



**Instituto de Medicina Tropical
"Pedro Kourí"**

**Título: Caracterización molecular de la región C2V3
del gen de la envoltura de VIH-1 en pacientes
cubanos (2015-2016)**

Tesis presentada para optar por el título de Máster en Virología.

Autora: Dra. Rui Han

La Habana

2017



**Instituto de Medicina Tropical
"Pedro Kourí"**

**Título: Caracterización molecular de la región
C2V3 del gen de la envoltura de VIH-1 en
pacientes cubanos (2015-2016)**

Tesis presentada para optar por el título de Máster en Virología.

Autora: Dra. Rui Han

Tutoras: Dra. Vivian Kourí Cardellá, DrCs

Lic. Yenisleidys Martínez Montesino, MCs

Lic. Lissette Pérez Santos, DrC

La Habana

2017

Resumen

El lazo V3 del gen de la envoltura del VIH-1 está involucrado en la unión a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, determinando así el tropismo viral. Con el objetivo de caracterizar genéticamente la región C2V3 del gen *env* de VIH-1 en muestras de pacientes cubanos, se secuenció este fragmento en 73 plasmas de pacientes infectados con los subtipos más representativos de la epidemia cubana (20 subtipo B, 24 CRF19_cpx, 20 CRFs_BG (20, 23, 24) y 9 CRF18_cpx, con secuencias previas del gen *pol*, tomados en el período 2015-2016. Se analizó el subtipo y la predicción del fenotipo viral, las mutaciones virales así como la relación del fenotipo y el subtipo con variables clínicas, epidemiológicas, virológicas e inmunológicas. De manera general coincidieron los subtipos detectados en *pol* con los obtenidos en la región C2V3, aunque nueve muestras (12,3%) presentaron un subtipo diferente, por lo que se clasificaron como URFs. El virus CRF19_cpx se relacionó con tener fenotipo R5X4/X4 (62,5%, $p=0,02$, OR:3,77; IC:1,135-10,536), con infección en individuos jóvenes (39,1%, $p=0,025$, OR:3,548; IC:1,136-11,077) y con altos valores de carga viral. La comparación de las secuencias aminoacídicas del lazo V3 mostró diferencias entre los subtipos B y no-B ($p=0,0001$). Se detectó alguna mutación asociada a resistencia a Maraviroc en el 60,3% de las muestras, en las posiciones 11 (5,5%), 13 (50,7%), 25 (6,8%), 316 (5,5%), 323 (8,2%) y 319 (5,5%). Las variantes de VIH que utilizan el co-receptor CXCR4 se asociaron con más de 10 años de diagnóstico, con individuos de mayor edad, en estadio sida, con bajos conteos de CD4 y mayores niveles de carga viral ($p<0,05$). Se confirmó la hipótesis de que los virus CRF19_cpx podrían ser más patogénicos y tendrían limitación para el uso de Maraviroc.

Listado de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ADNdc: Ácido desoxirribonucleico de doble cadena

ARV: Antirretroviral

ARN: Ácido ribonucleico

CD4: Grupo de diferenciación celular (del inglés, cluster of differentiation)

CV: Carga viral

CRFs: Formas recombinantes circulantes (del inglés, circulating recombinant forms)

dNTP: Desoxi-ribonucleótidos trifosfatados

FDA: Administración de Drogas y Alimentos (del inglés, Food and Drug Administration)

FRs: Formas recombinantes

FPR: Probabilidad de identificar incorrectamente un virus R5 como X4 (del inglés, False Positive Rate)

G2P: Geno2pheno

HTLV-III: Virus Linfotrópico Humano de Células T-III

HSH: Hombres que tienen sexo con otros hombres

IC: Intervalo de confianza

IIN: Inhibidores de la integrasa

IS: Inductoras de sincitios (del inglés, syncytium inducing)

ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversas análogos de nucleósidos

ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversas no análogos de nucleósidos

