron fragmentados enzimáticamente y utilizados para construir las bibliotecas genéticas con un código de barras para cada virus mediante el (Ion Xpress Plus Fragment Library Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), según las instrucciones del fabricante. El templado de secuenciación fue creado por PCR en emulsión usando el (Ion PGM Template OT2 200 Kit, Thermo Fisher Scientific) y la secuenciación se realizó utilizando el (Ion PGM Sequencing 200 Kit v2, Thermo Fisher Scientific) en los chips 316v2 utilizando el equipo (Ion PGM, Thermo Fisher Scientific). Los datos de las corridas Ion PGM se procesaron inicialmente utilizando la plataforma específica de software (Torrent Suite v1.3.1) para generar las secuencias (*reads*), recortar las secuencias de los adaptadores, filtrar y eliminar los *reads* con un perfil de baja intensidad de señal. El siguiente análisis consistió de un enfoque de re-secuenciación con alineamientos iterativos, alineando cada *read* a la referencia y empalmado las diferentes variantes para obtener cada cuasiespecie viral presente en cada uno de los pacientes analizados. Esto produjo un valor cuantitativo de la proporción de cuasiespecies en cada muestra. Los archivos de secuenciación masiva que se obtuvieron del Ion PGM están almacenados para su consulta en la base de datos BioSample NCBI, con los números de acceso del 4276943 al 4276962.

Análisis de resistencia a fármacos ARV por secuenciación masiva. La frecuencia de mutaciones DR dentro de la población viral de cada paciente, se evaluó a partir de las corridas de secuenciación masiva utilizando el programa Hydra, que es un software de análisis VIH-DR automatizado desarrollado por el Laboratorio Nacional de Microbiología de la Agencia de Salud Pública de Canadá (97). Funciona de la siguiente manera: primero se aplica un filtro de control de calidad para cada corrida, seleccionando los *reads* con una longitud >100 bases y con una calidad media >Q30. Las lecturas se alinearon contra la secuencia de referencia (HXB2) con un tamaño de 11 k-mer usando el software (SMALT, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Reino Unido). Se eliminaron los alineamientos de *reads* con valores sobrelapados (porcentaje del *read* incluido en

el alineamiento a la referencia) por debajo de 65% y con valores de identidad (porcentaje del *read* idéntico al alineamiento de referencia) por debajo de 75%.

Las variantes se identificaron usando un identificador personalizado de un solo nucleótido viral. Las variantes se eliminaron cuando la calidad era <30, con una profundidad de lectura <100 y con menos de 5 alelos, los aminoácidos mutados entonces se identificaron y compararon contra un conjunto de bases de datos de mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales (DR) incluyendo la lista de la OMS de mutaciones para la vigilancia de DR (98) y la base de datos de Stanford VIH-DR (99). En la presente tesis se reportan todas las mutaciones DR con frecuencia de más de 1%. Sin embargo, se utilizó un umbral más conservador del 2% para definir la presencia de mutaciones DR dado que la capacidad de detectar las variantes minoritarias depende de la profundidad de la secuenciación y de la carga viral. Utilizando nuestro protocolo de secuenciación, una profundidad de secuencia de 1500-2000x y una carga viral > 2500 copias/mL hubiera sido necesaria para identificar con precisión las variantes a una frecuencia de 1%.

Determinación de la frecuencia de variantes de epítomos y péptidos usando secuenciación masiva. Los *reads* obtenidos de la secuenciación masiva se alinearon, permitiendo una discordancia (*mismatch*) por *read* mediante el componente de *read* corto del alineador (Burrows-Wheeler Aligner, BWA) (100) contra la referencia (HXB2, NCBI número de acceso K03455.1). Los *reads* con múltiples *mismatches* fueron descartados. Usando programación especialmente diseñada en R para este propósito, todos los *reads* que contenían bases con calidades individuales <Q20 fueron descartados y el resto fueron traducidos de acuerdo al código genético estándar y en el marco de lectura del gen al que fueron alineados. Estos epítomos ya traducidos fueron entonces comparados contra todas las secuencias de péptidos incluidos en el estudio. La frecuencia de los *reads* con 100% de identidad con cada secuencia de péptido en el ensayo se calculó con la misma secuencia de comandos R y se utilizó para los análisis posteriores.

Tipificación del antígeno leucocitario humano HLA. El DNA para la tipificación fue extraído utilizando el kit de extracción (QIAamp DNA Blood, QIAGEN, Valencia, CA) a partir de 6 millones de PBMC y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para todas las muestras se realizó una tipificación de HLA clase I a alta resolución mediante la tipificación basada en la secuenciación, utilizando kits comerciales (SeCore A, B and Cw Locus Sequencing Kits, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Las asignaciones de los alelos se hicieron con (uTYPE v6.0, Thermo Fisher Scientific) y por último las ambigüedades se resolvieron mediante la herramienta HLA Completion disponible en línea (101).

Análisis estadísticos. Se realizaron pruebas U de Mann-Whitney (STATA / SE v12, StataCorp, College Station, TX) para buscar asociaciones entre la presencia/ausencia de todos los alelos HLA de clase I encontrados en la cohorte con respuestas positivas de ELISpot a cada péptido probado. Estas asociaciones fueron corregidas por múltiples comparaciones de manera que exista un balance lógico entre el número de falsos y verdaderos positivos, ya que cuando se trata de análisis entre tantos datos, como ocurre en el caso de análisis genéticos, es posible observar asociaciones espuriamente positivas (con p significativa) que se dan por simple azar, por eso se introduce el estadístico q (102), que es una medida de significancia en términos de razón de falsos descubrimientos (false discovery rate FDR), es decir, la probabilidad de que eventos identificados como significativos en comparaciones múltiples en realidad no lo sean. (Storey q-value, q value package for R v2.12). Para comparar las magnitudes de las respuestas ELISpot entre pares de péptidos WT y DR se utilizaron los análisis Wilcoxon ranked test (STATA / SE v12, StataCorp).

6. RESULTADOS

6.1 Respuestas frecuentes observadas en epítomos DR.

Teniendo en cuenta que el reconocimiento inmune de variantes DR podría ofrecer una oportunidad para imponer una doble presión de selección sobre el VIH, se evaluó la respuesta de las células T contra epítomos CTL con posiciones DR en sobreposición con huellas de HLA de clase I coincidiendo con las posiciones DR (95) utilizando tanto péptidos que contienen el aminoácido WT o la variante DR. Los 218 péptidos probados fueron dispuestos en 140 pares WT-DR (95 correspondientes al Set "b" y 45 para el Set "a"). Cuando múltiples mutaciones de resistencia se presentaron en el mismo péptido, se sintetizó un péptido para cada combinación de posiciones DR y WT y se comparó con el mismo péptido complementario WT.

Se determinó la frecuencia de reconocimiento de secuencias DR y WT y se comparó la magnitud de la respuesta para cada DR restando la magnitud de su péptido par WT (n = 140). Del total de 218 péptidos probados, 217 (99,5%) fueron reconocidos por al menos uno de los 49 individuos en el estudio. La mediana de los pacientes que reconocen cada uno de los 218 péptidos fue de 5 (rango 0-15 sujetos, IQR 4-6). La mediana del número de respuestas observadas por individuo fue de 16 (rango 0-123, IQR 1-35). El número total de respuestas considerando todos los participantes y todos los péptidos fue de 1,120.

Se observó una amplia gama de magnitudes diferenciales de respuesta en los pares de péptidos DR vs. WT (Figura 6.1). Esta observación se mantuvo al dividir los pares de péptidos en Conjunto "a" y ajuste "b", de acuerdo con la lógica de diseño de péptidos (ver Métodos; Figura 6.2). De los 140 pares analizados, cuatro (dos pertenecientes al Set "a" y dos para ajustar "b") indujeron respuestas significativamente más fuertes por la variante DR, mientras que cinco (uno perteneciente a Set "a" y cuatro a Set "b") mostraron respuestas significativamente más fuertes con la variante WT (Tabla 6.1; Figura 6.2).

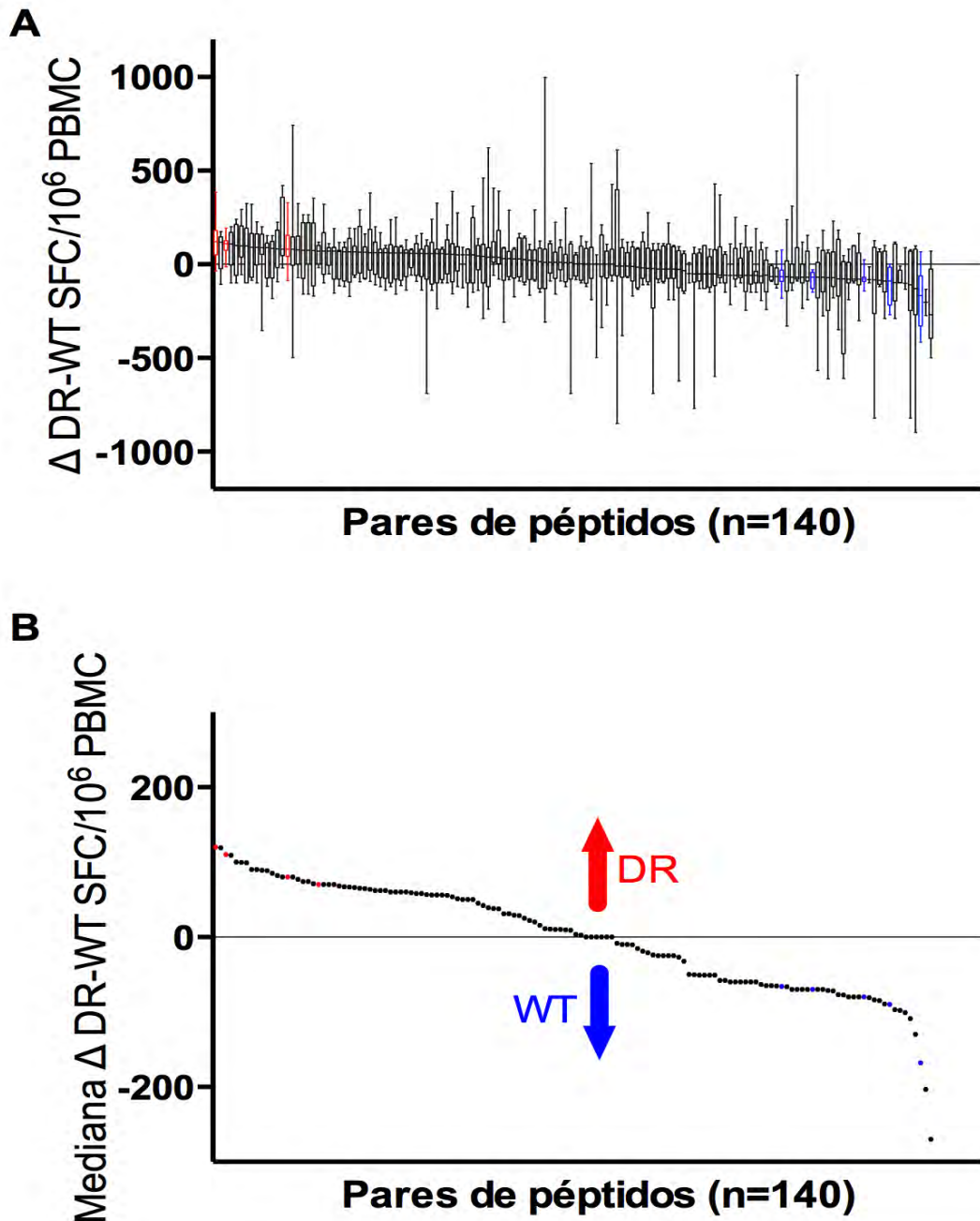


Fig 6.1. Amplia gama de magnitudes entre péptidos WT y DR. **A.** Se muestran para cada respuesta la diferencia de magnitudes de respuesta por cada par de péptidos DR-WT (Δ). Las Δ se calcularon como la magnitud de la respuesta (SFC / millones de PBMC) a la secuencia de DR menos la magnitud de la respuesta a la secuencia WT para cada sujeto individualmente. La media entre la diferencia de la magnitud de respuestas se calculó para todos los individuos que respondieron ya sea a los péptidos WT, DR o ambos. Las cajas representan el 50% de la Δ de cada par de péptidos DR-WT, los bigotes muestran el máximo y mínimo de la diferencia de magnitudes. **B.** Aquí sólo se muestran las medianas de las Δ . Los pares de péptidos con significativamente mayor respuesta a DR se muestran en rojo mientras que los pares de péptidos con significativamente mayor respuesta a WT se muestran en azul ($p < 0,05$).

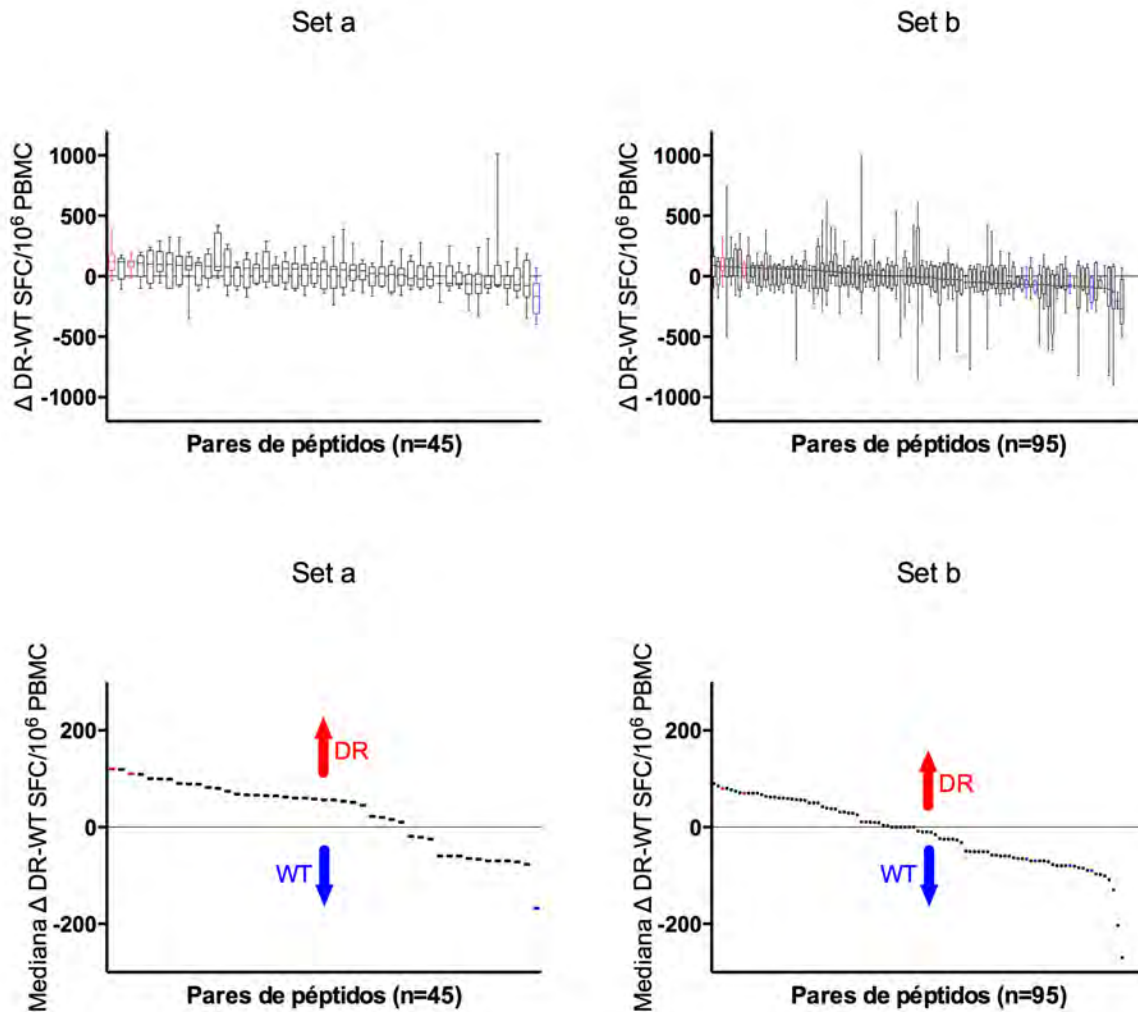


Figura 6.2 Gama de magnitudes por Sets. En los paneles superiores se muestran para cada respuesta la diferencia de magnitudes de respuesta por cada par de péptidos DR-WT (Δ) divididos por sets. Las Δ se calcularon como la magnitud de la respuesta (SFC / millones de PBMC) a la secuencia de DR menos la magnitud de la respuesta a la secuencia WT para cada sujeto individualmente. La media entre la diferencia de la magnitud de respuestas se calculó para todos los individuos que respondieron ya sea a los péptidos WT, DR o a ambos. Las cajas representan el 50% de la Δ de cada par de péptidos DR-WT, los bigotes muestran el máximo y mínimo de la diferencia de magnitudes. En los paneles inferiores sólo se muestran las medianas de las Δ . Los pares de péptidos con significativamente mayor respuesta a DR se muestran en rojo mientras que los pares de péptidos con significativamente mayor respuesta a WT se muestran en azul ($p < 0,05$).

Tabla 6.1. Pares de péptidos con un peso significativo diferencial de magnitud media de la respuesta Δ DR-WT^a

Péptido WT	Magnitud de respuesta al péptido WT (Mediana (rango); SFC/10 ⁶ PBMC)	Péptido DR	Magnitud de respuesta al péptido DR (Mediana (rango); SFC/10 ⁶ PBMC)	Mediana de Δ de la respuesta DR-WT (SFC/10 ⁶ PBMC)	Gen VIH	Mutación DR	p
RN LL TQIGC	0 (0-140)	RNL M TQIGC	130 (51-450)	120	PR	L90M	0.0009
QHLLRWGL T	0 (0-62)	QHLLRWGL Y	115 (60-200)	110	RT	T215Y	0.0005
DTV L EEMNL	29 (0-200)	DTV I EEMNL	130 (60-380)	80	PR	L33I	0.002
KMIGG I GGFI	0 (0-163)	KMIGG V GGFI	80 (51-163)	70	PR	I50V	0.0039
EK E GKISKI	72 (56-190)	EK D GKISKI	0 (0-113)	-66	RT	E44D	0.0195
K KSVTVLDVGDAYFS	123 (51-930)	N KSVTVLDVGDAYFS	0 (0-890)	-70	RT	K103N	0.0078
EELRQH L LRW	80 (0-164)	EELRQH LWR W	0 (0-60)	-80	RT	L210W	0.0007
K KSV TVLDVGDAYFS	123 (51-930)	K KSM TVLDVGDAYFS	0 (0-690)	-90	RT	V106M	0.0313
N LL TQIGCT	170 (0-484)	N LM TQIGCT	0 (0-238)	-168	PR	L90M	0.0005

^a Prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Posiciones asociadas con la resistencia a fármacos se muestran en negrita.

Las mutaciones DR incluidas en los pares de péptidos con respuestas más fuertes fueron L33I, I50V y L90M en la proteasa (PR) y T215Y en transcriptasa reversa (RT). Estas observaciones sugieren que algunas variantes DR son fuertemente inmunogénicas en la mayoría de personas analizadas en la presente cohorte.

De hecho, como se puede ver en la figura 6.3, una mediana de 4 pares de péptidos por individuo mostraron respuestas solamente a WT, una mediana de 2 pares de péptidos por individuo mostraron respuestas a ambas variantes mientras que una media de 6 pares de péptidos por individuo mostraron respuestas sólo a la variante DR. Esto sugiere que la presencia de mutaciones DR puede dar como resultado, ya sea la creación de nuevos epítomos de CTL o la pérdida de epítomos WT. Los datos también indican que las respuestas a péptidos DR o WT específicos son más comunes que las respuestas de reacción cruzada ($p < 0.0001$ y $p = 0.0005$, respectivamente, Fig 6.3), en concordancia con la idea de que muchas mutaciones DR son eficaces variantes de escape CTL (103, 104). Es importante destacar que estas observaciones se mantuvieron en ambos sets de péptidos cuando fueron analizados por separado (Figura 6.4).