ITS: Infecciones de Trasmisión Sexual

IPK: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

IPR: Inhibidores de la proteasa

Kb: Kilobases

LAV: Virus asociado a linfadenopatía (del inglés, lymphadenopathy associated virus)

LT: Linfocito T

LT CD4+: Linfocitos T CD4+ (grupo de diferenciación celular (del inglés, cluster of differentiation))

LTR: Terminal larga repetida (del inglés, long terminal repeat)

MVC: Maraviroc

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

NIS: No inductoras de sincitios (del inglés, non-syncytium inducing)

OMS: Organización Mundial de Salud

OR: Razones de desigualdad (del inglés, odd ratio)

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)

PR: Proteasa viral

RIC: Rango inter-cuartil

RT-PCR: Reverso transcripción/Reacción en cadena de la polimerasa

RT: Transcriptasa inversa o Transcriptasa reversa

SD: Desviación estándar (del inglés, standard deviation)

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIV: Virus de inmunodeficiencia de los simios (del inglés, Simian Immunodeficiency Virus)

SIVcpz: Virus de inmunodeficiencia de los simios de chimpancés

SIVsm: Virus de inmunodeficiencia de los simios sooty mangabey

TARVAE: Terapia antirretroviral de alta eficacia

URFs: Formas Recombinantes Únicas (del inglés, unique recombinant forms)

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

VIH-2: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| I INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. OBJETIVOS | 4 |
| III MARCO TEÓRICO | 5 |
| 3.1 Origen del VIH-1 | 5 |
| 3.2 Historia..... | 5 |
| 3.3 Clasificación..... | 6 |
| 3.4 Estructura de VIH-1 | 6 |
| 3.5 Replicación del VIH-1 | 8 |
| 3.6 Historia natural de la enfermedad..... | 10 |
| 3.6.1 Uso de co-receptores y tropismo viral | 11 |
| 3.7 Variabilidad genética de VIH-1 | 13 |
| 3.8 Epidemiología | 16 |
| 3.8.1 Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1 | 16 |
| 3.8.2 Epidemiología en Cuba | 17 |
| 3.9 Tratamiento antirretroviral | 18 |
| 3.9.1 Inhibidores de la Entrada | 19 |
| 3.9.1.1 Antagonista de CCR5..... | 19 |
| 3.10 Resistencia a los antirretrovirales | 20 |
| 3.10.1 Resistencia a los antagonistas de los co-receptores..... | 21 |
| 3.11 Ensayos genotípicos para detectar resistencia a los inhibidores de los co-receptores..... | 23 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 26 |
| 4.1 Diseño del estudio y universo..... | 26 |
| 4.2 Obtención de la información..... | 26 |
| 4.3 Aspectos éticos..... | 28 |
| 4.4 Procesamientos para la recolección de muestras..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 4.4.1 Obtención y procesamiento de las muestras clínicas..... | 29 |
| 4.4.2 Extracción del ARN viral..... | 29 |
| 4.4.3 Reverso Transcripción y PCR (RT-PCR) del gen env (gp160)..... | 29 |
| 4.4.4 PCR anidada de la región gp120. | 30 |
| 4.4.5 Análisis de los productos de las PCR anidada del gen env..... | 31 |
| 4.4.6 Purificación y secuenciación de los productos de la PCR anidada. . | 32 |
| 4.4.7 Edición de las secuencias. | 33 |
| 4.4.8 Clasificación por subtipos..... | 33 |
| 4.4.9 Análisis filogenético. | 33 |
| 4.4.10 Predicción del fenotipo viral. | 34 |
| 4.4.11 Análisis estadístico. | 34 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 36 |
| 5.1 Características generales de los pacientes estudiados | 36 |
| 5.2 Detección de subtipo de VIH-1 en la región C2V3 de la envoltura de VIH-1 y análisis del subtipo global. | 39 |
| 5.3 Predicción del uso del co-receptor viral y el Subtipo de VIH-1. | 42 |
| 5.4 Mutaciones en la región V3 de la proteína de envoltura gp120 en las secuencias cubanas de VIH-1 | 48 |
| 5.5 Mutaciones asociadas a cambio de tropismo y resistencia a MVC..... | 53 |
| 5.6 Relación entre variables epidemiológicas, clínicas, inmunológicas y de carga viral, con el tropismo viral y el subtipo de VIH-1 | 55 |
| CONCLUSIONES..... | 67 |
| RECOMENDACIONES | 68 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 69 |

I INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*. Fue descubierto y considerado como el agente de la nascente epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (sida) en 1981 por el Centro para el Control de las Enfermedades (1). Desde entonces se ha convertido en una epidemia que afecta a millones de personas en todos los continentes. Desde el comienzo de la epidemia 76,1 millones [65,2–88,0 millones] de personas contrajeron la infección por el VIH y 35 millones [28,9–41,5 millones] de personas han fallecido a causa de enfermedades relacionadas con el sida (2).

Existen dos agentes virales productores del sida, el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), que tiene una distribución mundial y es el responsable de la mayor parte de los casos y el virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), que predomina en el continente africano, aunque se reportan casos importados en Europa y América (3).

La infección por VIH-1 se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema inmunológico como consecuencia de un descenso paulatino en el nivel de linfocitos T CD4+ (LT CD4+), principal diana del virus (4). Está caracterizada por tres fases fundamentales: una infección primaria o aguda, un período de latencia clínica y una fase final o de sida, donde se manifiestan las enfermedades o eventos oportunistas responsables de las complicaciones y muerte del paciente (5). El VIH-1 es altamente variable y se han clasificado cuatro grupos distintivos: grupo M (Principal, del inglés *Main*), grupo O (Externo, del inglés *Outlier*), grupo N (no M, no O del inglés *non M, non O*) y el grupo P (6) Sin embargo son los virus del grupo M, los que, por su amplia diseminación mundial, se han convertido en los responsables de la actual pandemia. Estos se dividen en nueve subtipos (A al D; F al H; J y K) (7) y en múltiples formas recombinantes (FRs) que a su vez se clasifican en formas recombinantes circulantes (CRFs del inglés *circulating recombinant forms*) y formas recombinantes únicas (URFs del inglés *unique recombinant forms*)(8, 9), algunas de las cuales poseen una distribución geográfica específica (7). Hasta el momento se describen al menos 79 CRFs y numerosas URFs para el grupo

M del VIH-1, que representan casi el 20% de todas las infecciones por el VIH (10).

El VIH-1 consta de tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*. Este último juega un papel importante en la infección y el reconocimiento antigénico y su variabilidad ha sido el principal obstáculo para el desarrollo de nuevos candidatos vacunales y nuevas estrategias terapéuticas (11). La región V3, presente en el gen *env*, está catalogada como una región extremadamente variable y su función más significativa es la unión a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, determinando así el tropismo viral del VIH-1 (12).

Las variantes virales que utilizan el co-receptor CCR5 se caracterizan por no ser inductoras de sincitio (NIS), tener baja tasa de replicación, tropismo por macrófagos y predominan en las primeras etapas de la infección, catalogándose como virus con fenotipo R5. Aquellos virus que emplean el co-receptor CXCR4 para la entrada a la célula, infectan principalmente células T y se destacan por su habilidad para la inducción de sincitios (IS), tienen alta tasa de replicación y predominan en la fase tardía de la enfermedad, clasificándose como virus con fenotipo X4 (13, 14). Existe a la vez un grupo de virus que se clasifican con fenotipo dual (R5X4) por su capacidad para unirse tanto al co-receptor CCR5 como al CXCR4. Se considera que esta es una fase transitoria en la evolución del virus R5 a X4, aunque fenotípicamente se comportan como virus X4 (15). El VIH ha demostrado su capacidad para cambiar el tropismo durante el curso de la enfermedad, proceso que el virus utiliza adaptativamente para propagarse en presencia de antivirales (16).