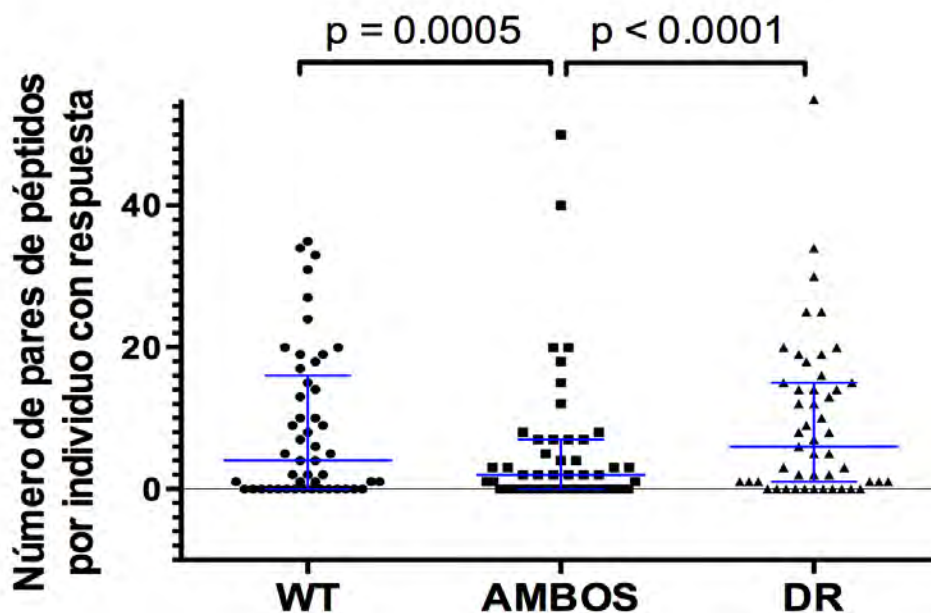


Figura 6.3 Frecuencia en el reconocimiento de mutaciones DR. Respuestas ELISpot en un panel de 140 pares de péptidos DR-WT se evaluaron 49 individuos. Se muestran tres grupos de izquierda a derecha los individuos que sólo reconocieron a los péptidos WT, los que reconocieron ambos péptidos y los que solamente reconocieron a los péptidos DR. La gráfica de dispersión muestra el resultado de tres pruebas de Wilcoxon donde se comparan los datos pareados entre los grupos, solo los valores de p significativos se muestran en la parte superior. Las barras de error muestran la mediana con rangos intercuartiles.

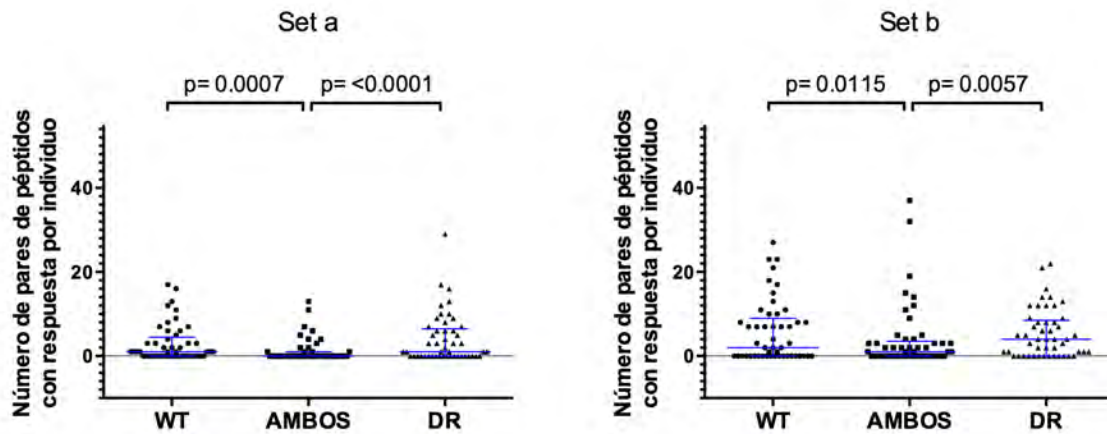


Figura 6.4 Frecuencia en el reconocimiento de mutaciones DR por Sets. Las respuestas ELISpot a un panel de 45 de pares de péptidos en el Set "a" y 95 en el set "b", fueron evaluados en 49 individuos. Se muestran tres grupos de izquierda a derecha los individuos que sólo reconocieron a los péptidos WT, los que reconocieron ambos péptidos y los que solamente reconocieron a los péptidos DR. La gráfica de dispersión muestra el resultado de tres pruebas de Wilcoxon donde se comparan los datos pareados entre los grupos, solo los valores de p significativos se muestran en la parte superior. Las barras de error muestran la mediana con rangos intercuartiles.

Después procedimos a analizar si la existencia de una asociación entre un HLA y un sitio específico de mutación de resistencia influyó en las respuestas a los péptidos DR, utilizando solamente los péptido del Set "b". Es importante destacar que existen muy pocas posiciones en la proteasa y transcriptasa reversa que se asocien tanto con posiciones de resistencia a fármacos como a HLA simultáneamente. La lista más completa de las asociaciones en la mayor cohorte analizada hasta ahora, compuesta por personas infectadas con VIH subtipo B, principalmente caucásicos y vírgenes a tratamiento antirretroviral de América del Norte y Australia (105) incluyó solamente 8 asociaciones HLA que coinciden con sitios de mutaciones DR (3 en PR y 5 en RT; Anexo 2). Utilizando sólo el Set "b" (que incluye 95 pares de péptidos), 39 pares sobrelapan las posiciones asociadas DR-HLA de acuerdo con Carlson *et al.*, mientras que 56 pares de péptidos se superponen a las posiciones DR sin asociación HLA. Es interesante observar que las respuestas a péptidos WT o DR fueron significativamente mayores que las respuestas a ambos WT y DR solamente en pares de péptidos que sobrelapan posiciones DR sin asociación HLA (Fig 6.5). Además, la distribución de magnitudes diferenciales de las respuestas a los pares de péptidos en posiciones

DR superpuestas con y sin asociaciones HLA fueron similares, ambos grupos incluyen pares de péptidos con respuestas significativamente superiores a WT o péptidos DR (Fig 6.5).

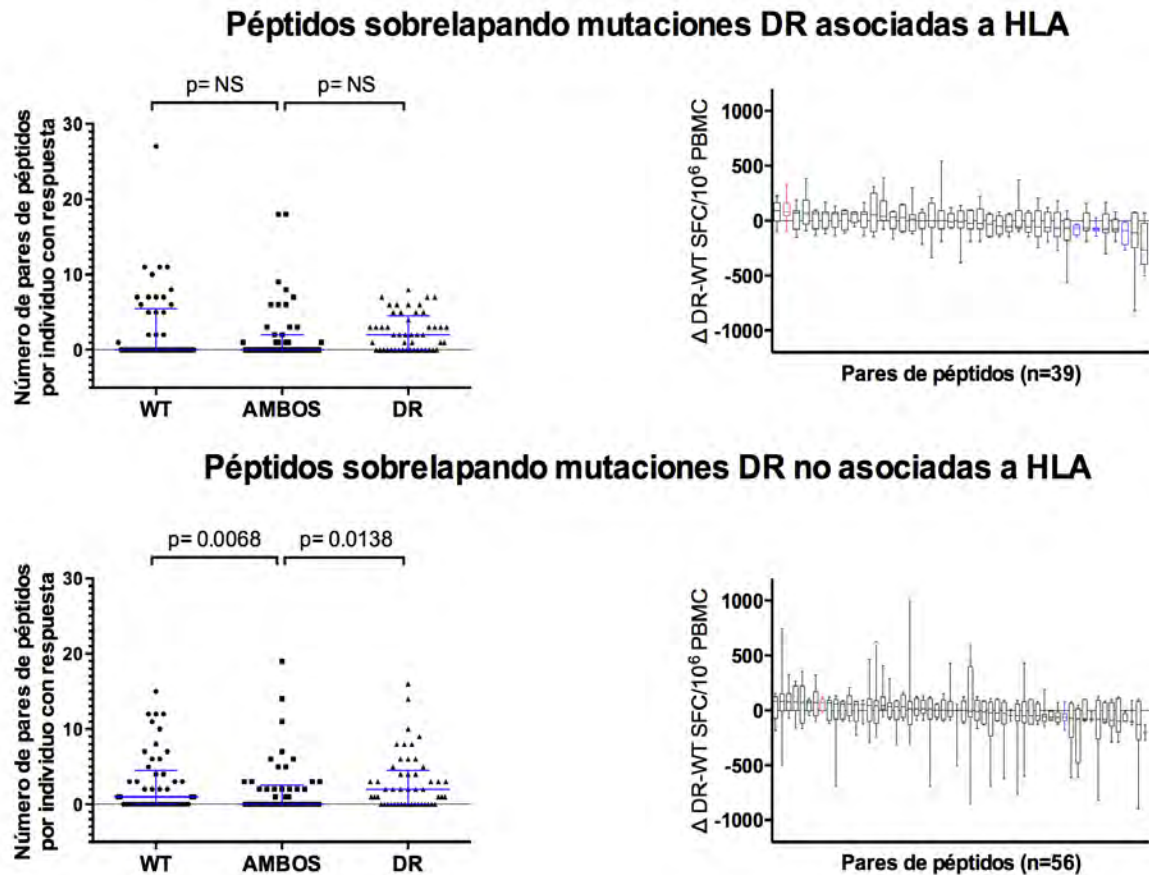


Figura 6.5 Frecuencia de reconocimiento y diferencia en las magnitudes de las respuestas a péptidos DR y WT que superlapan mutaciones DR con y sin asociación HLA. Las respuestas ELISpot a un panel de 39 y 56 pares de péptidos DR-WT para los péptidos superpuestos posiciones DR con y sin la asociación de HLA, respectivamente, fueron evaluados en 49 individuos. La presencia o ausencia de las asociaciones HLA se determinó por comparación con los datos publicados previamente (105). Las gráficas de dispersión muestra el resultado de tres pruebas de Wilcoxon en tres grupos de izquierda a derecha los individuos que sólo reconocieron a los péptidos WT, los que reconocieron ambos péptidos y los que solamente reconocieron a los péptidos DR se comparan los datos pareados entre los grupos, los valores de p significativos están indicados. Las barras de error muestran la mediana con rango intercuartil. Las Δ se calcularon como la magnitud de la respuesta (células formadoras de puntos / millón PBMC) a la secuencia de DR menos la magnitud de la respuesta a la secuencia WT en cada sujeto individualmente para cada par de péptidos. Las cajas representan el 50% de la magnitud diferencial de cada par de péptidos DR-WT, y los bigotes indican al máximo y al mínimo de la Δ . Los pares de péptidos con significativamente mayor Δ a DR se muestran en rojo y los pares de péptidos con significativamente mayor Δ a WT se muestran en azul ($p < 0,05$).

Con el fin de distinguir las respuestas reales a péptidos específicos de las respuestas por reacción cruzada, se compararon las medianas de las magnitudes de la respuesta a los péptidos de WT y DR (Tab 6.2). No se observaron diferencias en las medianas de las magnitudes de respuesta a péptidos WT (mediana 95, IQR 80-105 SFC / 10^6 PBMC) y péptidos DR (mediana 99, IQR 81-116 SFC / 10^6 PBMC) ($p = 0.2844$), lo que sugiere que las respuestas observadas a los péptidos DR no están asociados con reactividad cruzada y representan respuestas específicas. De hecho, en el caso de los péptidos del Set "a", las respuestas a péptidos DR eran significativamente más fuertes que las respuestas a los péptidos WT ($p = 0.0125$; Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Medianas de las magnitudes de las respuestas ELISpot.

	Ambos sets		Péptidos Set a		Péptidos Set b	
	Mediana	(IQR)	Mediana	(IQR)	Mediana	(IQR)
Respuestas a todos los péptidos (SFC/ 10^6 PBMC)	95.6	(81, 113)	99.5	(72.9, 150)	90	(71, 130)
Respuestas solo a péptidos WT (SFC/ 10^6 PBMC)	94.8	(80, 104.7)	91.2	(72.9, 163.3)	91.2	(72.9, 150)
Respuestas solo a péptidos DR (SFC/ 10^6 PBMC)	99.4	(81.1, 115.9)	100.3	(72.9, 127.7)	90	(70, 129)
p^a	0.2844		0.0125*		0.6995	

^a Prueba de Mann-Whitney entre respuestas solo a péptidos WT vs. solo a péptidos DR.

6.2 Alta proporción en el reconocimiento de epítomos DR.

Analizando la totalidad de las respuestas, se identificaron 22 péptidos (7 del Set "a" y 15 del Set "b") que fueron reconocidos por más del 15% (más de 7 personas) de la cohorte. Catorce (63%) de estos péptidos frecuentemente reconocidos incluyen mutaciones DR (4 en el Set "a" y 10 en el Set "b"; Tabla 6.3).

Sorprendentemente, ocho péptidos fueron reconocidos por más del 20% (más de 9 individuos) de la cohorte, y cinco de ellos (63%) incluyen mutaciones DR (Fig 6.7). Dentro de estos ocho casos, el reconocimiento de los tres péptidos WT fue estadísticamente mayor que sus homólogos de DR y el reconocimiento de tres de los cinco péptidos DR fue mayor que sus homólogos WT (Fig 6.7). Teniendo en cuenta los 5, 10 o 20 primeros péptidos más frecuentemente reconocidos, la proporción de péptidos que reflejan mutaciones DR fue de 40%, 50% y 65%, respectivamente. En su conjunto, estas observaciones sugieren que las respuestas específicas a los péptidos DR son muy frecuentes en la cohorte del estudio.

Cabe destacar que en sólo 3 de los 22 péptidos más frecuentemente reconocidos el alelo HLA de clase I restrictivo que había sido confirmado experimentalmente se encontró, en efecto, sobrerrepresentado en el grupo de los respondedores en comparación con los individuos que no montaron una respuesta. (Tabla 6.3).

En algunos casos, los alelos HLA predichos para unir a los péptidos, pero no confirmados experimentalmente, se encontraron también sobrerrepresentados. Curiosamente, en algunos de estos últimos casos, la respuesta se asoció a alelos HLA de clase I observados frecuentemente en poblaciones con ascendencia amerindia (tales como A*24, B*39, C*04), y con alelos frecuentes en poblaciones caucásicas (A*11, B*42, C*17, C*02) (47).

Fue interesante ver que, las respuestas a los péptidos con sitios estadísticamente predichos a la asociación HLA-DR (95) (7/22 péptidos más frecuentemente reconocidos, Tab 6.3) generalmente no coinciden con el esperado HLA que define dicha asociación.

Estas observaciones sugieren un alto nivel de promiscuidad por parte de los HLA en el reconocimiento de los péptidos.

Tabla 6.3. Péptidos más frecuentemente reconocidos.

Péptido ^a	Set ^b	WT o DR	Posición DR sobrelapada	Proteína VIH	Individuos respondiendo al péptido (n (%))	Mediana de las magnitudes de respuesta (rango; SFC/10 ⁶ células)	HLA Potencialmente restrictivo ^c
NLLTQIGCT	a	WT	L90M	PR	15 (31)	230 (60-484)	B*18
GRNLLTQIG	a	WT	L90M	PR	14 (29)	135 (56-290)	C*02
RNLMTQIGC	a	DR	L90M	PR	14 (29)	170 (51-450)	A*11, C*04
QHLLRWGLY	a	DR	T215Y	RT	12 (24)	115 (60-200)	C*02, C*15
EELRQHLLRW	b	WT	L210W	RT	12 (24)	90 (70-164)	B*39
KMIGGVGGFI	b	DR	I50V	PR	11 (22)	90 (51-162)	B*39
ITLWQRPIV	b	DR	L10I	PR	10 (20)	169 (56-450)	A*33, C*02, C*16
DTVIEEMNL	b	DR	L33I	PR	10 (20)	162 (60-380)	C*02
IGRNLLTQI	a	WT	L90M	PR	9 (18)	123 (70-260)	A*26, A*80, B*42, C*17
EKEGKISKI	b	WT	E44D	RT	9 (18)	87 (56-190)	A*02, A*80, B*38, B*47
YQYVDDLIV	b	DR	M184V	RT	9 (18)	322 (58-1150)	A*01, A*02, B*47
LRWGLYTPD	a	DR	T215Y	RT	8 (16)	99 (58-163)	A*02, A*11
TVLIGPTPV	a	DR	V77I	PR	8 (16)	120 (82-200)	A*33, A*74, A*80, B*45, C*16, C*02
DTIFEEMNL	b	DR	V32I, L33F	PR	8 (16)	94 (50-190)	A*33, A*74, A*80
LVGPTPANI	b	DR	V82A	PR	8 (16)	87 (50-130)	A*02, A*80, B*39, B*42, B*47, C*17
NTPVFAIKR	b	DR	K65R	RT	8 (16)	98 (67-160)	A*80, B*42, C*14, C*17
KKSVTVLDVGDAYFS	b	WT	K103N, V106M, V108I, Y115F, F116Y	RT	8 (16)	223 (51-930)	A*24, A*26
NKSMTILDVGDAFYS	b	DR	K103N, V106M, V108I, Y115F, F116Y	RT	8 (16)	89 (52-119)	A*80, B*15, B*38, B*42, C*17
KQNPDIVIY	b	WT	Y181C	RT	8 (16)	195 (50-523)	A*24, A*26, A*74, A*80, B*42, B*47, C*02, C*17
KQNPDIVIC	b	DR	Y181C	RT	8 (16)	170 (60-532)	A*24, A*26, B*39, B*42, C*17
NPDIVICQYM	b	DR	Y181C	RT	8 (16)	116 (60-200)	A*02, A*26, B*27
YQYMDDLIV	b	WT	M184V	RT	8 (16)	292 (80-1050)	A*02, A*80, B*18

^a Se muestran los 22 péptidos más frecuentemente reconocidos en la cohorte de estudio. (>15% de los individuos respondedores). Las posiciones asociadas con DR se muestran en negritas.

^b Los dos Sets en los que se dividen los péptidos según el diseño experimental explicado en la sección de Métodos.

^c Se muestran los alelos HLA significativamente más frecuentes en el reconocimiento a los péptidos ($p < 0.01$, $q < 0.2$, Mann-Whitney). Se muestran en negritas las moléculas HLA previamente asociadas experimentalmente al correspondiente epítopo (Los Alamos HIV Immunology Database) y en cursivas las predichas por la herramienta ELF (Los Alamos HIV Immunology Database).

PR, proteasa; RT, transcriptasa reversa; SFC, células formadoras de puntos.