El Maraviroc (MVC) es la única droga del grupo de los antagonistas de los co-receptores, aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos para el tratamiento de la infección con variantes R5 de VIH-1. Es el primer antirretroviral (ARV) que tiene como diana una proteína del hospedero en vez de una proteína viral. Su mecanismo de acción consiste en una inhibición alostérica de la unión de la glicoproteína gp120 al co-receptor CCR5 impidiendo la entrada del virus a la célula (17). A pesar de que esta droga comenzó a utilizarse en el 2007 ya se ha informado la existencia de variantes genéticas de VIH-1 resistentes al MVC. Aunque los mecanismos por los cuales esto ocurre no están claros aún, se conoce que un grupo de

mutaciones en el lazo V3 de la glicoproteína gp120 están asociadas a la resistencia (18).

En Cuba, los primeros casos de VIH se diagnosticaron en el año 1986. Según datos de la Vice dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MINSAP), hasta el cierre del 2016 se han reportado 26 361 personas viviendo con VIH, de ellas 2304 personas eran nuevos diagnósticos en ese año. Han fallecido 4159 personas por sida desde el inicio de la epidemia. Se encuentran recibiendo terapia ARV el 80,7% de los individuos infectados (19).

Se conoce que la epidemia de VIH-1 en Cuba es atípica comparada con el resto de las regiones de América y el Caribe donde predomina el subtipo B. Esta se caracteriza por una elevada diversidad de variantes genéticas de VIH-1 incluyendo una alta tasa de CRFs (20). Las formas genéticas más descritas hasta la fecha son los subtipos A, B, C, G, las CRFs_BG (CRF20_BG, CRF23_BG y CRF24_ BG) y dos CRFs complejos, CRF18_cpx y CRF19_cpx (8, 20-22). El subtipo B representa sólo un tercio de la epidemia cubana y los recombinantes BG y varios CRFs en Cuba se han expandido en los últimos años (23-25). Además, una publicación reciente mostró que la variante viral CRF19_cpx estaba asociada con rápida progresión al sida (26).

Sin embargo, son pocos los estudios realizados en Cuba acerca del comportamiento fenotípico de las variantes de VIH-1, así como de la variabilidad genética de la región V3 de la glicoproteína del VIH-1.

Por lo que el presente trabajo se enmarca de la caracterización genética del lazo V3 y su influencia en el subtipo viral, el cambio de tropismo y la resistencia a MVC en pacientes que no han recibido tratamiento con esta droga.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar genéticamente un fragmento de la región C2-V3 del gen de la envoltura de VIH-1 en muestras de pacientes cubanos tomadas en el período 2015-2016.

Objetivos Específicos

1. Identificar las variantes genéticas virales en la región C2-V3 del gen que codifica para la molécula gp120 del VIH-1 y compararlas con el subtipo detectado en el gen *pol*.
2. Determinar el fenotipo viral a partir de la secuencia genética del lazo V3 de la molécula gp120 de VIH-1 y su relación con la variante viral.
3. Identificar las mutaciones presentes en la región V3 de la glicoproteína gp120 del VIH-1 y su relación con la variante viral, el tropismo y la resistencia al Maraviroc.
4. Relacionar el fenotipo viral con variables virales, epidemiológicas y clínicas.