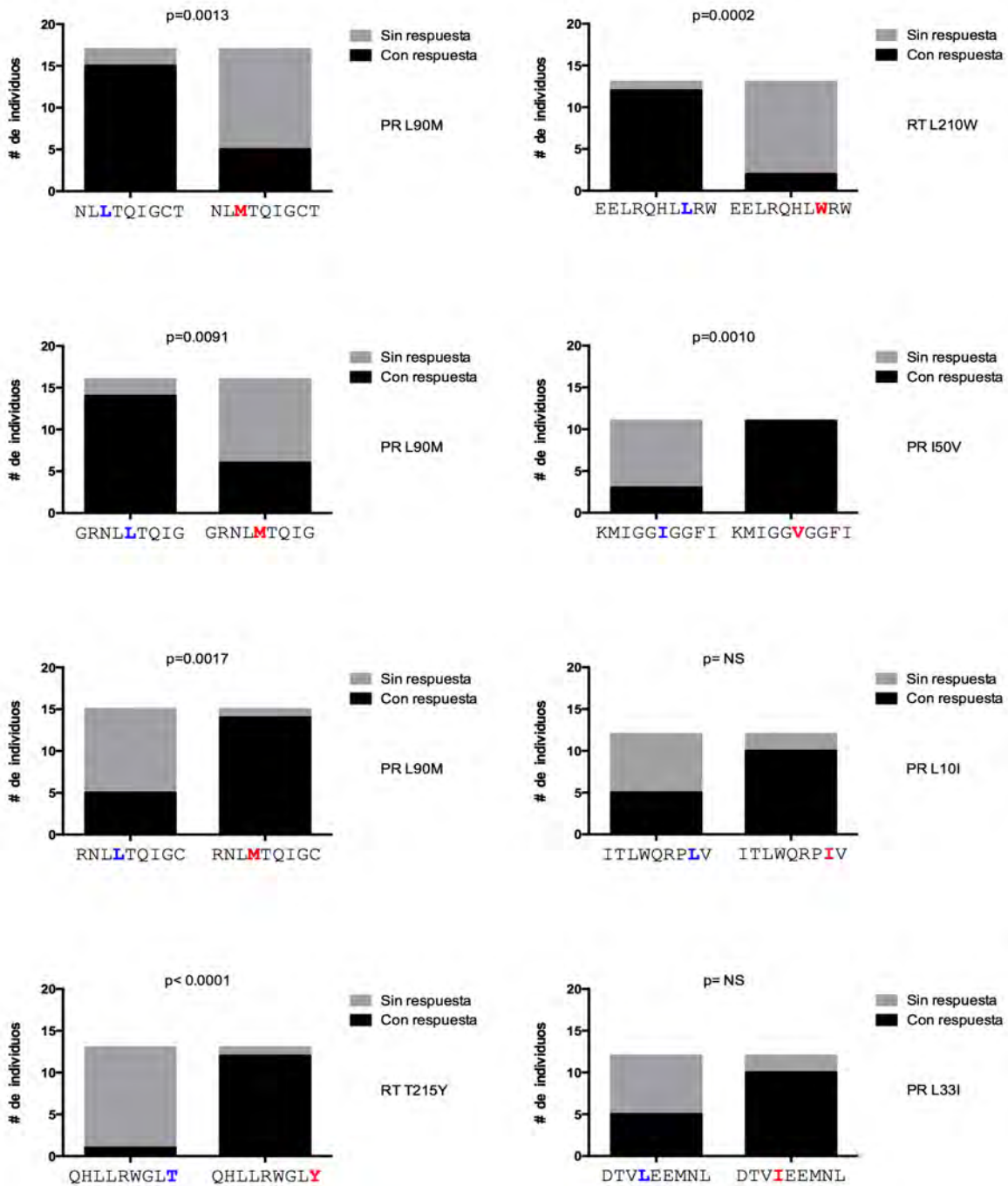


Figura 6.6 Péptidos más frecuentemente reconocidos en la cohorte del estudio. Los péptidos con respuestas IFN-gamma por ELISpot en 20% o más individuos en la cohorte del estudio se muestran con su pareja de péptido DR-WT. Estos 8 péptidos fueron reconocidos por al menos 10 individuos, lo que nos da suficiente potencia para comparar la mediana de la magnitud de respuesta entre el péptido WT y DR. Los sitios donde se asocia una mutación de resistencia en el péptido WT se marcan en azul y la mutación DR en el péptido DR se marca en rojo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher) en el reconocimiento del péptido WT vs DR para 6 de los 8 pares de péptidos.

6.3 Respuestas inmunes no correlacionan con presencia viral.

Debido al reconocimiento frecuente de los péptidos que contienen mutaciones DR en la cohorte del estudio, se indagó si la presencia de variantes DR podrían haber estimulado estas respuestas. Como todos los sujetos del estudio fueron vírgenes a tratamiento ARV, se esperaba que la frecuencia de las mutaciones DR fuera baja (82). Se realizó un análisis de secuenciación masiva detallado de la población de virus circulante en individuos del CIENI para los que se disponía de muestras de plasma. Se obtuvieron secuencias para 20 de los 24 sujetos del CIENI con una profundidad media de secuenciación de 645 *reads* (IQR 315-982, después de la filtración por tamaño y calidad del *read*). Sólo fueron considerados los *reads* con tamaño >100 bases y con una media de la calidad >Q30.

Tabla 6.4 Presencia de mutaciones DR sobrelapando a los péptidos probados por individuo en la cohorte de estudio.^a

	M28	M30	M37	M39	M40	M41	M43	M44	M45	M46	M47	M48
PR L10I							10.3					
PR K20R ^b					1.1							
PR D30N							1.2					
PR L33V ^b											3.6	
PR V82I ^b								99.5				2.5
RT D67N						93.2						
RT K103R ^b		97.7	98.3	4.6	7.1		5.7	2.9	7.3	3.9	7.5	3.9
RT V108I	4.6											
RT V118I									25.6			
RT K219Q						99.5						

^a La proporción de variantes de VIH con mutaciones de resistencia se calculó por secuenciación masiva en cada individuo como se describe en Métodos. Se muestran los porcentajes de virus con mutaciones de resistencia a fármacos ARV en la población viral. Sólo las mutaciones que sobrelapan los péptidos probados y presentes en al menos un individuo se encuentran en la lista. Los casos en donde coincide la respuesta a ELISpot a péptidos DR con la presencia de dicha mutación ARV se indican en negritas.

^b Variantes incluidas en los péptidos probados para estas posiciones DR no correspondieron a la variante DR encontrada en el virus.

Tabla 6.5. Correlación entre la respuesta inmunológica a péptidos específicos y la presencia del epítipo correspondiente en el virus del paciente^a

Individuo	Número total de péptidos con respuesta	Número total de péptidos WT con respuesta	Número total de péptidos DR con respuesta	Respuestas a péptido WT con presencia de epítipo WT (n (%))	Respuestas a péptido WT sin presencia de epítipo WT (n (%))	Respuestas a péptido DR con presencia de epítipo DR (n (%))	Respuestas a péptido DR sin presencia de epítipo DR (n (%))	p
M24	47	13	34	8 (62)	5 (38)	0	34 (100)	<0.0001
M25	41	17	24	11 (65)	6 (35)	1 (4)	23 (96)	<0.0001
M26	7	2	5	1 (50)	1 (50)	0	5 (100)	NS
M28	18	8	10	5 (63)	3 (38)	0	10 (100)	0.0065
M30	64	24	40	17 (71)	7 (29)	2 (5)	38 (95)	<0.0001
M31	35	14	21	9 (64)	5 (36)	1 (5)	20 (95)	0.0002
M32	34	19	15	4 (21)	15 (79)	0	15 (100)	NS
M35	9	1	8	1 (100)	0	0	8 (100)	NS
M36	5	1	4	1 (100)	0	0	4 (100)	NS
M37	44	25	19	19 (76)	6 (24)	0	19 (100)	<0.0001
M38	16	5	11	2 (40)	3 (60)	0	11 (100)	NS
M39	64	29	35	28 (97)	1 (3)	0	35 (100)	<0.0001
M40	24	5	19	5 (100)	0	0	19 (100)	<0.0001
M45	1	0	1	0	0	0	1 (100)	NS
M46	2	0	2	0	0	0	2 (100)	NS
M47	40	11	29	7 (64)	4 (36)	0	29 (100)	<0.0001
M48	2	1	1	1 (100)	0	0	1 (100)	NS
Promedio	26.6	10.3	16.4	7 (68)	3.3 (32)	0.2 (1.4)	16.1 (96.6)	0.0002

^a Se utilizó un límite de 2% para definir la presencia o ausencia de los epítipos DR o WT.

Posteriormente, se evaluó si la presencia y frecuencia de las mutaciones DR individuales después del alineamiento con el consenso HXB2 explican la detección de respuestas específicas contra epítomos DR. Se observaron las variantes DR y los polimorfismos en las posiciones DR en 12 de los 20 individuos (Tab 6.4). Sin embargo, en ningún caso la presencia de la variante DR corresponde a la respuesta de ELISpot para dicha variante DR. Curiosamente, se observaron 4 casos de respuesta a péptidos DR sobrelapados con la posición RT K103 en el que se observó la variante K103R DR, pero no K103N en la población viral, lo que sugiere un posible efecto de reacción cruzada (Tabla 6.4). En conjunto, estas observaciones sugieren que la presencia de variantes DR, incluso en niveles bajos, no explica la presencia de las respuestas ELISpot a péptidos que contienen mutaciones DR. Con el fin de evaluar si la presencia de secuencias específicas DR o WT predice la detección de respuestas específicas, se compararon los patrones de respuesta ELISpot y la existencia del epítomo correspondiente en las quasiespecies virales en cada participante (Tabla 6.5).

Curiosamente, la proporción media de las respuestas a péptidos WT que coincidió con la presencia del epítomo correspondiente fue de 68% de los casos, mientras que la proporción media de las respuestas a péptidos DR que coincidieron con la presencia del epítomo correspondiente fue de sólo el 1,4% ($p = 0,0002$). Teniendo en cuenta cada caso individual, la proporción de respuestas a péptidos WT en presencia del correspondiente epítomo WT en el virus del paciente fue significativamente mayor que la proporción de respuestas a los péptidos DR en presencia del correspondiente epítomo DR en 9 de 17 participantes (53%) en la mayoría de los casos restantes el número de respuestas no fue suficiente para observar diferencias significativas. Se observaron resultados similares cuando se separa el análisis de péptidos por Sets; Set "a" (Tabla 6.6) y Set "b" (Tabla 6.7). Estas observaciones sugieren que, aunque una gran parte de las respuestas a los péptidos WT puede explicarse por la presencia del epítomo en virus circulante del paciente, las respuestas a variantes DR en general no coinciden con la presencia de la secuencia correspondiente en el virus circulante.

Tabla 6.6 Correlación entre la respuesta inmunológica a péptidos específicos y la presencia del epítipo correspondiente en el virus del paciente Set “a”^a

Individuo	Número total de péptidos con respuesta	Número total de péptidos WT con respuesta	Número total de péptidos DR con respuesta	Respuestas a péptido WT con presencia de epítipo WT (n (%))	Respuestas a péptido WT sin presencia de epítipo WT (n (%))	Respuestas a péptido DR con presencia de epítipo DR (n (%))	Respuestas a péptido DR sin presencia de epítipo DR (n (%))	p
M24	14	6	8	4(67)	2(33)	0	8(100)	0.015
M25	23	13	10	9(69)	4(31)	1(10)	9(90)	0.0097
M26	1	1	0	1(100)	0	0	0	NS
M28	2	2	0	2(100)	0	0	0	NS
M30	16	8	8	8(100)	0	2(25)	6(75)	0.007
M31	15	7	8	6(86)	1(14)	0	8(100)	0.0014
M32	17	10	7	2(20)	8(80)	0	7(100)	NS
M35	1	0	1	0	0	0	1(100)	NS
M36	0	0	0	0	0	0	0	NS
M37	34	21	13	16(76)	5(24)	0	13(100)	<0.0001
M38	6	3	3	1(33)	2(67)	0	3(100)	NS
M39	25	17	8	17(100)	0	0	8(100)	<0.0001
M40	8	3	5	3(100)	0	0	5(100)	0.0179
M45	1	0	1	0	0	0	1(100)	NS
M46	0	0	0	0	0	0	0	NS
M47	1	1	0	1(100)	0	0	0	NS
M48	1	1	0	1(100)	0	0	0	NS
Promedio	9.7	5.5	4.2	4.2(76.3)	1.3(23.7)	0.2(4.2)	4.1(95.8)	0.0476

^a Se utilizó un límite de 2% para definir la presencia o ausencia de los epítipes DR o WT.

Tabla 6.7 Correlación entre la respuesta inmunológica a péptidos específicos y la presencia del epítipo correspondiente en el virus del paciente por péptido Set “b” ^a.

Individuo	Número total de péptidos con respuesta	Número total de péptidos WT con respuesta	Número total de péptidos DR con respuesta	Respuestas a péptido WT con presencia de epítipo WT (n (%))	Respuestas a péptido WT sin presencia de epítipo WT (n (%))	Respuestas a péptido DR con presencia de epítipo DR (n (%))	Respuestas a péptido DR sin presencia de epítipo DR (n (%))	p
M24	33	7	26	4(57)	3(43)	0	26(100)	0.0009
M25	18	4	14	2(50)	2(50)	0	14(100)	0.0392
M26	6	1	5	0	1(100)	0	5(100)	NS
M28	16	6	10	3(50)	3(50)	0	10(100)	0.0357
M30	48	16	32	9(56)	7(44)	0	32(100)	<0.0001
M31	20	7	13	3(43)	4(57)	1(8)	12(92)	NS
M32	17	9	8	2(22)	7(78)	0	8(100)	NS
M35	8	1	7	1(100)	0	0	7(100)	NS
M36	5	1	4	1(100)	0	0	4(100)	NS
M37	10	4	6	3(75)	1(25)	0	6(100)	0.0333
M38	10	2	8	1(50)	1(50)	0	8(100)	NS
M39	39	12	27	11(92)	1(8)	0	27(100)	<0.0001
M40	16	2	14	2(100)	0	0	14(100)	0.0083
M45	0	0	0	0	0	0	0	NS
M46	2	0	2	0	0	0	2(100)	NS
M47	39	10	29	6(60)	4(40)	0	29(100)	<0.0001
M48	1	0	1	0	0	0	1(100)	NS
Promedio	16.9	5.1	12.9	3(50.3)	2.1(32.1)	0.1(0.5)	12.1(93.7)	0.0147

^a Se utilizó un límite de 2% para definir la presencia o ausencia de los epítipos DR o WT.

7. DISCUSIÓN

Hemos explorado la posibilidad de limitar la evolución del VIH *in vivo* por medio de presiones selectivas opuestas ejercidas tanto por la respuesta inmune celular como por fármacos ART en la región pol PR-RT del virus. Después de evaluar las respuestas a los péptidos virales tanto WT como DR, se observó que las respuestas a los péptidos que contienen mutaciones DR fueron frecuentes y fuertes en una cohorte de individuos infectados con VIH pero sin tratamiento antirretroviral previo.

De hecho, los péptidos que incluyen mutaciones DR estaban entre los más frecuentemente reconocidos en la cohorte del estudio y su reconocimiento no se explica por la presencia de variantes DR en la población viral, incluso cuando se consideraron variantes de secuencia a baja frecuencia.

Este análisis permitió identificar péptidos candidatos que contienen mutaciones DR y que podrían proporcionar un beneficio para los pacientes con tratamiento ARV utilizados como una vacuna terapéutica putativa, dado que ambos, tanto el tratamiento como la vacuna, podrían reforzar la supresión viral y evitar el desarrollo de resistencia a los medicamentos.

Estos péptidos también podrían ser útiles como inmunógenos en estrategias “*kick and kill*”, en las que el virus se reactiva después de la vacunación terapéutica, pero mientras el individuo aún está con tratamiento ARV, aunque otros experimentos son necesarios para confirmar la inmunogenicidad de los péptidos en los individuos con tratamiento ARV.

Es importante señalar que algunas posiciones en PR y RT, que se asocian con DR también han demostrado asociación con HLA (105). Un punto interesante planteado en el presente estudio es que a pesar de que no se ha identificado una asociación directa de HLA con la posición DR en la mayoría de los casos, la

presencia de la variante DR sea suficiente para activar respuestas ELISpot, y que estas respuestas son con frecuencia exclusivas del péptido DR o del péptido WT. Además, se podría argumentar que las posiciones DR en asociación negativa con el HLA resultaría relevante, ya que sugiere un reconocimiento específico de la variante DR y la conservación del aminoácido WT.

Sin embargo, de las 8 asociaciones con HLA descritas previamente para sitios de mutación DR en individuos caucásicos vírgenes a tratamiento ARV (105), sólo una era una asociación negativa (PR A71 con B*57:01). Además, en un estudio previo en una cohorte de individuos australianos con falla a tratamiento ARV (95), se identificaron 6 sitios de mutación DR en RT en asociación con HLA, todas fueron asociaciones positivas. Sólo la mutación RT L210W se solapa entre los dos estudios.

La cohorte del estudio estuvo compuesta por una mitad de personas de origen mexicano y otra mitad de las personas de origen caucásico. Las características demográficas y clínicas de ambos grupos fueron similares. Sin embargo, las distribuciones de frecuencia de HLA fueron diferentes entre ellas (Anexo 2), como era de esperarse cuando se comparan individuos de origen caucásico con individuos con un componente de ascendencia amerindia (47). Teniendo en cuenta estas diferencias, la magnitud de las respuestas, así como la frecuencia de las mismas no varió entre las dos cohortes.

Ningún péptido fue reconocido exclusivamente por los individuos de alguna de las dos cohortes, lo que permite analizar las dos cohortes como una sola. Aunque la mediana del número de péptidos reconocidos por individuo fue de 16, hubo algunos individuos en los que se observó un número inesperadamente alto de respuestas: 71, 122 y 123 son péptidos reconocidos por los genotipos HLA B*57 / B*18, B*15:03 / B*44:03 y B*15:16 / B*42:01, respectivamente. Estas respuestas se confirmaron y fueron comparables a las observadas en otros respondedores. Estas respuestas inusuales coincidieron con el reconocimiento de la mayoría de

los conjuntos de péptidos que sobrelapan regiones individuales del gen. Es importante tener en cuenta que los péptidos fueron diseñados de forma independiente al repertorio HLA de los participantes en la cohorte de estudio. Teniendo en cuenta la presencia restrictiva de los epítomos HLA óptimamente definidos de los participantes, esperábamos que al menos el 47% de los pacientes respondieran a por lo menos un péptido, pero sorprendentemente, la frecuencia de respuestas resultó ser mucho más alta con un 82% de los pacientes respondiendo al menos a un péptido (Anexo 2). También es interesante tener en cuenta, que varias respuestas no se asociaron con el alelo HLA restrictivo que se esperaba, indicando posiblemente promiscuidad en el reconocimiento (106, 107) o especificidades desconocidas de alelos HLA, pobremente descritos, característicos de las poblaciones amerindias.

Inesperadamente, se observó que 22 péptidos fueron reconocidos por más de 15% de los participantes, de los cuales 14 (64%) incluyen mutaciones DR. Esta proporción se conserva (67% de los 134 péptidos con mutaciones DR) al bajar a un umbral de reconocimiento del 10% de los individuos de la cohorte con mayor número de péptidos reconocidos. La alta frecuencia de reconocimiento de estos péptidos en una cohorte inmunogénicamente diversa los hace buenos candidatos inmunogénicos para vacunas terapéuticas putativas y apoya la idea de que podría ser posible limitar al virus entre presiones selectivas opuestas como la inmunológica y la farmacológica. En los casos en los que una vacuna terapéutica incluya péptidos DR incluso, se podría reforzar el tratamiento ARV en un paciente con carga viral indetectable, evitando, además, el desarrollo de resistencia a los medicamentos.

En especial, los péptidos que contienen mutaciones de gran relevancia para los fármacos ARV fueron reconocidos frecuentemente, incluyendo las mutaciones: K65R, M184V, T215Y para inhibidores de transcriptasa reversa análogos de nucleósidos K103N, Y181C para inhibidores de transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos y V32I, I50V, V82A, L90M, para inhibidores de proteasa.

Por otra parte, también se observaron varias respuestas específicas a péptidos WT con alta frecuencia de reconocimiento y con fuertes magnitudes. Al comparar la respuesta de los pares de péptidos WT-DR, se observó una mediana de 4 respuestas por individuo sólo para los péptidos WT. Esto sugiere que la presencia de la mutación en el péptido DR también podría servir como variante de escape a CTL, evitando efectivamente el reconocimiento por parte del sistema inmune.

De hecho, 3 de los 8 péptidos más frecuentemente reconocidos en la cohorte fueron WT. En estos casos, el conocer previamente el HLA del paciente sería útil para evitar, en la medida de lo posible, el uso de fármacos antirretrovirales que podrían promover un escape viral doble, por ejemplo, el péptido NLLTQIGCT que sobrelapa la posición L90 de la proteasa fue el más frecuente reconocido de la cohorte de estudio, con una magnitud de respuesta significativamente mayor en comparación con la versión DR. Este epítipo está restringido por HLA-B*18. Por lo tanto, los pacientes con dicho HLA, que se trataran con inhibidores de proteasa serían más propensos a desarrollar virus con la mutación de resistencia L90M y en este caso, también se favorecería un escape inmune.

Se ha propuesto previamente que puede existir una respuesta de las células T CD8+ asociada a la estimulación por reacción cruzada con una menor avidez de las células T de memoria pre-existentes en el caso de una exposición secundaria a algunos patógenos altamente variables, incluyendo al virus del dengue y el virus del papiloma humano (108-110).

La expansión de las células T de memoria de reacción cruzada con baja avidez para los epítipos de la variante responsable de la segunda exposición antigénica (VIH en este caso) sobre las células T vírgenes con una mayor avidez para la nueva variante daría lugar a una baja magnitud y/o respuestas de células T subóptimas. Curiosamente, en el presente estudio, la media en la magnitud de las respuestas observadas para péptidos DR no fue diferente a la observada en los péptidos WT.

También hay que resaltar el hecho de que varios de los péptidos con la mayor frecuencia de reconocimiento, también mostraron significativamente mayores magnitudes de respuesta a péptidos DR, por ejemplo, el epítipo PR RNLMTQIGC, que incluye la mutación L90M, y el epítipo RT QHLLRWGLY, que incluye la mutación T215Y, ambos mostraron una frecuencia de reconocimiento de 29% y una mediana en la magnitud de respuesta significativamente mayor (Δ DR-WT). Esta observación sugiere que, en general, las respuestas observadas contra péptidos DR no fueron el resultado de una reacción cruzada, sino que generan respuestas de forma independiente. De hecho, ya se ha descrito la promiscuidad de los receptores de la célula T (TCR) para variantes de epítipos, con un grado limitado en la tolerancia para la generación de fuertes respuestas de CTL (111). En el trabajo de Hoof *et al.*, se encontró que los péptidos que suscitan respuestas de ELISpot son significativamente más similares al virus autólogo que los que no provocan una respuesta; con una única sustitución en el péptido se disminuye la probabilidad de observar una respuesta de CTL en un 40%.

Se observó un efecto similar en nuestro estudio, en el que las respuestas provocadas por los péptidos WT coincidieron con la presencia del epítipo en el virus autólogo en una mediana de 73% de los casos. Sin embargo fue interesante observar que las respuestas a péptidos DR no coincidieron con la presencia del epítipo DR en el virus de plasma autólogo, incluso cuando se buscó en las variantes de baja frecuencia. Varios escenarios podrían explicar este efecto. En primer lugar, la introducción de mutaciones DR en algunos péptidos no tuvo ningún efecto visible sobre el reconocimiento del péptido por CTL, lo que muestra un grado de promiscuidad del TCR a péptidos en los que la introducción de la mutación DR podría no anular la unión a la molécula de restricción HLA, como se describe anteriormente (111). En segundo lugar, podrían existir nuevos epítipos que contienen mutaciones DR, sin inmunogenicidad observada en el péptido WT, especialmente teniendo en cuenta que el repertorio de HLA de la cohorte de estudio incluyó a varios alelos de origen amerindio que todavía no han sido

descritos completamente. En tercer lugar, aun cuando nuestro método no permitió que encontráramos variantes DR en el virus autólogo, lo que podría explicar la presencia de respuestas a los péptidos DR, podrían existir variantes DR en el tejido linfoide u otros compartimentos corporales, y que podrían estar presentes en frecuencias más bajas de las que nuestro método es capaz de detectar con seguridad (<2%), o que podrían haber aparecido espontáneamente en puntos de tiempo anteriores y causar reactividad cruzada. En cuarto lugar, podría existir un efecto de “pecado original antigénico” para algunos péptidos DR, ya que la obtención de respuestas de reactividad cruzada que, a pesar de magnitudes similares en comparación con las respuestas a los péptidos de WT, podrían ser cualitativamente diferentes de las respuestas WT (112).

8. CONCLUSIONES

Nuestras observaciones sugieren que el acorralamiento del VIH a través del reconocimiento inmune de variantes DR podría ser factible, especialmente cuando se basa en el uso de péptidos con mayor frecuencia de reconocimiento y fuertemente reactivos. Sin embargo, también encontramos varios casos en los que el VIH es capaz de presentar un doble escape, es decir, la presencia de una mutación DR evitó el reconocimiento inmunogénico de un péptido, mientras que la versión WT del péptido si mostró respuesta. El uso de presiones selectivas opuestas sobre el VIH podría ser útil para diseñar estrategias de tratamiento y vacunación combinados y personalizados, evitando regímenes ARV con tendencia a fallar por la influencia de la respuesta inmune y la promoción del uso de fármacos antirretrovirales asociados con la selección de variantes DR reconocidas por el sistema inmune en el contexto inmunogenético del paciente tratado. Nuestro trabajo sugiere que el uso de péptidos con mutaciones de resistencia a fármacos ARV en las vacunas terapéuticas putativas, no sólo podría apoyar la supresión viral, sino también evitar el desarrollo de mutaciones de resistencia, lo que proporciona una doble ventaja para el paciente. A pesar de que nuestro estudio presenta salvedades que limitan nuestras conclusiones, nuestros resultados

demuestran que los péptidos DR son inesperadamente inmunogénicos y que se debe dar atención a su posible uso en las estrategias de control del VIH. Se necesitan más estudios para evaluar la calidad de las respuestas CTL producidas por péptidos DR, así como su frecuencia de reconocimiento en cohortes bajo diferentes contextos inmunogénicos.

9. PERSPECTIVAS

Se necesitan más estudios para evaluar la calidad de las respuestas CTL provocados por los péptidos DR altamente reconocidos en el presente trabajo, incluyendo polifuncionalidad de las células T y los patrones de producción de citocinas, con el fin de apoyar su posible papel como inmunógenos eficaces en las estrategias combinadas de control del VIH inmunológicas-farmacológicas. Si se llevan a cabo análisis detallados de las respuestas TCR que dirigen las respuestas a las secuencias WT y/o DR también podrían ayudar a comprender la ontogenia de estos hallazgos. Por otra parte, para apoyar el posible uso de péptidos DR en enfoques terapéuticos, se tendrá que evaluar la inmunogenicidad en los grupos de pacientes blanco incluyendo a las personas bajo tratamiento ARV y a las personas con falla virológica que han desarrollado mutaciones DR. Además, el estudio de los péptidos de otros objetivos terapéuticos tales como la integrasa y proteínas del gen Gag podría aumentar las opciones terapéuticas.

10. REFERENCIAS

1. Hymes KB, Cheung T, Greene JB, Prose NS, Marcus A, Ballard H, et al. Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. *Lancet*. 1981;2(8247):598-600.
2. Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, Rawson PG, Schultz MG. Pneumocystis carinii pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. *Annals of internal medicine*. 1974;80(1):83-93.
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-71.
4. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology*. 2006;7(3):235-9.
5. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nature medicine*. 2006;12(3):289-95.
6. Dandekar S. Pathogenesis of HIV in the gastrointestinal tract. *Current HIV/AIDS reports*. 2007;4(1):10-5.
7. Gottlieb MS, Schanker MD, Fan PT, Saxon MD, Weisman JD. Centers for Disease Control (CDC). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1981;30:250-2.
8. Piot P, Quinn TC, Taelman H, Feinsod FM, Minlangu KB, Wobin O, et al. Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet*. 1984;2(8394):65-9.
9. Van de Perre P, Rouvroy D, Lepage P, Bogaerts J, Kestelyn P, Kayihigi J, et al. Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda. *Lancet*. 1984;2(8394):62-5.
10. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*. 2014;346(6205):56-61.
11. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The causes and consequences of HIV evolution. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(1):52-61.

12. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2011;1(1):a006841.
13. Locatelli S, Peeters M. Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population. *Aids*. 2012;26(6):659-73.
14. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids*. 2006;20(16):W13-23.
15. Liegeois F, Lafay B, Formenty P, Locatelli S, Courgnaud V, Delaporte E, et al. Full-length genome characterization of a novel simian immunodeficiency virus lineage (SIVolc) from olive Colobus (*Procolobus verus*) and new SIVwrcPbb strains from Western Red Colobus (*Piliocolobus badius badius*) from the Tai Forest in Ivory Coast. *J Virol*. 2009;83(1):428-39.
16. Locatelli S, Lafay B, Liegeois F, Ting N, Delaporte E, Peeters M. Full molecular characterization of a simian immunodeficiency virus, SIVwrcpbt from Temminck's red colobus (*Piliocolobus badius temminckii*) from Abuko Nature Reserve, The Gambia. *Virology*. 2008;376(1):90-100.
17. Kalish ML, Wolfe ND, Ndongmo CB, McNicholl J, Robbins KE, Aidoo M, et al. Central African hunters exposed to simian immunodeficiency virus. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(12):1928-30.
18. Wolfe ND, Switzer WM, Carr JK, Bhullar VB, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet*. 2004;363(9413):932-7.
19. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397(6718):436-41.
20. Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, et al. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature*. 1992;358(6386):495-9.
21. Santos AF, Soares MA. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses*. 2010;2(2):503-31.

22. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *The Indian journal of medical research*. 2005;121(4):287-314.
23. Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007. xvii, 644 p., 16 p. of plates p.
24. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell*. 1998;93(5):681-4.
25. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, et al. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO journal*. 2007;26(12):3025-37.
26. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
27. Avila-Rios S. Evolución del virus de inmunodeficiencia humana: Polimorfismos en el gen pol y presión selectiva por antígeno leucocitario humano y terapia antirretroviral en población mexicana. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
28. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature medicine*. 2002;8(7):673-80.
29. Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(2):97-107.
30. Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends in microbiology*. 2004;12(7):310-6.
31. Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman HE. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol*. 1988;62(8):2578-86.
32. Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M. Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell*. 2007;131(1):70-9.
33. Ternois F, Sticht J, Duquerroy S, Krausslich HG, Rey FA. The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(8):678-82.

34. Tang C, Loeliger E, Kinde I, Kyere S, Mayo K, Barklis E, et al. Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *Journal of molecular biology*. 2003;327(5):1013-20.
35. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature reviews Microbiology*. 2015;13(8):484-96.
36. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol*. 1995;69(8):5087-94.
37. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):123-6.
38. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):117-22.
39. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387(6629):183-8.
40. Charpentier C, Nora T, Tenailon O, Clavel F, Hance AJ. Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasispecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients. *J Virol*. 2006;80(5):2472-82.
41. Jung A, Maier R, Vartanian JP, Bocharov G, Jung V, Fischer U, et al. Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*. 2002;418(6894):144.
42. Fernandez G, Clotet B, Martinez MA. Fitness landscape of human immunodeficiency virus type 1 protease quasispecies. *J Virol*. 2007;81(5):2485-96.
43. Domingo E, Sabo D, Taniguchi T, Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell*. 1978;13(4):735-44.
44. Domingo E, Martin V, Perales C, Grande-Perez A, Garcia-Arriaza J, Arias A. Viruses as quasispecies: biological implications. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;299:51-82.

45. Eigen M, Schuster P. The Hypercycle: A principle of natural self-organization. Part C: The realistic hypercycle. *Naturwissenschaften*. 1978;65:341-69.
46. Altman JD, Feinberg MB. HIV escape: there and back again. *Nature medicine*. 2004;10(3):229-30.
47. Avila-Rios S, Ormsby CE, Carlson JM, Valenzuela-Ponce H, Blanco-Heredia J, Garrido-Rodriguez D, et al. Unique features of HLA-mediated HIV evolution in a Mexican cohort: a comparative study. *Retrovirology*. 2009;6:72.
48. Allen TM, Altfeld M, Geer SC, Kalife ET, Moore C, O'Sullivan K M, et al. Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J Virol*. 2005;79(21):13239-49.
49. Blankson JN, Bailey JR, Siliciano RF. Crosscurrents in HIV-1 evolution. *Nature immunology*. 2006;7(2):121-2.
50. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature medicine*. 1997;3(2):205-11.
51. Goulder PJ, Watkins DI. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(8):630-40.
52. Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, et al. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(5):1890-5.
53. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. *The HLA factsbook*. San Diego, Calif. ; London: Academic; 2000.
54. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunology today*. 1993;14(7):349-52.
55. Herberg JA, Beck S, Trowsdale J. TAPASIN, DAXX, RGL2, HKE2 and four new genes (BING 1, 3 to 5) form a dense cluster at the centromeric end of the MHC. *Journal of molecular biology*. 1998;277(4):839-57.

56. Beck S, Trowsdale J. Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunological reviews*. 1999;167:201-10.
57. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Inoko H. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunological reviews*. 1999;167:193-9.
58. Friedrich TC, Dodds EJ, Yant LJ, Vojnov L, Rudersdorf R, Cullen C, et al. Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses in vivo. *Nature medicine*. 2004;10(3):275-81.
59. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nature medicine*. 2004;10(3):282-9.
60. Peyerl FW, Bazick HS, Newberg MH, Barouch DH, Sodroski J, Letvin NL. Fitness costs limit viral escape from cytotoxic T lymphocytes at a structurally constrained epitope. *J Virol*. 2004;78(24):13901-10.
61. Nora T, Charpentier C, Tenailon O, Hoede C, Clavel F, Hance AJ. Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J Virol*. 2007;81(14):7620-8.
62. Iversen AK, Stewart-Jones G, Learn GH, Christie N, Sylvester-Hviid C, Armitage AE, et al. Conflicting selective forces affect T cell receptor contacts in an immunodominant human immunodeficiency virus epitope. *Nature immunology*. 2006;7(2):179-89.
63. Yusim K, Kesmir C, Gaschen B, Addo MM, Altfeld M, Brunak S, et al. Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation. *J Virol*. 2002;76(17):8757-68.
64. Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science*. 2002;296(5572):1439-43.
65. Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, Streeck H, Lichterfeld M, Johnston MN, et al. HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. *PLoS medicine*. 2006;3(10):e403.

66. Frahm N, Kiepiela P, Adams S, Linde CH, Hewitt HS, Sango K, et al. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nature immunology*. 2006;7(2):173-8.
67. Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*. 2002;296(5577):2354-60.
68. Warren EH, Zhang XC, Li S, Fan W, Storer BE, Chien JW, et al. Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood*. 2012;120(14):2796-806.
69. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D423-31.
70. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, et al. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol*. 2001;75(24):11983-91.
71. Trachtenberg E, Korber B, Sollars C, Kepler TB, Hraber PT, Hayes E, et al. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nature medicine*. 2003;9(7):928-35.
72. Gog JR, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Grenfell BT. Population dynamics of rapid fixation in cytotoxic T lymphocyte escape mutants of influenza A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(19):11143-7.
73. Bhattacharya T, Daniels M, Heckerman D, Foley B, Frahm N, Kadie C, et al. Founder effects in the assessment of HIV polymorphisms and HLA allele associations. *Science*. 2007;315(5818):1583-6.
74. Brumme ZL, Brumme CJ, Heckerman D, Korber BT, Daniels M, Carlson J, et al. Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1. *PLoS pathogens*. 2007;3(7):e94.
75. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. *Topics in HIV*

medicine : a publication of the International AIDS Society, USA. 2006;14(3):125-30.

76. Wensing AM, Calvez V, Gunthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*. 2015;23(4):132-41.

77. Antunes DA, Rigo MM, Sinigaglia M, de Medeiros RM, Junqueira DM, Almeida SE, et al. New insights into the in silico prediction of HIV protease resistance to nelfinavir. *PloS one*. 2014;9(1):e87520.

78. Cane P, Chrystie I, Dunn D, Evans B, Geretti AM, Green H, et al. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom: multicentre observational study. *Bmj*. 2005;331(7529):1368.

79. Weinstock H, Respress R, Heneine W, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Luo CC, et al. Prevalence of mutations associated with reduced antiretroviral drug susceptibility among human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in the United States, 1993-1998. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(1):330-3.

80. Mason RD, Bowmer MI, Howley CM, Gallant M, Myers JC, Grant MD. Antiretroviral drug resistance mutations sustain or enhance CTL recognition of common HIV-1 Pol epitopes. *Journal of immunology*. 2004;172(11):7212-9.

81. Mason RD, Grant MD. A therapy-related point mutation changes the HLA restriction of an HIV-1 Pol epitope from A2 to B57 and enhances its recognition. *Aids*. 2005;19(9):981-4.

82. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Garrido-Rodriguez D, Ormsby CE, Hernandez-Juan R, Andrade-Villanueva J, et al. National prevalence and trends of HIV transmitted drug resistance in Mexico. *PloS one*. 2011;6(11):e27812.

83. Avila-Rios S, Reyes-Teran G, Espinosa E. Cornering HIV: taking advantage of interactions between selective pressures. *Medical hypotheses*. 2007;69(2):422-31.

84. Ensoli B, Cafaro A, Monini P, Marcotullio S, Ensoli F. Challenges in HIV Vaccine Research for Treatment and Prevention. *Frontiers in immunology*. 2014;5(417):1-11.

85. Mothe B, Hu X, Llano A, Rosati M, Olvera A, Kulkarni V, et al. A human immune data-informed vaccine concept elicits strong and broad T-cell specificities associated with HIV-1 control in mice and macaques. *Journal of translational medicine*. 2015;13:60.
86. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced immunodeficiency virus infection.pdf>. *The New England Journal of Medicine*. 1998;338(13):853-60.
87. Detels R, Muñoz A, McFarlane G, Kingsley LA, Margolick JB, Giorgi J, et al. Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. *The Journal of the American Medical Association*. 1998;280(17):1497-503.
88. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature medicine*. 1999;5(5):512-7.
89. Archin NM, Margolis DM. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir. *Current opinion in infectious diseases*. 2014;27(1):29-35.
90. Llano A, Frahm N, Brander C. How to optimally define optimal Cytotoxic T Lymphocyte epitopes in HIV infection? *HIV Molecular Immunology*. 2009:3-24.
91. Nixon DF, Douek D, Kuebler PJ, Jin X, Vesanen M, Bonhoeffer S, et al. Molecular tracking of an Human Immunodeficiency Virus nef specific cytotoxic T-cell clone shows persistence of clone-specific T-cell receptor DNA but not mRNA following early combination antiretroviral therapy. *Immunology letters*. 1999;66(1-3):219-28.
92. Brumme ZL, Li C, Miura T, Sela J, Rosato PC, Brumme CJ, et al. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding reverse transcriptase-integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2011;56(2):100-8.
93. LANL. Los Alamos HIV Immunology Database [September, 2015]. Available from:

http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/M_GROUP/M_group_explanation.

94. LANL. Los Alamos HIV Immunology Database [August, 2015]. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/Pol.html>.
95. John M, Moore CB, James I, Mallal SA. Interactive selective pressures of HLA-restricted immune responses and antiretroviral drugs on HIV-1. *Antiviral Therapy*. 2005;10(4):551-55.
96. Frahm N, Korber BT, Adams CM, Szinger JJ, Draenert R, Addo MM, et al. Consistent Cytotoxic-T-Lymphocyte Targeting of Immunodominant Regions in Human Immunodeficiency Virus across Multiple Ethnicities. *Journal of Virology*. 2004;78(5):2187-200.
97. Ji H, Liang B, Knox C, Eisner R, Petkay A, Enns E, et al., editors. Development of a data processing portal in support of tagged pooled pyrosequencing-based HIV drug resistance analysis. 22nd Annual Canadian Conference on HIV/AIDS Research 2013; Vancouver, Canada: *Can J Infect Dis Med Microbiol*.
98. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PloS one*. 2009;4(3):e4724.
99. Stanford University. HIV Drug Resistance Database [September, 2015]. Available from: <http://hivdb.stanford.edu>.
100. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.
101. Listgarten J, Brumme Z, Kadie C, Xiaojiang G, Walker B, Carrington M, et al. Statistical resolution of ambiguous HLA typing data. *PLoS computational biology*. 2008;4(2):e1000016.
102. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(16):9440-5.
103. Mueller SM, Schaetz B, Eismann K, Bergmann S, Bauerle M, Schmitt-Haendle M, et al. Dual selection pressure by drugs and HLA class I-restricted

immune responses on human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Virol.* 2007;81(6):2887-98.

104. Harrer T, Plettenberg A, Arasteh K, Van Lunzen J, Fatkenheuer G, Jaeger H, et al. Safety and immunogenicity of an adjuvanted protein therapeutic HIV-1 vaccine in subjects with HIV-1 infection: a randomised placebo-controlled study. *Vaccine.* 2014;32(22):2657-65.

105. Carlson JM, Listgarten J, Pfeifer N, Tan V, Kadie C, Walker BD, et al. Widespread impact of HLA restriction on immune control and escape pathways of HIV-1. *J Virol.* 2012;86(9):5230-43.

106. Frahm N, Yusim K, Suscovich TJ, Adams S, Sidney J, Hraber P, et al. Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes. *European journal of immunology.* 2007;37(9):2419-33.

107. Rao X, Hoof I, Costa AI, van Baarle D, Kesmir C. HLA class I allele promiscuity revisited. *Immunogenetics.* 2011;63(11):691-701.

108. Klenerman P, Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature.* 1998;394(6692):482-5.

109. Weiskopf D, Sette A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. *Frontiers in immunology.* 2014;5:93.

110. Chakradhar S. Updated, augmented vaccines compete with original antigenic sin. *Nature medicine.* 2015;21(6):540-1.

111. Hoof I, Perez CL, Buggert M, Gustafsson RK, Nielsen M, Lund O, et al. Interdisciplinary analysis of HIV-specific CD8+ T cell responses against variant epitopes reveals restricted TCR promiscuity. *Journal of immunology.* 2010;184(9):5383-91.

112. Yachi PP, Ampudia J, Zal T, Gascoigne NR. Altered peptide ligands induce delayed CD8-T cell receptor interaction--a role for CD8 in distinguishing antigen quality. *Immunity.* 2006;25(2):203-11.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Lista completa de péptidos

Tabla A1. Lista de péptidos, Sets “a” y “b” y posiciones de mutaciones DR.

Peptidos	Sets	Posición de la mutación DR
ALVEICTEM	Pol (a)	RT M41L
LVEICTEME	Pol (a)	RT M41L
VEICTEMEK	Pol (a)	RT M41L
EICTEMEKE	Pol (a)	RT M41L
ICTEMEKEG	Pol (a)	RT M41L
CTEMEKEGK	Pol (a)	RT M41L
TEMEKEGKI	Pol (a)	RT M41L
EMEKEGKIS	Pol (a)	RT M41L
MEKEGKISK	Pol (a)	RT M41L
PVFAIKKKD	Pol (a)	RT D67N
VFAIKKKDS	Pol (a)	RT D67N
FAIKKKDST	Pol (a)	RT D67N
AIKKKDSTK	Pol (a)	RT D67N
IKKKDSTKW	Pol (a)	RT D67N
KKKDSTKWR	Pol (a)	RT D67N
KKDSTKWRK	Pol (a)	RT D67N
KDSTKWRKL	Pol (a)	RT D67N
DSTKWRKLV	Pol (a)	RT D67N
QHLLRWGLT	Pol (a)	RT T215Y
HLLRWGLTT	Pol (a)	RT T215Y
LLRWGLTTP	Pol (a)	RT T215Y
LRWGLTTPD	Pol (a)	RT T215Y
RWGLTTPDK	Pol (a)	RT T215Y
WGLTTPDKK	Pol (a)	RT T215Y
GLTTPDKKH	Pol (a)	RT T215Y
LTPDKKHQ	Pol (a)	RT T215Y
TTPDKKHQK	Pol (a)	RT T215Y
HKAIGTVLV	Pol (a)	PR V77I
KAIGTVLVG	Pol (a)	PR V77I
AIGTVLVGP	Pol (a)	PR V77I
IGTVLVGPT	Pol (a)	PR V77I
GTVLVGPTP	Pol (a)	PR V77I
TVLVGPTPV	Pol (a)	PR V77I
VLVGPTPVN	Pol (a)	PR V77I
LVGPTPVNI	Pol (a)	PR V77I

VGPTPVNII	Pol (a)	PR V77I
VNIIGRNLL	Pol (a)	PR L90M
NIIGRNLLT	Pol (a)	PR L90M
IIGRNLLTQ	Pol (a)	PR L90M
IGRNLLTQI	Pol (a)	PR L90M
GRNLLTQIG	Pol (a)	PR L90M
RNLLTQIGC	Pol (a)	PR L90M
NLLTQIGCT	Pol (a)	PR L90M
LLTQIGCTL	Pol (a)	PR L90M
LTQIGCTLN	Pol (a)	PR L90M
ALVEICTEL	Pol (a)	RT M41L
LVEICTELE	Pol (a)	RT M41L
VEICTELEK	Pol (a)	RT M41L
EICTELEKE	Pol (a)	RT M41L
ICTELEKEG	Pol (a)	RT M41L
CTELEKEGK	Pol (a)	RT M41L
TELEKEGKI	Pol (a)	RT M41L
ELEKEGKIS	Pol (a)	RT M41L
LEKEGKISK	Pol (a)	RT M41L
PVFAIKKKN	Pol (a)	RT D67N
VFAIKKKNS	Pol (a)	RT D67N
FAIKKKNST	Pol (a)	RT D67N
AIKKKNSTK	Pol (a)	RT D67N
IKKKNSTKW	Pol (a)	RT D67N
KKKNSTKWR	Pol (a)	RT D67N
KKNSTKWRK	Pol (a)	RT D67N
KNSTKWRKL	Pol (a)	RT D67N
NSTKWRKLV	Pol (a)	RT D67N
QHLLRWGLY	Pol (a)	RT T215Y
HLLRWGLYT	Pol (a)	RT T215Y
LLRWGLYTP	Pol (a)	RT T215Y
LRWGLYTPD	Pol (a)	RT T215Y
RWGLYTPDK	Pol (a)	RT T215Y
WGLYTPDKK	Pol (a)	RT T215Y
GLYTPDKKH	Pol (a)	RT T215Y
LYTPDKKHQ	Pol (a)	RT T215Y
YTPDKKHQK	Pol (a)	RT T215Y
HKAIGTVLI	Pol (a)	PR V77I
KAIGTVLIG	Pol (a)	PR V77I
AIGTVLIGP	Pol (a)	PR V77I
IGTVLIGPT	Pol (a)	PR V77I
GTVLIGPTP	Pol (a)	PR V77I

TVLIGPTPV	Pol (a)	PR V77I					
VLIGPTPVN	Pol (a)	PR V77I					
LIGPTPVNI	Pol (a)	PR V77I					
IGPTPVNII	Pol (a)	PR V77I					
VNIIGRNLM	Pol (a)	PR L90M					
NIIGRNLMT	Pol (a)	PR L90M					
IIGRNLMTQ	Pol (a)	PR L90M					
IGRNLMTQI	Pol (a)	PR L90M					
GRNLMTQIG	Pol (a)	PR L90M					
RNLMTQIGC	Pol (a)	PR L90M					
NLMTQIGCT	Pol (a)	PR L90M					
LMTQIGCTL	Pol (a)	PR L90M					
MTQIGCTLN	Pol (a)	PR L90M					
ITLWQRPLV	Pol (b)	PR L10I					
ITLWQRPIV	Pol (b)	PR L10I					
TLWQRPLVTIR	Pol (b)	PR L10I					
TLWQRPIVTIR	Pol (b)	PR L10I					
VTIKIGGQLK	Pol (b)	PR K20M					
VTIKIGGQLM	Pol (b)	PR K20M					
DTVLEEMNL	Pol (b)	PR D30N	PR V32I	PR L33I	PR M36I		
NTVLEEMNL	Pol (b)	PR D30N	PR V32I	PR L33I	PR M36I		
DTLEEMNL	Pol (b)	PR D30N	PR V32I	PR L33I	PR M36I		
DTVIEEMNL	Pol (b)	PR D30N	PR V32I	PR L33I	PR M36I		
DTLEEINL	Pol (b)	PR D30N	PR V32I	PR L33I	PR M36I		
DTIFEEINL	Pol (b)	PR D30N	PR V32I	PR L33I	PR M36I		
DTIFEEMNL	Pol (b)	PR D30N	PR V32I	PR L33I	PR M36I		
NTVLEEINL	Pol (b)	PR D30N	PR V32I	PR L33I	PR M36I		
EEMNLPGRW	Pol (b)	PR M36I					
EEINLPGRW	Pol (b)	PR M36I					
KMIGGIGGFI	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KIIGGIGGFI	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KMIVGIGGFI	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KMIGGVGGFI	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KMIGGLGGFI	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KIIGGIGGFV	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KMIVGIGGFV	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KIVGVGGFLV	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KIVGVGGFL	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
KIIVGLGGFL	Pol (b)	PR M46I	PR I47V	PR G48V	PR I50V	PR F53L	PR I54V
LVGPTPVNI	Pol (b)	PR V77I	PR V82A	PR I84V			
LVGPTPANI	Pol (b)	PR V77I	PR V82A	PR I84V			
LVGPTPVNV	Pol (b)	PR V77I	PR V82A	PR I84V			

LIGPTP AN V	Pol (b)	PR V77I	PR V82A	PR I84V		
L V GP T P A N V	Pol (b)	PR V77I	PR V82A	PR I84V		
AL V EIC T E M	Pol (b)	RT M41L				
AL V EIC T E L	Pol (b)	RT M41L				
AL V EIC T E M E K	Pol (b)	RT M41L				
AL V EIC T E L E K	Pol (b)	RT M41L				
E K E G K I S K I	Pol (b)	RT E44D				
E K D G K I S K I	Pol (b)	RT E44D				
N T P V F A I K K	Pol (b)	RT A62V	RT K65R			
N T P V F V I K K	Pol (b)	RT A62V	RT K65R			
N T P V F A I K R	Pol (b)	RT A62V	RT K65R			
N T P V F V I K R	Pol (b)	RT A62V	RT K65R			
K L V D F R E L N K	Pol (b)	RT L74V	RT V75I	RT F77L		
K V V D F R E L N K	Pol (b)	RT L74V	RT V75I	RT F77L		
K L I D F R E L N K	Pol (b)	RT L74V	RT V75I	RT F77L		
K L V D L R E L N K	Pol (b)	RT L74V	RT V75I	RT F77L		
K L I D L R E L N K	Pol (b)	RT L74V	RT V75I	RT F77L		
G I P H P A G L K	Pol (b)	RT L100I				
G I P H P A G I K	Pol (b)	RT L100I				
A G L K K K S V T V L D V G D	Pol (b)	RT L100I	RT K103N	RT V106M	RT V108I	
A G I K K K S V T V L D V G D	Pol (b)	RT L100I	RT K103N	RT V106M	RT V108I	
A G L K K N K S V T V L D V G D	Pol (b)	RT L100I	RT K103N	RT V106M	RT V108I	
A G L K K K S M T V L D V G D	Pol (b)	RT L100I	RT K103N	RT V106M	RT V108I	
A G L K K K S V T I L D V G D	Pol (b)	RT L100I	RT K103N	RT V106M	RT V108I	
A G L K K N K S M T V L D V G D	Pol (b)	RT L100I	RT K103N	RT V106M	RT V108I	
A G I K K N K S M T I L D V G D	Pol (b)	RT L100I	RT K103N	RT V106M	RT V108I	
A G I K K K S A T V L D V G D	Pol (b)	RT L100I	RT K103N	RT V106M	RT V108I	
K K S V T V L D V G D A Y F S	Pol (b)	RT K103N	RT V106M	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y
N K S V T V L D V G D A Y F S	Pol (b)	RT K103N	RT V106M	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y
K K S M T V L D V G D A Y F S	Pol (b)	RT K103N	RT V106M	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y
K K S V T I L D V G D A Y F S	Pol (b)	RT K103N	RT V106M	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y
K K S V T V L D V G D A F F S	Pol (b)	RT K103N	RT V106M	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y
K K S V T V L D V G D A Y Y S	Pol (b)	RT K103N	RT V106M	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y
N K S M T I L D V G D A Y F S	Pol (b)	RT K103N	RT V106M	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y
N K S M T I L D V G D A F Y S	Pol (b)	RT K103N	RT V106M	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y
T V L D V G D A Y	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F			
T I L D V G D A Y	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F			
T V L D V G D A F	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F			
T I L D V G D A F	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F			
V L D V G D A Y F S V	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I	
I L D V G D A Y F S V	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I	
V L D V G D A F F S V	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I	

VLDVGDAYYSV	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
VLDVGDAYFSI	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
ILDVGDAYFSI	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
VLDVGDAYFSVPLDE	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
ILDVGDAYFSVPLDE	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
VLDVGDAYFSVPLDE	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
VLDVGDAYYSVPLDE	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
VLDVGDAYFSIPLDE	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
ILDVGDAYFSIPLDE	Pol (b)	RT V108I	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I
DAYFSVPL	Pol (b)	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I	
DAFFSVPL	Pol (b)	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I	
DAYYSVPL	Pol (b)	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I	
DAYFSIPL	Pol (b)	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I	
DAFYSIPL	Pol (b)	RT Y115F	RT F116Y	RT V118I	
SVPLDEFRK	Pol (b)	RT V118I			
SIPLDEFRK	Pol (b)	RT V118I			
VPLDEDFRKY	Pol (b)	RT V118I			
IPLDEDFRKY	Pol (b)	RT V118I			
QGWKGSPAI	Pol (b)	RT Q151M			
MGWKGSPAI	Pol (b)	RT Q151M			
KQNPDIIVY	Pol (b)	RT Y181C			
KQNPDIIVC	Pol (b)	RT Y181C			
NPDIVIQY	Pol (b)	RT Y181C			
NPDIVICQY	Pol (b)	RT Y181C			
NPDIVIQYM	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V		
NPDIVICQM	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V		
NPDIVIQYV	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V		
NPDIVICQYV	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V		
VIQYMDDL	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V		
VICQYMDDL	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V		
VIQYVDDL	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V		
VICQYVDDL	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V		
YQYMDDLIV	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V	RT Y188L	
CQYMDDLIV	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V	RT Y188L	
YQYVDDLIV	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V	RT Y188L	
YQYMDDLIV	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V	RT Y188L	
IQYMDDLIV	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V	RT Y188L	
IQYVDDLIV	Pol (b)	RT Y181C	RT M184V	RT Y188L	
KIEELRQHLL	Pol (b)	RT L210W			
KIEELRQHLLW	Pol (b)	RT L210W			
IEELRQHLL	Pol (b)	RT L210W			
IEELRQHLLW	Pol (b)	RT L210W			

EELRQHLLRW	Pol (b)	RT L210W		
EELRQHLLRW	Pol (b)	RT L210W		
LLRWGLTTPDKK	Pol (b)	RT L210W	RT T215Y	RT K219Q
LWRWGLTTPDKK	Pol (b)	RT L210W	RT T215Y	RT K219Q
LLRWGLYTPDKK	Pol (b)	RT L210W	RT T215Y	RT K219Q
LLRWGLTTPDQK	Pol (b)	RT L210W	RT T215Y	RT K219Q
LWRWGLYTPDQK	Pol (b)	RT L210W	RT T215Y	RT K219Q
F'TTPDKKHQK	Pol (b)	RT T215Y	RT K219Q	
F'YTPDKKHQK	Pol (b)	RT T215Y	RT K219Q	
F'TTPDQKHQK	Pol (b)	RT T215Y	RT K219Q	
F'YTPDQKHQK	Pol (b)	RT T215Y	RT K219Q	
TTPDKKHQKE	Pol (b)	RT T215Y	RT K219Q	
YTPDKKHQKE	Pol (b)	RT T215Y	RT K219Q	
TTPDQKHQKE	Pol (b)	RT T215Y	RT K219Q	
YTPDQKHQKE	Pol (b)	RT T215Y	RT K219Q	

11.2 Anexo 2. Base de datos completa
<https://ndownloader.figshare.com/files/2632949>

11.3 Anexo 3. Artículo.

RESEARCH ARTICLE

Identification of Immunogenic Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes Containing Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Treatment-Naïve HIV-Infected Individuals

Juan Blanco-Heredia¹, Aarón Lecanda^{1,2}, Humberto Valenzuela-Ponce¹, Christian Brander^{3,4,5}, Santiago Ávila-Ríos^{1*}, Gustavo Reyes-Terán^{1*}

1 Centre for Infectious Diseases Research, National Institute of Respiratory Diseases, Mexico City, Mexico, **2** Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, Germany, **3** IrsiCaixa AIDS Research Institute-HIVACAT, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain, **4** Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA)-UAB, Barcelona, Spain, **5** University of Vic and Central Catalonia, Vic, Spain

* gustavo.reyesteran@gmail.com (GRT); santiago.avila@cieni.org.mx (SAR)



OPEN ACCESS

Citation: Blanco-Heredia J, Lecanda A, Valenzuela-Ponce H, Brander C, Ávila-Ríos S, Reyes-Terán G (2016) Identification of Immunogenic Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes Containing Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Treatment-Naïve HIV-Infected Individuals. PLoS ONE 11(1): e0147571. doi:10.1371/journal.pone.0147571

Editor: Jianming Tang, University of Alabama at Birmingham, UNITED STATES

Received: October 2, 2015

Accepted: January 5, 2016

Published: January 25, 2016

Copyright: © 2016 Blanco-Heredia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Next Generation Sequencing files are held at the BioSample NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample); accession numbers: 4276943 to 4276962.

Funding: This work was supported by grants by the Mexican Government (Comisión de Equidad y Género de las Legislaturas LX-LXI and Comisión de Igualdad de Género de la Legislatura LXII de la H. Cámara de Diputados de la República Mexicana),

Abstract

Background

Therapeutic HIV vaccines may prove helpful to intensify antiretroviral treatment (ART) efficacy and may be an integral part of future cure strategies.

Methods

We examined IFN-gamma ELISpot responses to a panel of 218 HIV clade B consensus-based HIV protease-reverse transcriptase peptides, designed to mimic previously described and predicted cytotoxic T lymphocyte epitopes overlapping drug resistance (DR) positions, that either included the consensus sequence or the DR variant sequence, in 49 ART-naïve HIV-infected individuals. Next generation sequencing was used to assess the presence of minority DR variants in circulating viral populations.

Results

Although a wide spectrum of differential magnitudes of response to DR vs. WT peptide pairs was observed, responses to DR peptides were frequent and strong in the study cohort. No difference between the median magnitudes of response to DR vs. WT peptides was observed. Interestingly, of the 22 peptides that were recognized by >15% of the participants, two-thirds (64%) corresponded to DR peptides. When analysing responses per peptide pair per individual, responses to only WT (median 4 pairs/individual) or DR (median 6 pairs/individual) were more common than responses to both WT and DR (median 2 pairs/individual; $p < 0.001$). While the presence of ELISpot responses to WT peptides was frequently associated with the presence of the corresponding peptide sequence in the patient's virus (mean 68% of cases), responses to DR peptides were generally not associated with the presence of DR mutations in the viral population, even at low frequencies (mean 1.4% of cases; $p = 0.0002$).

CONACYT (SALUD-2013-01-202475). JBH received a scholarship by the National Council of Science and Technology (CONACYT; Scholarship No. 229424) and the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions

Our data suggests that DR peptides are frequently immunogenic and raises the potential benefit of broadening the antigens included in a therapeutic vaccine approach to immunogenic epitopes containing common DR sequences. Further studies are needed to assess the quality of responses elicited by DR peptides.

Introduction

The development of therapeutic human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) vaccines has gained interest in recent years as an aid for treating individuals already infected with HIV-1 as part of HIV-1 cure strategies [1, 2]. Although antiretroviral treatment (ART) can effectively control HIV-1 replication extending the lifespan of HIV-1-infected individuals to levels close to those observed in the general population [3, 4], the therapeutic regimen must be maintained for lifetime, with treatment interruption resulting in immediate viral rebound. In addition, ART alone cannot eliminate HIV-1 infection due to the virus' ability to persist in individuals through the formation and maintenance of viral latent reservoirs and residual viral replication [5]. This represents a considerable challenge for the patient, implying the need of strict adherence and the possibility of development of long-term drug toxicity and HIV-1 drug resistance. It also challenges public health systems, with the economic and logistic burden of maintaining therapeutic regimens for extended period of times and the need for patient clinical and laboratory monitoring. Considering this scenario, the development of a therapeutic vaccine that could intensify ART efficacy by controlling residual replication or that could even substitute ART all together would be desirable. Moreover, therapeutic vaccination may also provide the means for effective combined HIV-1 cure strategies that are based on purging the latent viral reservoir with latency reversal agents and the removal of reactivated cells by CTL [6].

However, the extraordinary adaptability of HIV-1, associated with high mutation and recombination rates and remarkable replication capability, has complicated the development of effective vaccine candidates. Indeed, it has been well documented that HIV-1 can readily escape from HLA class I-restricted, virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by the selection of mutations that can prevent proper viral epitope processing, epitope binding to HLA molecules or recognition by specific T cell receptors [7]. Significant advances have been made towards the identification of viral epitopes which elicit strong CTL responses, are common in a significant proportion of the population and are less prone to variation or, if they mutate at all, lead to mutant viruses with significantly reduced viral replicative capacity [8].

We previously proposed the hypothesis that *in vivo* HIV-1 replication and escape from pharmacological and immune control could be limited by the concerted use of opposing selective pressures acting on the virus and that this concept could be used for the selection of putative immunogens for candidate vaccine design [9]. Specifically, we proposed a scenario in which drug resistant variants could be targeted by the host's virus-specific CTL response. In order to escape from the specific CTL response the virus would have to revert back to wild type, which in turn would be targeted by ART. Thus, in the presence of ART, the virus would be cornered between the immunologic and pharmacologic selective pressures. On the other hand, mutations could also exist that would allow the virus to escape both the CTL response and ART. However, their replication deficiency may reduce the advantage of this double escape for the virus considerably [10]. In the present work, we examined the immunogenicity of putative CTL epitopes within the Pol PR-RT region containing drug resistance mutations, as a proof of concept that the possibility of forcing the virus between opposing selective pressures could exist.

Materials and Methods

Ethics statement

The present study was evaluated and approved by the Ethics Committees of the National Institute of Respiratory Diseases in Mexico City and the IrsiCaixa AIDS Research Institute in Barcelona, Spain and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All the participants gave written informed consent before blood sample donation.

Study subjects

A total of 49 subtype B HIV-1-infected, ART-naïve individuals were enrolled in the present study at the IrsiCaixa AIDS Research Institute in Barcelona, Spain (24/49) and at the Centre for Research in Infectious Diseases (CIENI) of the National Institute of Respiratory Diseases in Mexico City (25/49). Blood samples donated by the participants were used to isolate and store plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Peptides

Two sets of peptides adding up a total of 218 were used to screen for HIV-specific T-cell responses. A set of 128 peptides (Set “b”) was designed based on HIV clade B consensus sequence [11] reproducing 33 optimally defined CTL epitopes in HIV protease (PR) and reverse transcriptase (RT), reported at the Los Alamos HIV Immunology Database [12], that include at least one drug resistance site. Individual peptides were synthesized containing either the wild type (WT) amino acid or the drug resistance (DR)-associated amino acid. When multiple DR sites were included in the same epitope, peptides with different combinations of WT and DR amino acids were synthesized (Fig 1A and 1B). A second set of 90 subtype B-based [11] peptides (Set “a”) was designed to study five DR sites on PR-RT which had been previously also associated with HLA selective pressure, but for which no optimal epitopes have been described [13]. For each of these 5 sites, sets of 9-mer peptides overlapping by 8 amino acids were synthesized including the DR site of interest in each one of the positions of the peptide (Fig 1A and 1C). In order to compare immunogenicity, peptides with and without DR mutations were arranged in 140 pairs. For Set “b”, a single WT peptide could have more than one DR peptide counterpart, adding up to 95 peptide pairs; for Set “a”, each of 45 WT peptides was paired with its corresponding DR peptide, adding up to 45 peptide pairs. A complete list of the peptides evaluated can be consulted in [S1 Dataset](#). All peptides were synthesized at JPT Innovative Peptide Solutions (Berlin, Germany).

ELISpot Assays

PBMCs were isolated from whole blood by density gradient centrifugation (Lymphoprep Axis-Shield Oslo, Norway) within 6 hours of venipuncture and cryo-preserved until use. Frozen cells were thawed, and incubated in RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (both from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2 mM L-glutamine, 50 U of penicillin/ml, 50 µg of streptomycin/ml, and 10 mM HEPES (all from Mediatech, Herndon, VA) (R10). Thawed cells were rested at 37°C and 5% CO₂ for 4 hours prior to use in ELISpot assays. After resting, cells were counted and plated in 96-well polyvinylidene difluoride plates (Millipore, Bedford, MA), which had been precoated overnight with 0.5 µg/ml anti-gamma interferon (IFN-γ) monoclonal antibody 1-D1K (Mabtech, Stockholm, Sweden). Each peptide was added individually at a final concentration of 14 µg/ml as previously described [14]. A total of 100,000 cells per well were added in 140 µl of R10. For negative controls, cells were incubated in medium alone. Staphylococcal Enterotoxin B Fragment (150–161) (Sigma) was added at a

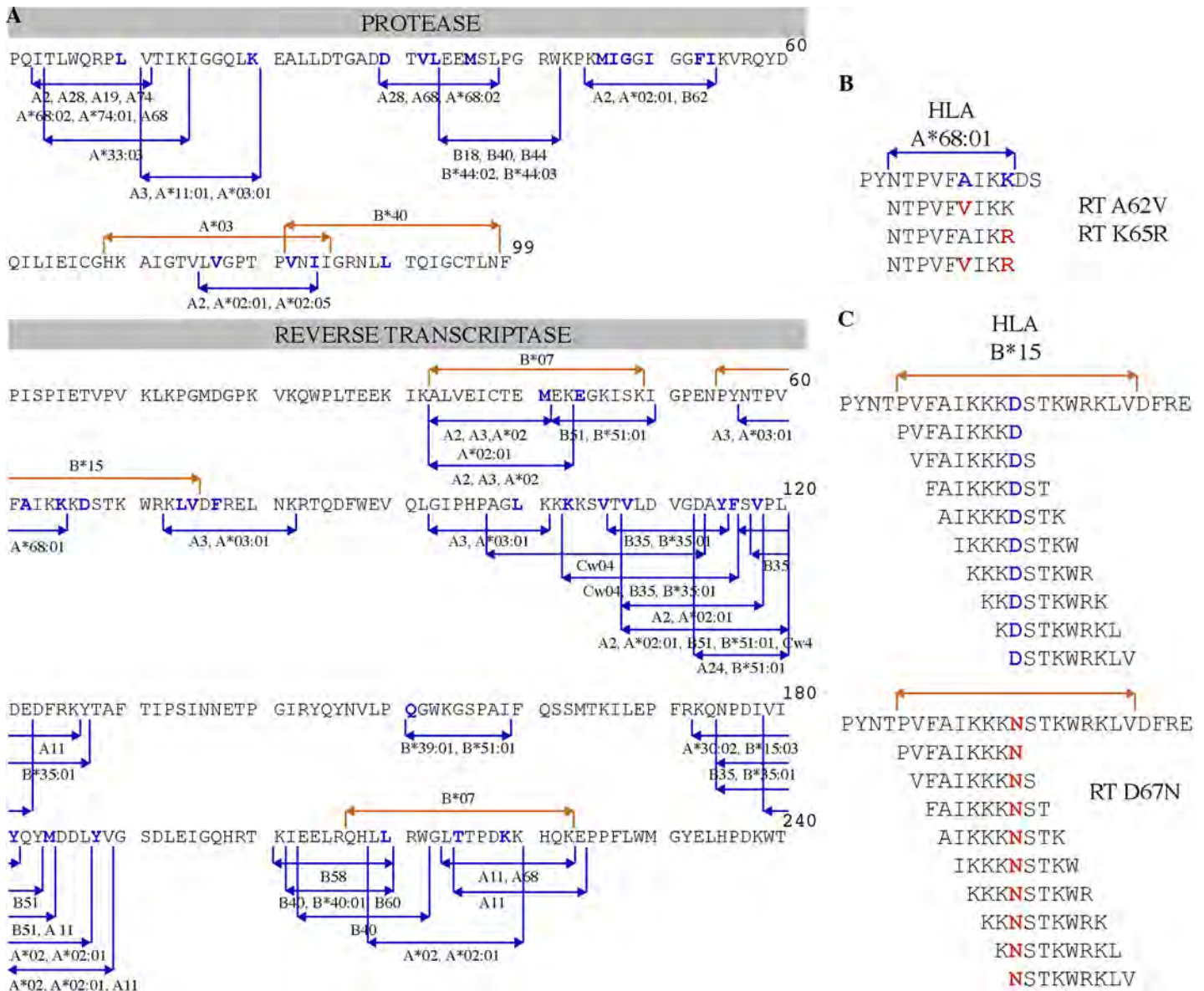


Fig 1. Peptide design for the evaluation of the “cornering hypothesis”. **A.** Pro and RT CTL epitope map used for peptide design. Peptides were designed based on previously-described optimal CTL epitopes (blue lines) and overlapping statistically-predicted HLA-associated positions (red lines) [13]. Specific changes in the WT sequence known to mediate ART resistance are indicated as blue residues. **B.** 128 peptides were designed using experimentally confirmed CTL epitopes that overlap positions associated with DR. Both the WT peptide and the DR variants were synthesized. In the example shown, two DR mutations are reflected in an HLA-A*68:01-restricted epitope and four peptides were design reflecting the different combinations of mutations. **C.** Ninety additional peptides were designed based on 5 regions containing HLA footprints and DR mutation sites reported in [13]. A representative example is shown for the set of peptides designed to test the effect of DR mutation D67N, which is also associated with an HLA-B*15 footprint. Both WT and DR peptides were synthesized and tested individually.

doi:10.1371/journal.pone.0147571.g001

concentration of 7 ng/ml to serve as a positive control in experiments carried out at CIENI and Phytohemagglutinin at a concentration of 10 µg/ml (1:10 dilution Mabtech) in experiments performed at IrsiCaixa. The cells were incubated overnight at 37°C with 5% CO₂. The plates were then washed six times with phosphate-buffered saline (without Ca or Mg; Mediatech), and 0.5 µg/ml biotinylated anti-IFN-γ monoclonal antibody 7-B6-1 (Mabtech) was added for 1 h at room temperature. The plates were again washed and incubated with a 1:2000 dilution of

streptavidin-coupled alkaline phosphatase (Mabtech) for 1 hour at room temperature in the dark. The plates were washed again, and IFN- γ production was detected as dark blue spots after a short incubation with nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Bio-Rad, Hercules, CA). The color reaction was stopped by washing the plates with tap water. Spots were counted using a C.T.L. Reader unit at IrsiCaixa and a Bioreader 5600 (Bio-Sys, Germany) at CIENI; the results were expressed as spot-forming cells (SFC) per million input cells.

Thresholds for positive responses were determined as at least five spots ($50 \text{ SFC}/10^6$ PBMCs) per well and as responses exceeding the mean of negative wells plus 3 standard deviations or three times the mean of negative control wells, whichever was higher.

HIV PR-RT PCR Amplification and deep sequencing

Viral RNA was extracted from 1 mL of plasma (QIAamp Viral RNA Kit; QIAGEN, Valencia, CA). A fragment of the viral *pol* gene including the whole protease (PR) and 334 codons of the reverse transcriptase (RT) was amplified by nested RT-PCR with primers PR_5'_OUTER 5'-CCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTG-3' (HXB2 positions 2009–2030) and RT_3'_OUTER 5'-GTTTTTCAGATTTTTTAAATGGCTCTTG-3' (3576–3602) for the first round of amplification, and PR_5'_INNER 5'-TGAAAAGATTGTAAGAGAGACAGG-3' (2057–2080) and RT_3'_INNER 5'-GGCTCTTGATAAATTTGATATGTCC-3' (3559–3583) for the second round of amplification. SuperScript III OneStep RT PCR (Invitrogen, Brown Deer, WI) and Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) were used for the first and second round PCR respectively, according to manufacturer's recommendations with the following conditions: 50°C for 30 min (first round only); 94°C for 3 min; 35 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 2 min and a final extension of 72°C for 5 min.

Semiconductor Next Generation Sequencing (NGS) was performed to test for DR variants within the viral populations of each participant. Briefly, PR-RT PCR products were enzymatically fragmented and used to build barcoded genetic libraries for each virus using the Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), according to manufacturer's instructions. Sequencing template was created by emulsion PCR using the Ion PGM Template OT2 200 Kit (Thermo Fisher Scientific) and sequencing was performed using the Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 (Thermo Fisher Scientific), on 316v2 chips using an Ion PGM instrument (Thermo Fisher Scientific). Data from the Ion PGM runs were processed initially using the Ion Torrent platform-specific pipeline software Torrent Suite v1.3.1 to generate sequence reads, trim adapter sequences, filter, and remove poor signal-profile reads. Further analysis consisted of a re-sequencing approach with iterative alignments, adapting the reference for each cycle, and forking reference sequences to account for quasispecies. This yielded a semiquantitative value of the proportion of quasispecies in each sample. Next generation sequencing files are held at the BioSample NCBI database, accession numbers: 4276943 to 4276962.

HIVDR analysis from NGS runs

The frequency of DR mutations within the viral population for each patient was assessed from NGS runs using HyDRA, an automated HIVDR analysis pipeline developed by the National Microbiology Laboratory of the Public Health Agency of Canada [15]. Briefly, a quality control filter was first applied to each NGS run, selecting reads with length >100 bases and average quality score >Q30. Reads were then mapped against the HXB2 reference sequence using SMALT (Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK), with k-mer size 11 and step size 1. Read mappings with overlap values (percentage of read included in mapping to reference) under 65% and identity values (percentage of read mapping which matched the reference)

under 75% were filtered out. Variants were called using a custom viral single nucleotide variant caller, based on a Poisson distribution. Variants were filtered out when quality <Q30, read depth <100 and allele count <5. Amino acid mutations were then called and queried against a merged DR mutation database including the WHO list of mutations for DR surveillance [16] and the Stanford HIVDR Database [17]. All DR mutations with frequency over 1% are reported. Nevertheless, a conservative threshold of 2% was used to define the presence of DR mutations given that the ability to detect minority variants depends on sequencing depth and on viral load. Using our sequencing protocol, a sequencing depth of 1500-2000x and viral load >2500 copies/mL would be needed in order to accurately call variants at 1% frequency.

Epitope and peptide variant frequency determination using deep sequencing runs

NGS reads were aligned, allowing one mismatch per read using the short read component of the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [18] against the HIV-1 HXB2 reference genome (NCBI accession number K03455.1). Reads with multiple mismatches were discarded. Using a customized R script, all reads containing bases with individual quality scores <Q20 were discarded and the rest were translated according to the standard genetic code and the frame of the gene to which they mapped. Read mappings were then compared against all peptide sequences included in the study. The frequency of read mappings with 100% identity to each peptide sequence assayed was calculated with the same R script and used for further analysis.

Human Leucocyte Antigen typing

DNA for typing was extracted using the QIAamp DNA Blood (QIAGEN, Valencia, CA) from 6 million PBMC, according to the manufacturer's instructions. For all samples, HLA class I typing was performed at high resolution by sequence-based typing, using commercial kits (SeCore A, B and Cw Locus Sequencing Kits, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Allele assignments were made with uTYPE v6.0 (Thermo Fisher Scientific). Ambiguities were resolved using the HLA Completion tool available on-line [19].

Statistical Analyses

We performed Mann-Whitney U tests (STATA/SE v12, StataCorp, College Station, TX) to look for associations between the presence/absence of all HLA class I alleles found in the cohort and positive ELISpot responses to each peptide assayed. These associations were corrected for multiple comparisons using false-discovery rate analysis (Storey q-value, q value package for R v2.12). Wilcoxon ranked tests were used to compare the magnitudes of ELISpot responses between WT and DR peptide pairs.

Results

Frequent and strong responses are observed to CTL epitopes containing drug resistance mutations

Considering that the immune recognition of DR variants might offer an opportunity to impose double selection pressure on HIV, we assessed the T cell response against CTL epitopes overlapping DR positions and regions with HLA class I footprints coinciding with DR positions [13] using peptides containing the WT or DR variant. The 218 peptides tested were arranged in 140 WT-DR pairs (95 corresponding to Set "b" and 45 to Set "a", as explained in Methods). When multiple DR mutations were present in the same peptide, each DR variant peptide synthesized was compared against the same WT peptide. We determined the frequency of

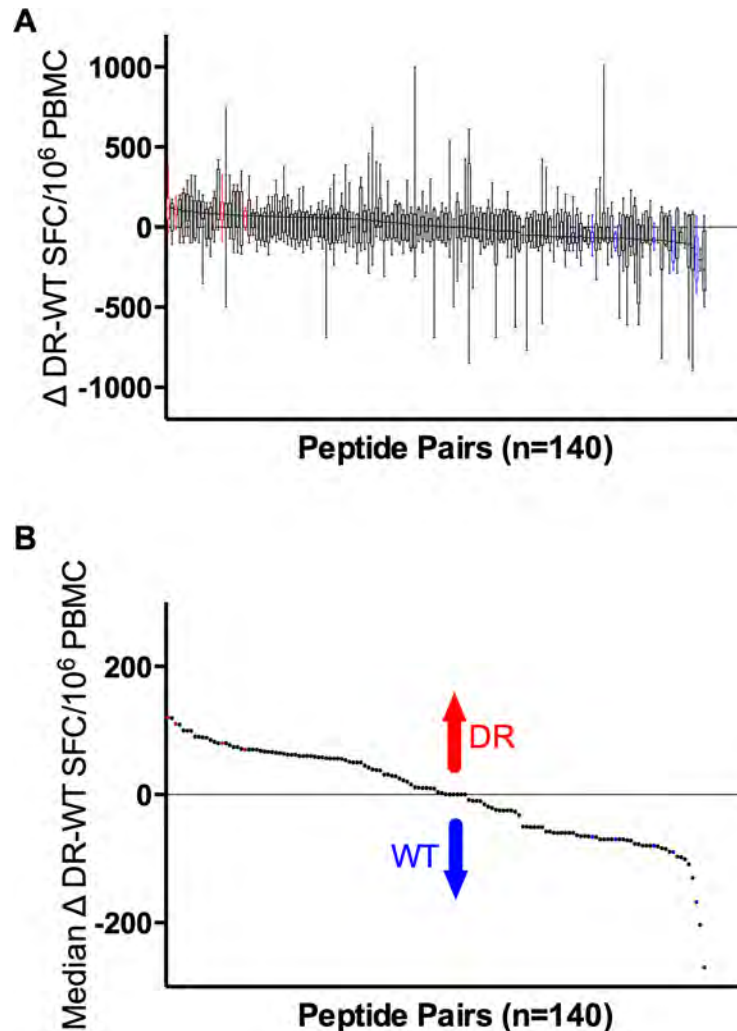


Fig 2. Wide spectrum of differential magnitudes of response to WT and DR peptide pairs. **A.** Differential magnitudes of response to each DR-WT peptide pair (Δ) are shown for each responder. Δ were calculated as the magnitude of response (SFC/million PBMC) to the DR sequence minus the magnitude of response to the WT sequence in each subject individually. A median differential magnitude of response was then calculated across all individuals responding to either the WT, the DR or both sequences. Boxes represent 50% of differential magnitude to each DR-WT peptide pair, whiskers maximum and minimum of the differential magnitude. **B.** Only median Δ responses are shown. Peptide pairs with significantly higher differential response to DR are shown in red; peptide pairs with significantly higher differential response to WT are shown in blue ($p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0147571.g002

recognition of DR and WT sequences and compared the magnitude of response for each DR-WT peptide pair ($n = 140$). Of all the 218 peptides tested, 217 (99.5%) were recognized by at least one of a total of 49 subjects tested. The median of patients recognizing each of the 218 peptides was 5 (range 0–15 patients, IQR 4–6). The median number of responses observed per individual was 16 (range 0–123, IQR 1–35). The total number of responses considering all the participants and peptides was 1,120. We observed a wide spectrum of differential magnitudes of response to DR vs. WT peptide pairs (Fig 2). This observation was maintained when dividing the peptide pairs into Set “a” and Set “b”, according to the peptide design rationale (see Methods; S1 Fig). From the 140 pairs analyzed, four (two belonging to Set “a” and two to Set “b”) elicited significantly stronger responses by the DR variant, while five (one belonging to Set

Table 1. Peptide pairs with significant median differential magnitude of response Δ DR-WT ^a.

WT peptide	Magnitude of response to WT peptide [Median (range); SFC/10 ⁶ PBMC]	DR peptide	Magnitude of response to DR peptide [Median (range); SFC/10 ⁶ PBMC]	Median Δ DR-WT response (SFC/10 ⁶ PBMC)	HIV Gene	DR mutation	p value
RNLLTQIGC	0 (0–140)	RNLMTQIGC	130 (51–450)	120	PR	L90M	0.0009
QHLLRWGLT	0 (0–62)	QHLLRWGLY	115 (60–200)	110	RT	T215Y	0.0005
DTVLEEMNL	29 (0–200)	DTVIEEMNL	130 (60–380)	80	PR	L33I	0.0020
KMIGGIGGFI	0 (0–163)	KMIGGVGGFI	80 (51–163)	70	PR	I50V	0.0039
EKEGKISKI	72 (56–190)	EKDGKISKI	0 (0–113)	-66	RT	E44D	0.0195
KKSVTVLDVGDAYFS	123 (51–930)	NKSVTVLDVGDAYFS	0 (0–890)	-70	RT	K103N	0.0078
EELRQHLLRW	80 (0–164)	EELRQHLRW	0 (0–60)	-80	RT	L210W	0.0007
KKSVTVLDVGDAYFS	123 (51–930)	KKSMTVLDVGDAYFS	0 (0–690)	-90	RT	V106M	0.0313
NLLTQIGCT	170 (0–484)	NLMTQIGCT	0 (0–238)	-168	PR	L90M	0.0005

^a Wilcoxon Signed Rank Test. Positions associated with drug resistance are shown in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0147571.t001

“a” and four to Set “b”) showed significantly stronger responses to the WT variant (Table 1; S1 Fig). The DR mutations included in the peptide pairs with stronger responses to the DR variant were L33I, I50V and L90M in the protease and T215Y in RT. These observations suggest that some DR variants are strongly immunogenic in a large number of individuals tested in the present cohort. Moreover, these observations suggest that peptide design rationale was not a significant factor influencing differential magnitudes of response to WT and DR peptides.

Indeed, as can be seen in Fig 3, a median of 4 peptide pairs per individual showed responses only to WT, a median of 2 peptide pairs per individual showed responses to both WT and DR variants while a median of 6 peptide pairs per individual showed responses only to the DR variant. These observations suggest that the presence of DR mutations can result either in the

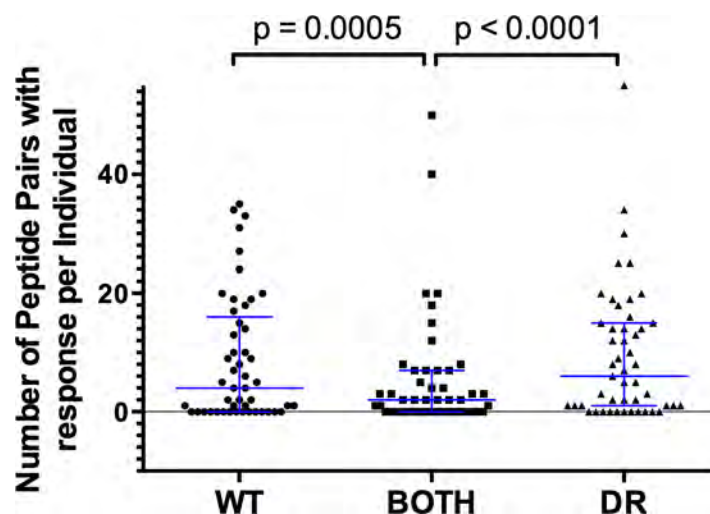


Fig 3. Recognition frequency of DR mutations. ELISpot responses to a panel of 140 DR-WT peptide pairs were assessed in 49 individuals. The number of peptide pairs for which, both WT and DR, only DR, or only WT peptides were recognized was assessed per individual. The scatter plot shows the result of three Wilcoxon tests comparing the paired data between groups, significant p values are indicated. Error bars show the median with interquartile range.

doi:10.1371/journal.pone.0147571.g003

creation of new CTL epitopes or in the loss of WT epitopes. The data also indicate that DR or WT-specific responses are more common than fully cross-reactive responses ($p < 0.0001$ and $p = 0.0005$ respectively, [Fig 3](#)), in line with the idea that many DR-mutations are effective CTL escape variants [[20](#), [21](#)]. Importantly, these observations were maintained in both peptide sets analysed separately ([S2 Fig](#)).

We then investigated if the existence of an HLA association for a specific DR site influenced responses to DR peptides, using peptide Set “b” only. Importantly, few positions in protease and RT, which are associated with DR have also shown association with HLA. The most complete list of associations in the largest cohort analysed so far, composed of ART-naïve HIV B clade-infected mainly Caucasian individuals from North America and Australia [[22](#)] included 8 HLA associations that coincide with DR mutations sites (3 in PR and 5 in RT; [S1 Dataset](#)). Considering peptide Set “b” (including 95 peptide pairs in total), 39 peptide pairs overlapped HLA-associated DR positions according to Carlson et al., while 56 peptide pairs overlapped DR positions without HLA association. Interestingly, responses to WT or DR peptides were significantly higher than responses to both WT and DR in only peptide pairs overlapping DR positions without HLA association ([S3 Fig](#)). Additionally, the distribution of differential magnitudes of responses to peptide pairs overlapping DR positions with and without HLA associations were similar, both groups including peptide pairs with significantly higher responses to WT or DR peptides ([S3 Fig](#)).

In order to distinguish real responses to specific peptide sequences from borderline cross-reactivities, the median magnitudes of response to WT and DR peptides were compared ([S1 Table](#)). No differences were observed in the median magnitudes of response to WT (median 95, IQR 80–105 SFC/ 10^6 PBMC) and DR (median 99, IQR 81–116 SFC/ 10^6 PBMC) peptides ($p = 0.2844$), suggesting that responses observed to DR peptides are not associated with borderline cross-reactivity and represent specific responses. Indeed, in the case of peptide Set “a”, responses to DR peptides were even significantly stronger than responses to WT peptides ($p = 0.0125$; [S1 Table](#)).

A high proportion of the most frequently recognized peptides in the study cohort include DR mutations

Across all responses, we identified 22 peptides (7 from Set “a” and 15 from Set “b”) that were recognized by more than 15% (more than 7 individuals) of the cohort. Fourteen (63%) of these frequently recognized peptides were sequences that reflected DR mutations (4 from Set “a” and 10 from Set “b”; [Table 2](#)). Remarkably, eight peptides were recognized by more than 20% (more than 9 individuals) of the cohort, and five of them (63%) included DR mutations ([Fig 4](#)). Within these eight cases, recognition of the three WT peptides was statistically higher than their DR counterparts and recognition of three of the five DR peptides was higher than their WT counterparts ([Fig 4](#)). Considering the top 5, 10 or 20 most frequently recognized peptides, the proportion of peptides reflecting DR mutations was 40%, 50% and 65% respectively. Taken together, these observations suggest that specific responses to DR peptides are highly frequent in the study cohort.

Of note, for only 3 of the 22 most frequently recognized peptides the previously experimentally confirmed restrictive HLA class I allele was indeed found to be overrepresented in the responder group compared to the individuals that did not mount a response ([Table 2](#)). In some cases, HLA alleles predicted to bind the peptide, but not experimentally confirmed to do so were identified as well. Interestingly, in some of these latter cases, the response was associated to HLA class I alleles frequently observed in populations with Amerindian ancestry (such as A*24, B*39, C*04), or with alleles with higher frequency in Caucasian populations compared to

Table 2. Most frequently recognized peptides.

Peptide ^a	Peptide Set ^b	WT or DR	DR position overlapped	HIV Protein	Individuals responding to peptide [n (%)]	Median magnitude of responses (range; SFC/10 ⁶ cells)	Potentially restricting HLA ^c
NLLTQIGCT	a	WT	L90M	PR	15 (31)	230 (60–484)	B*18
GRNLLTQIG	a	WT	L90M	PR	14 (29)	135 (56–290)	C*02
RNLMTQIGC	a	DR	L90M	PR	14 (29)	170 (51–450)	A*11, C*04
QHLLRWGLY	a	DR	T215Y	RT	12 (24)	115 (60–200)	C*02, C*15
EELRQHLLRW	b	WT	L210W	RT	12 (24)	90 (70–164)	B*39
KMIGGVGGFI	b	DR	I50V	PR	11 (22)	90 (51–162)	B*39
ITLWQRPIV	b	DR	L10I	PR	10 (20)	169 (56–450)	A*33, C*02, C*16
DTVIEEMNL	b	DR	L33I	PR	10 (20)	162 (60–380)	C*02
IGRNLLTQI	a	WT	L90M	PR	9 (18)	123 (70–260)	A*26, A*80, B*42, C*17
EKEGKISKI	b	WT	E44D	RT	9 (18)	87 (56–190)	A*02, A*80, B*38, B*47
YQYVDDLYV	b	DR	M184V	RT	9 (18)	322 (58–1150)	A*01, A*02 , B*47
LRWGLYTPD	a	DR	T215Y	RT	8 (16)	99 (58–163)	A*02, A*11
TVLIGTPV	a	DR	V77I	PR	8 (16)	120 (82–200)	A*33, A*74, A*80, B*45, C*16, C*02
DTIFEEMNL	b	DR	V32I, L33F	PR	8 (16)	94 (50–190)	A*33, A*74, A*80
LVGPTPANI	b	DR	V82A	PR	8 (16)	87 (50–130)	A*02 , A*80, B*39, B*42, B*47, C*17
NTPVFAIKR	b	DR	K65R	RT	8 (16)	98 (67–160)	A*80, B*42, C*14, C*17
KKS VTVLDVGD AYFS	b	WT	K103N, V106M, V108I, Y115F, F116Y	RT	8 (16)	223 (51–930)	A*24, A*26
NKS MTILDVGD AFYS	b	DR	K103N, V106M, V108I, Y115F, F116Y	RT	8 (16)	89 (52–119)	A*80, B*15, B*38, B*42, C*17
KQNPDI VIY	b	WT	Y181C	RT	8 (16)	195 (50–523)	A*24, A*26, A*74, A*80, B*42, B*47, C*02, C*17
KQNPDI VIC	b	DR	Y181C	RT	8 (16)	170 (60–532)	A*24, A*26, B*39, B*42, C*17
NPDI VI CQYM	b	DR	Y181C	RT	8 (16)	116 (60–200)	A*02, A*26, B*27
YQY M DDLYV	b	WT	M184V	RT	8 (16)	292 (80–1050)	A*02 , A*80, B*18

^a A list of the 22 most frequently recognized peptides in the study cohort is shown (>15% of individuals responding). Positions associated with DR are shown in bold.

^b According to peptide design rationale as explained in Methods.

^c HLA alleles significantly more frequent in individuals responding to the peptide are shown (p<0.01, q<0.2, Mann-Whitney test). HLA molecules that have previously been experimentally linked to the corresponding epitope are shown in bold (Los Alamos HIV Immunology Database). HLA molecules predicted to bind the corresponding epitope using the ELF tool (Los Alamos HIV Immunology Database) are shown in italics.

PR, protease; RT, reverse transcriptase; SFC, spot forming cells.

doi:10.1371/journal.pone.0147571.t002

Amerindian populations (A*11, B*42, C*17, C*02) [23]. Interestingly, responses to peptides overlapping statistically predicted HLA-associated DR sites [13] (7/22 most frequently recognized peptides, Table 2) generally did not match the anticipated HLA defining the association. These observations suggest a level of HLA promiscuity in the recognition of the peptides.

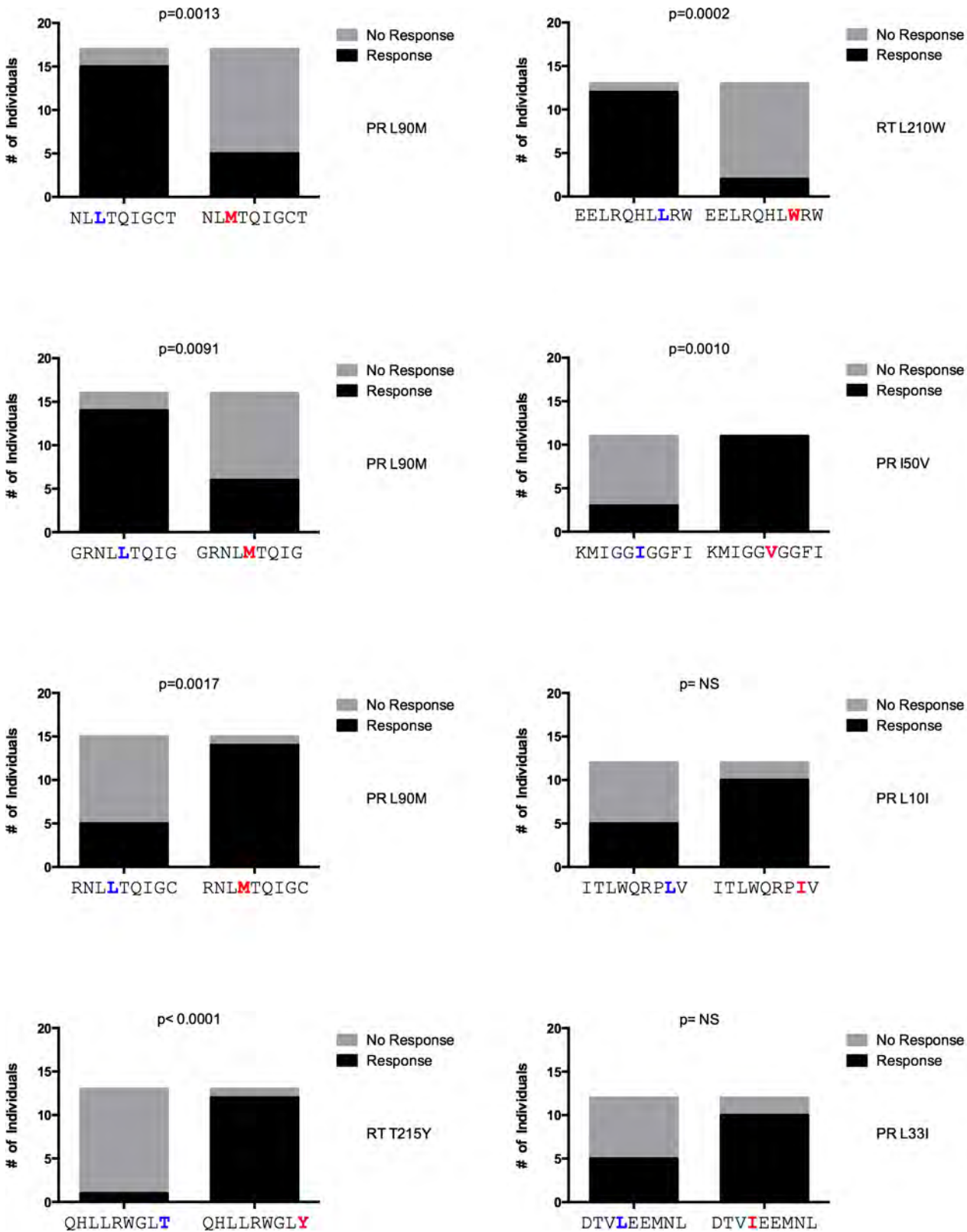


Fig 4. Most frequently recognized peptides in the study cohort. Peptides with IFN-gamma ELISpot responses in 20% or more individuals in the study cohort are shown with their DR or WT peptide pair. These 8 peptides were recognized by at least 10 individuals, giving us sufficient power to compare median magnitude of response between the WT and DR peptide. DR mutations are shown in red. WT amino acids in DR mutations sites are shown in blue. Statistically significant differences (Fisher's exact test) in recognition of the WT vs. DR peptide were observed for 6 out of the 8 peptide pairs.

doi:10.1371/journal.pone.0147571.g004

Response patterns to DR peptides are not associated with the presence of DR mutations in the circulating viral population

Due to the frequent recognition of peptides containing DR mutations in the study cohort, the presence of DR variants that could have stimulated these responses was investigated. As all subjects in the study were ART-naïve, the frequency of DR mutations was expected to be low [24]. We conducted a detailed deep sequencing analysis of the circulating virus population in individuals from CIENI for whom plasma samples were available. Sequences were obtained for 20 of 24 CIENI subjects with a median sequencing depth of 645 (IQR 315–982, after filtering reads by size and quality). Only reads with size >100 bases and mean quality >Q30 were considered. We then assessed whether the presence and frequency of individual DR mutations after alignment to the HXB2 consensus explained the detection of DR-sequence specific responses. DR variants and polymorphisms in DR positions were observed in 12 of the 20 participants assayed (S2 Table). Nevertheless, in no case did the presence of the DR variant correspond to the presence of ELISpot response to the DR variants. Interestingly, 4 cases of response to DR peptides overlapping the RT K103 position were observed in which the DR variant K103R, but not K103N was observed in the viral population, suggesting a possible cross-reactive effect (S2 Table). Taken together, these observations suggest that the presence of DR variants, even at low levels, does not explain the presence of ELISpot responses to peptides containing different DR mutations.

To further assess whether the presence of specific DR or WT sequences predicted the detection of specific responses we compared ELISpot response patterns and the existence of the corresponding epitope in the viral quasiespecies in each participant (Table 3). Interestingly, the mean proportion of responses to WT peptides that coincided with the presence of the corresponding epitope was 68% of cases, while the mean proportion of responses to DR peptides that coincided with the presence of the corresponding epitope was only 1.4% ($p = 0.0002$). Considering each individual case, the proportion of responses to WT peptides in the presence of the corresponding WT epitope in the patient virus was significantly higher than the proportion of responses to DR peptides in the presence of the corresponding DR epitope in 9 of 17 (53%) participants. In most of the remainder cases the number of responses was not sufficient to observe significant differences. Similar results were observed when separating the analysis for peptides belonging to Set “a” (S3 Table) and Set “b” (S4 Table). These observations suggest that, although a large proportion of responses to WT peptides can be explained by the presence of the epitope in the patient plasma virus, responses to DR variants in general do not coincide with the presence of the corresponding sequence in the circulating virus.

Discussion

We have explored the possibility of limiting HIV evolution *in vivo* by the concerted selective pressures exerted by the cellular immune response and ART on the virus' Pol region. By assessing responses to WT-DR peptide pairs overlapping positions where DR mutations occur on predicted or defined HLA class I-restricted epitopes, we observed that responses to peptides containing DR mutations were frequent and strong in a cohort of ART-naïve individuals. Indeed, peptides including DR mutations were among the most frequently recognized in the study cohort and their recognition was not explained by the presence of DR variants in the viral population, even when considering low frequency sequence variants. This analysis allowed the identification of candidate peptides that contain DR mutations and which could provide a benefit for patients under ART when used in a putative therapeutic vaccine, given that they could both reinforce viral suppression and prevent the development of drug resistance. These peptides could also be useful as immunogens in kick and kill strategies, where the

Table 3. Correlation between immunological response to specific peptides and presence of the corresponding epitope in the patient virus ^a.

Patient	Total number of peptides with response	Total number of WT peptides with response	Total number of DR peptides with response	Responses to WT peptide with presence of WT epitope [n (%)]	Responses to WT peptide w/o presence of WT epitope [n (%)]	Responses to DR peptide with presence of DR epitope [n (%)]	Responses to DR peptide w/o presence of DR epitope [n (%)]	p
M24	47	13	34	8 (62)	5 (38)	0	34 (100)	<0.0001
M25	41	17	24	11 (65)	6 (35)	1 (4)	23 (96)	<0.0001
M26	7	2	5	1 (50)	1 (50)	0	5 (100)	NS
M28	18	8	10	5 (63)	3 (38)	0	10 (100)	0.0065
M30	64	24	40	17 (71)	7 (29)	2 (5)	38 (95)	<0.0001
M31	35	14	21	9 (64)	5 (36)	1 (5)	20 (95)	0.0002
M32	34	19	15	4 (21)	15 (79)	0	15 (100)	NS
M35	9	1	8	1 (100)	0	0	8 (100)	NS
M36	5	1	4	1 (100)	0	0	4 (100)	NS
M37	44	25	19	19 (76)	6 (24)	0	19 (100)	<0.0001
M38	16	5	11	2 (40)	3 (60)	0	11 (100)	NS
M39	64	29	35	28 (97)	1 (3)	0	35 (100)	<0.0001
M40	24	5	19	5 (100)	0	0	19 (100)	<0.0001
M45	1	0	1	0	0	0	1 (100)	NS
M46	2	0	2	0	0	0	2 (100)	NS
M47	40	11	29	7 (64)	4 (36)	0	29 (100)	<0.0001
M48	2	1	1	1 (100)	0	0	1 (100)	NS
Mean	26.6	10.3	16.4	7 (68)	3.3 (32)	0.2 (1.4)	16.1 (96.6)	0.0002

^a The presence or absence of the complete WT or DR sequence corresponding to the assayed peptides was assessed by moving window analyses from NGS data for each patient as described in Methods. A threshold of 2% was used to determine the presence or absence of the WT or DR epitope (see [Methods](#)).

doi:10.1371/journal.pone.0147571.t003

virus is being reactivated after therapeutic vaccination, but still while the individual is under ART, although further experiments are warranted to confirm peptide immunogenicity in individuals under ART. It is important to note that few positions in PR and RT, which are associated with DR have also shown association with HLA [22]. An interesting point raised in the present study is that, although a direct HLA association with the DR position has not been identified in most cases, the presence of the DR variant is sufficient to promote ELISpot responses, and that these responses are frequently exclusive to the DR peptide or to the WT peptide only. Additionally, it could be argued that looking at DR positions in negative association with HLA would be relevant, as they would suggest specific recognition of the DR variant and conservation of the WT amino acid. However, among the 8 HLA-associations previously described for DR mutation sites in ART-naïve Caucasian individuals [22], only one was a negative association (PR A71 with B*57:01). Additionally, in an older study on a cohort of Australian individuals failing ART [13], 6 DR mutation sites in RT were reported to be associated with HLA, all positive associations. Only RT L210W overlaps between the two studies.

The study cohort was composed half by individuals of Mexican origin and half by individuals of Caucasian origin. Demographic and clinical characteristics of both cohorts were similar. Nevertheless, HLA frequency distributions differed between them (S1 Dataset), as expected when comparing individuals of Caucasian origin to individuals with Amerindian ancestry component [23]. Even considering these differences, magnitude of response, as well as response frequency did not vary between the two cohorts. Neither were specific peptides exclusively recognized by individuals in either one of the cohorts, allowing us to analyse the two

cohorts as one. Although the median number of peptides recognized per individual was 16, there were some patients for whom an unexpectedly high number of responses were observed: 71, 122 and 123 peptides recognized with HLA genotypes B*57/B*18, B*1503/B*44:03 and B*15:16/B*42:01 respectively. These responses were confirmed and backgrounds were comparable to those observed in other responders. These unusual responses coincided with the recognition of most peptide sets overlapping single regions of the gene. It is important to note that peptides were designed independently of the HLA repertoire of the participants of the study cohort. Considering the presence of the restrictive HLA of the optimally defined epitopes included in the participants, we would expect at least 47% (23) of patients responding to at least one peptide. Surprisingly, the frequency of responses was much higher than that, with 82% (40) patients responding to at least one peptide ([S1 Dataset](#)). It is also interesting to consider, that several responses were not associated with the expected restrictive HLA allele, possibly indicating recognition promiscuity [[25](#), [26](#)] or unknown HLA specificities of poorly described HLA alleles characteristic of Amerindian populations.

Unexpectedly, we observed 22 peptides that were recognized by more than 15% of the participants, from which 14 (64%) included DR mutations ([Table 3](#)). This proportion was conserved (67% of 134 were DR peptides) when going down to a recognition threshold of 10% of the individuals in the cohort. The high recognition frequency of these peptides in an immunogenetically diverse cohort makes them good immunogen candidates for putative therapeutic vaccines and supports the idea that cornering the virus between concerted immunologic and pharmacologic selective pressures might be possible. In particular, cases in which a therapeutic vaccine including DR peptides could reinforce ART in a virally suppressed patient, additionally preventing the development of drug resistance, come to mind. In particular, peptides containing highly relevant mutations for HIVDR including K65R, M184V, T215Y for NRTI; K103N, Y181C for NNRTI; and V32I, I50V, V82A, L90M, for PI were frequently recognized ([Table 3](#)).

On the other hand, we also observed several WT peptide-specific responses with high frequency of recognition and with strong median magnitudes of response. When comparing the response of WT and DR peptide pairs, we observed a median of 4 fully cross reactive responses per individual for WT peptides only ([Fig 3](#)). This suggests that the presence of the DR mutation in the peptide could also serve as a CTL escape variants, effectively abrogating CTL recognition. Indeed, 3 of the 8 most frequently recognized peptides in the cohort were WT ([Fig 4](#)). In these cases, knowing the HLA of the patient would be useful to avoid, as far as possible, the use of antiretroviral drugs that could promote the double viral escape, e. g. The peptide NLLTQIGCT overlapping the protease L90 position was the most frequently recognized in the study cohort ([Table 3](#)), with a significantly higher median magnitude of response compared to the DR version ([Table 1](#)). This epitope is restricted by HLA-B*18. Thus, patients with this HLA, treated with protease inhibitors would be more prone to develop the L90M DR (and in this case, also immune escape) mutation.

It has been previously proposed, that a CD8+ T cell response-associated “original antigenic sin” effect could exist with the elicitation of pre-existing lower avidity cross-reactive memory T cells in the case of a secondary exposure to some highly variable pathogens, including dengue viruses and human papilloma viruses [[27–29](#)]. The expansion of cross-reactive memory T cells with low avidity for epitopes of the variant responsible for the second antigenic exposure over naïve T cells with higher avidity for the new variant would result in low magnitude and/or sub-optimal T cell responses. Interestingly, in the present study, the median magnitude of response observed for DR peptides did not differ to that observed for WT peptides ([Table 2](#)). Also of note is the fact that several of the peptides with the highest frequency of recognition, also showed significantly higher magnitudes of response to DR peptides ([Tables 1](#) and [3](#)), e.g. the PR epitope RNLMTQIGC, including L90M, and the RT epitope QHLLRWGLY, including

T215Y, both showed recognition frequency of 29% and a significantly higher median Δ DR-WT magnitude of response. This observation suggests that in general, responses observed to DR peptides were not the result of weak cross-reactive effects, but rather independently generated responses. Indeed, a restricted T cell receptor (TCR) promiscuity has been described for variant epitopes with a limited degree of tolerance for epitope variation in the elicitation of strong CTL responses [30]. In the work by Hoof et al., peptides eliciting ELISpot responses were found to be significantly more similar to the autologous virus than those that did not elicit a response, with a single substitution in the peptide decreasing the chance of observing a CTL response by 40%. A similar effect was observed in our study, in which responses elicited by WT peptides coincided with the presence of the epitope in the autologous virus in a median 73% of cases. Interestingly however, responses to DR peptides did not coincide with the presence of the DR epitope in the autologous plasma virus, even when looking at low frequency variants. Several scenarios could explain this effect. First, the introduction of DR mutations in some peptides had no visible effect on peptide recognition by CTL, showing a degree of TCR promiscuity to peptides in which the introduction of the DR mutation might not abrogate binding to the restricting HLA molecule, as previously described [30]. Second, novel epitopes containing DR mutations could exist, with no immunogenicity observed to the WT peptide, especially considering that the HLA repertoire in the study cohort included several incompletely described HLA alleles mainly of Amerindian origin. Third, even when our method did not allow us to find DR variants in the autologous virus, which could explain the presence of responses to DR peptides, DR variants could still exist in lymphoid tissue or other body compartments, they could be present in lower frequencies that our method was able to detect with confidence (<2%), or they could have spontaneously appeared in previous time points causing cross reactivity. Fourth, indeed, an original antigenic sin effect could exist for some DR peptides, eliciting cross-reactive responses that, although of similar magnitudes compared to responses to WT peptides, could qualitatively be different from WT responses [31]. Further studies are needed to assess the quality of CTL responses elicited by these highly recognized DR peptides, including T cell polyfunctionality and patterns of cytokine production, in order to support their possible role as effective immunogens in combined immunologic-pharmacologic HIV control strategies. Detailed TCR analyses of responses directing responses to WT and/or DR sequences may also help to understand the ontogeny of these responses. Furthermore, to support the possible use of DR peptides in therapeutic approaches, their immunogenicity in putative target patient groups including individuals under ART and individuals with ART failure who have developed DR will have to be assessed. Additionally, the study of peptides from other therapeutic targets such as the integrase and Gag proteins may increase therapeutic options.

Conclusion

Our observations suggest that cornering HIV through the immune recognition of DR variants could be feasible, especially when based on the use of frequently recognized and strongly reactive peptides. Nevertheless, we also found several cases of HIV double escape, where the presence of a DR mutation rendered a peptide non immunogenic, while the WT version of the peptide showed response. The use of opposing selective pressures on HIV could be useful to design personalized combined treatment and vaccination strategies, avoiding ART regimens prone to failure by the influence of the immune response and promoting the use of ARV drugs associated with the selection of DR variants recognized by the immune response in the immunogenetic context of the treated patient. Our work suggests that the use of DR peptides in putative therapeutic vaccines, could not only support viral suppression, but also avoid the development of DR, providing a double advantage for the patient.

Although our study has caveats that limit our conclusions, our results suggest as proof of principle that DR peptides are unexpectedly immunogenic and attention should be given to their possible use in HIV control strategies. Further studies are needed to assess the quality of CTL responses elicited by DR peptides, as well as their frequency of recognition in cohorts with different immunogenetic contexts. Also, the inclusion of putative target patient groups such as individuals under suppressive ART or with ART failure will be necessary to assess the viability of the inclusion of DR peptides in therapeutic strategies. Additionally, it will be interesting to extend these studies to other HIV proteins that could function as possible therapeutic targets, including the integrase and Gag.

Supporting Information

S1 Dataset. ELISpot response magnitudes to independent peptides per study participant and HLA allele distributions.

(XLSX)

S1 Fig. Wide spectrum of differential magnitudes of response to WT and DR peptide pairs divided by peptide Set. Differential magnitudes of response to each DR-WT peptide pair (Δ) are shown in the upper panels for each responder separating peptide Sets “a” and “b” (for a description of each peptide design see [Methods](#)). Δ were calculated as the magnitude of response (SFC/million PBMC) to the DR sequence minus the magnitude of response to the WT sequence in each subject individually. A median differential magnitude was then calculated across all individuals responding to either the WT, the DR or both sequences. Boxes represent 50% of differential magnitude to each DR-WT peptide pair, whiskers maximum and minimum of the differential magnitude. In the lower panels, only median Δ responses are shown. Peptide pairs with significantly higher differential response to DR are shown in red; peptide pairs with significantly higher differential response to WT are shown in blue ($p < 0.05$).

(TIFF)

S2 Fig. Recognition frequency of DR mutations by peptide set. ELISpot responses to a panel of 45 and 95 DR-WT peptide pairs for Set “a” and Set “b” respectively, were assessed in 49 individuals (for a description of each of the two peptide design approaches see [Methods](#)). The number of peptide pairs for which, both the WT and DR, only DR, or only WT peptides were recognized was assessed per individual. The scatter plot shows the result of three Wilcoxon tests comparing the paired data between groups, significant p values are indicated. Error bars show the median with interquartile range.

(TIFF)

S3 Fig. Recognition frequency and differential magnitudes of response to DR and WT peptides overlapping DR mutations with and without HLA association. ELISpot responses to a panel of 39 and 56 DR-WT peptide pairs for peptides overlapping DR positions with and without HLA association respectively were assessed in 49 individuals. The presence of absence of HLA associations was determined by comparison to previously published data [22]. The number of peptide pairs for which, both the WT and DR, only DR, or only WT peptides were recognized was assessed per individual. The scatter plot shows the result of three Wilcoxon tests comparing the paired data between groups, significant p values are indicated. Error bars show the median with interquartile range. Δ were calculated as the magnitude of response (Spot-Forming Cells/million PBMC) to the DR sequence minus the magnitude of response to the WT sequence in each subject individually for each peptide pair. Boxes represent 50% of differential magnitude to each DR-WT peptide pair, whiskers maximum and minimum of the differential magnitude. Peptide pairs with significantly higher differential response to DR are shown in

red; peptide pairs with significantly higher differential response to WT are shown in blue ($p < 0.05$).

(TIFF)

S1 Table. Median magnitudes of ELISpot responses to WT and DR peptides for both peptide sets.

(DOCX)

S2 Table. Presence of DR mutations overlapped by the assayed peptides per individual in the study cohort.

(DOCX)

S3 Table. Correlation between immunological response to specific peptides and presence of the corresponding epitope in the patient virus for peptide Set “a”.

(DOCX)

S4 Table. Correlation between immunological response to specific peptides and presence of the corresponding patient virus for peptide Set “b”.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank Dr. Douglas Nixon, from George Washington University, DC, for the critical review of this work. We thank Dr. Hezhao Ji, for providing access to the HyDRA web server at the National Microbiology Laboratory of the Public Health Agency of Canada for NGS data analysis. This paper constitutes partial fulfillment of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) Doctoral Program in Biomedical Sciences requisites for JBH.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JBH SAR CB GRT. Performed the experiments: JBH. Analyzed the data: JBH AL HVP. Wrote the paper: JBH SAR.

References

1. Ensoli B, Cafaro A, Monini P, Marcotullio S, Ensoli F. Challenges in HIV Vaccine Research for Treatment and Prevention. *Frontiers in immunology*. 2014; 5(417):1–11. doi: [10.3389/fimmu.2014.00417](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00417) PMID: [25250026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25250026/); PubMed Central PMCID: PMC4157563.
2. Mothe B, Hu X, Llano A, Rosati M, Olvera A, Kulkarni V, et al. A human immune data-informed vaccine concept elicits strong and broad T-cell specificities associated with HIV-1 control in mice and macaques. *Journal of translational medicine*. 2015; 13:60. doi: [10.1186/s12967-015-0392-5](https://doi.org/10.1186/s12967-015-0392-5) PMID: [25879820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25879820/); PubMed Central PMCID: PMC4336696.
3. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced immunodeficiency virus infection.pdf>. *The New England Journal of Medicine*. 1998; 338(13):853–60. PMID: [9516219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9516219/)
4. Detels R, Muñoz A, McFarlane G, Kingsley LA, Margolick JB, Giorgi J, et al. Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. *The Journal of the American Medical Association*. 1998; 280(17):1497–503. PMID: [9809730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9809730/)
5. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature medicine*. 1999; 5(5):512–7. doi: [10.1038/8394](https://doi.org/10.1038/8394) PMID: [10229227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10229227/).
6. Archin NM, Margolis DM. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir. *Current opinion in infectious diseases*. 2014; 27(1):29–35. doi: [10.1097/QCO.0000000000000026](https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000026) PMID: [24296585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24296585/); PubMed Central PMCID: PMC4031321.
7. Llano A, Frahm N, Brander C. How to optimally define optimal Cytotoxic T Lymphocyte epitopes in HIV infection? *HIV Molecular Immunology*. 2009:3–24.

8. Nixon DF, Douek D, Kuebler PJ, Jin X, Vesanan M, Bonhoeffer S, et al. Molecular tracking of an Human Immunodeficiency Virus nef specific cytotoxic T-cell clone shows persistence of clone-specific T-cell receptor DNA but not mRNA following early combination antiretroviral therapy. *Immunology letters*. 1999; 66(1–3):219–28. PMID: [10203058](#).
9. Avila-Rios S, Reyes-Teran G, Espinosa E. Cornering HIV: taking advantage of interactions between selective pressures. *Medical hypotheses*. 2007; 69(2):422–31. doi: [10.1016/j.mehy.2006.12.012](#) PMID: [17280799](#).
10. Brumme ZL, Li C, Miura T, Sela J, Rosato PC, Brumme CJ, et al. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding reverse transcriptase-integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2011; 56(2):100–8. doi: [10.1097/QAI.0b013e3181fe9450](#) PMID: [21124229](#); PubMed Central PMCID: PMC3078702.
11. LANL. Los Alamos HIV Immunology Database [September, 2015]. Available: http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/M_GROUP/M_group_explanation.
12. LANL. Los Alamos HIV Immunology Database [August, 2015]. Available: <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ct/Pol.html>.
13. John M, Moore CB, James I, Mallal SA. Interactive selective pressures of HLA-restricted immune responses and antiretroviral drugs on HIV-1. *Antiviral Therapy*. 2005; 10(4):551–55. PubMed Central PMCID: PMID: [PMC16038481](#).
14. Frahm N, Korber BT, Adams CM, Szinger JJ, Draenert R, Addo MM, et al. Consistent Cytotoxic-T-Lymphocyte Targeting of Immunodominant Regions in Human Immunodeficiency Virus across Multiple Ethnicities. *Journal of Virology*. 2004; 78(5):2187–200. doi: [10.1128/jvi.78.5.2187–2200.2004](#) PMID: [14963115](#)
15. Ji H, Liang B, Knox C, Eisner R, Petkay A, Enns E, et al., editors. Development of a data processing portal in support of tagged pooled pyrosequencing-based HIV drug resistance analysis. 22nd Annual Canadian Conference on HIV/AIDS Research 2013; Vancouver, Canada: Can J Infect Dis Med Microbiol.
16. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PloS one*. 2009; 4(3):e4724. doi: [10.1371/journal.pone.0004724](#) PMID: [19266092](#); PubMed Central PMCID: PMC2648874.
17. Stanford University. HIV Drug Resistance Database [September, 2015]. Available: <http://hivdb.stanford.edu>.
18. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14):1754–60. doi: [10.1093/bioinformatics/btp324](#) PMID: [19451168](#); PubMed Central PMCID: PMC2705234.
19. Listgarten J, Brumme Z, Kadie C, Xiaojiang G, Walker B, Carrington M, et al. Statistical resolution of ambiguous HLA typing data. *PLoS computational biology*. 2008; 4(2):e1000016. doi: [10.1371/journal.pcbi.1000016](#) PMID: [18392148](#); PubMed Central PMCID: PMC2289775.
20. Mueller SM, Schaetz B, Eismann K, Bergmann S, Bauerle M, Schmitt-Haendle M, et al. Dual selection pressure by drugs and HLA class I-restricted immune responses on human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Virol*. 2007; 81(6):2887–98. doi: [10.1128/JVI.01547-06](#) PMID: [17202219](#); PubMed Central PMCID: PMC1866003.
21. Harrer T, Plettenberg A, Arasteh K, Van Lunzen J, Fatkenheuer G, Jaeger H, et al. Safety and immunogenicity of an adjuvanted protein therapeutic HIV-1 vaccine in subjects with HIV-1 infection: a randomised placebo-controlled study. *Vaccine*. 2014; 32(22):2657–65. doi: [10.1016/j.vaccine.2013.10.030](#) PMID: [24144472](#).
22. Carlson JM, Listgarten J, Pfeifer N, Tan V, Kadie C, Walker BD, et al. Widespread impact of HLA restriction on immune control and escape pathways of HIV-1. *J Virol*. 2012; 86(9):5230–43. doi: [10.1128/JVI.06728-11](#) PMID: [22379086](#); PubMed Central PMCID: PMC3347390.
23. Avila-Rios S, Ormsby CE, Carlson JM, Valenzuela-Ponce H, Blanco-Heredia J, Garrido-Rodriguez D, et al. Unique features of HLA-mediated HIV evolution in a Mexican cohort: a comparative study. *Retrovirology*. 2009; 6:72. doi: [10.1186/1742-4690-6-72](#) PMID: [19664284](#); PubMed Central PMCID: PMC2734549.
24. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Garrido-Rodriguez D, Ormsby CE, Hernandez-Juan R, Andrade-Villanueva J, et al. National prevalence and trends of HIV transmitted drug resistance in Mexico. *PloS one*. 2011; 6(11):e27812. doi: [10.1371/journal.pone.0027812](#) PMID: [22110765](#); PubMed Central PMCID: PMC3217006.
25. Frahm N, Yusim K, Suscovich TJ, Adams S, Sidney J, Hraber P, et al. Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes. *European journal of immunology*. 2007; 37(9):2419–33. doi: [10.1002/eji.200737365](#) PMID: [17705138](#); PubMed Central PMCID: PMC2628559.

26. Rao X, Hoof I, Costa AI, van Baarle D, Kesmir C. HLA class I allele promiscuity revisited. *Immunogenetics*. 2011; 63(11):691–701. doi: [10.1007/s00251-011-0552-6](https://doi.org/10.1007/s00251-011-0552-6) PMID: [21695550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21695550/); PubMed Central PMCID: PMC3190086.
27. Klenerman P, Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature*. 1998; 394(6692):482–5. doi: [10.1038/28860](https://doi.org/10.1038/28860) PMID: [9697771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9697771/).
28. Weiskopf D, Sette A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. *Frontiers in immunology*. 2014; 5:93. doi: [10.3389/fimmu.2014.00093](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00093) PMID: [24639680](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24639680/); PubMed Central PMCID: PMC3945531.
29. Chakradhar S. Updated, augmented vaccines compete with original antigenic sin. *Nature medicine*. 2015; 21(6):540–1. doi: [10.1038/nm0615-540](https://doi.org/10.1038/nm0615-540) PMID: [26046565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26046565/).
30. Hoof I, Perez CL, Buggert M, Gustafsson RK, Nielsen M, Lund O, et al. Interdisciplinary analysis of HIV-specific CD8+ T cell responses against variant epitopes reveals restricted TCR promiscuity. *Journal of immunology*. 2010; 184(9):5383–91. doi: [10.4049/jimmunol.0903516](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903516) PMID: [20363973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20363973/).
31. Yachi PP, Ampudia J, Zal T, Gascoigne NR. Altered peptide ligands induce delayed CD8-T cell receptor interaction—a role for CD8 in distinguishing antigen quality. *Immunity*. 2006; 25(2):203–11. doi: [10.1016/j.immuni.2006.05.015](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.05.015) PMID: [16872849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16872849/).