III MARCO TEÓRICO

3.1 Origen del VIH-1

Las evidencias epidemiológicas, apoyadas con los estudios moleculares, sugieren que la pandemia de VIH es una zoonosis viral. Esta teoría se basa en la relación genética que existe entre el virus de inmunodeficiencia de los simios (SIV) de chimpancés (SIVcpz), aislado en África Central y el VIH-1, así como entre el SIV de los sooty mangabey (SIVsm) y el VIH-2. Las secuencias correspondientes a las primeras cepas del VIH-1 y las de SIVcpz presentan una similitud del 84%. Sin embargo el VIH-2 tiene una relación genética más cercana con el SIVsm que con el VIH-1 (27, 28). Se piensa que el VIH-1 se originó cuando el SIVcpz pasó de los chimpancés al hombre. Se propone que los chimpancés infectados fueron cazados y consumidos, la sangre ingresó en las laceraciones o heridas del cazador y luego la cepa del SIVcpz se adaptó al ser humano, transformándose en VIH-1 (27, 28).

3.2 Historia

Hacia 1980 se reportaron casos de individuos previamente saludables que mostraban síntomas de disfunción inmunológica, en Estados Unidos y Europa. El nuevo síndrome se caracterizaba por linfadenopatías generalizadas, infecciones oportunistas como neumonía por *Neumocystis carinii*, Encefalitis por *Toxoplasma gondii*, Retinitis por Citomegalovirus, Meningitis Criptococócica y una variedad de neoplasias malignas como el linfoma no-Hodgkin y sarcoma de Kaposi (29-31). Un hallazgo común de laboratorio, fue la marcada depleción en sangre periférica del conteo de LT CD4+ en los individuos afectados (32).

En junio de 1981 la comunidad médica general reparó, por primera vez, en la importancia de la enfermedad que emergía, cuando el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta describió la existencia de cinco hombres con una severa inmunodeficiencia en el estado de California (33). A esta notificación le siguieron varios informes que reportaban daños en el sistema inmunológico en hombres homosexuales y usuarios de drogas intravenosas. Meses después se dio a conocer que una inmunodeficiencia similar estaba afectando a otros

grupos de individuos: hemofílicos, receptores de transfusiones de sangre, inmigrantes haitianos, y más significativamente, los compañeros sexuales y/o hijos de miembros de los diferentes grupos de riesgo (34).

En 1983, científicos del Instituto Pasteur aislaron un agente viral al que en sus inicios se le denominó *lymphadenopathy-associated Virus* (LAV), de un individuo asintomático que presentaba adenopatías generalizadas de origen desconocido (35). Casi simultáneamente en 1984 el grupo de Robert Gallo reportó el aislamiento de un retrovirus al que denominaron Virus Linfotrópico Humano de Células T-III (HTLV-III) y logró las primeras evidencias serológicas convincentes que relacionaban al LAV con la inmunodeficiencia que padecían los individuos de los grupos de riesgo (36, 37). Este nuevo retrovirus asociado al sida, presentaba características morfológicas y genéticas típicas del género *Lentivirus*, denominándose en 1986 virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (37). En este mismo año otro retrovirus relacionado con el VIH-1, pero con características inmunológicas propias y menor patogenicidad, fue aislado de individuos residentes en el oeste de África y se denominó VIH-2 (38).

3.3 Clasificación

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, integrado por virus exógenos no oncogénicos, que causan infecciones persistentes y enfermedades con períodos de incubación relativamente extensos. Exhibe una marcada predilección por el sistema inmune, infectando macrófagos, células dendríticas y LT CD4+. Tiene la capacidad de producir la formación de sincitios y la muerte de células permisivas y a diferencia de otros retrovirus, puede infectar células que no están en proceso de división. Las infecciones causadas por los *Lentivirus* no son restringidas por el sistema inmune y los daños resultantes van acumulándose en el organismo a lo largo de los años (32).

3.4 Estructura de VIH-1

Morfológicamente los viriones del VIH-1 son esféricos y de aproximadamente 110 nm de diámetro. Están rodeados por una envoltura lipídica de origen celular que rodea la cápside icosaédrica viral. Dicha cápside o *core* contiene a su vez una nucleocápside helicoidal que alberga el material genético del virión, 2 hebras de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva (**Figura 1**).

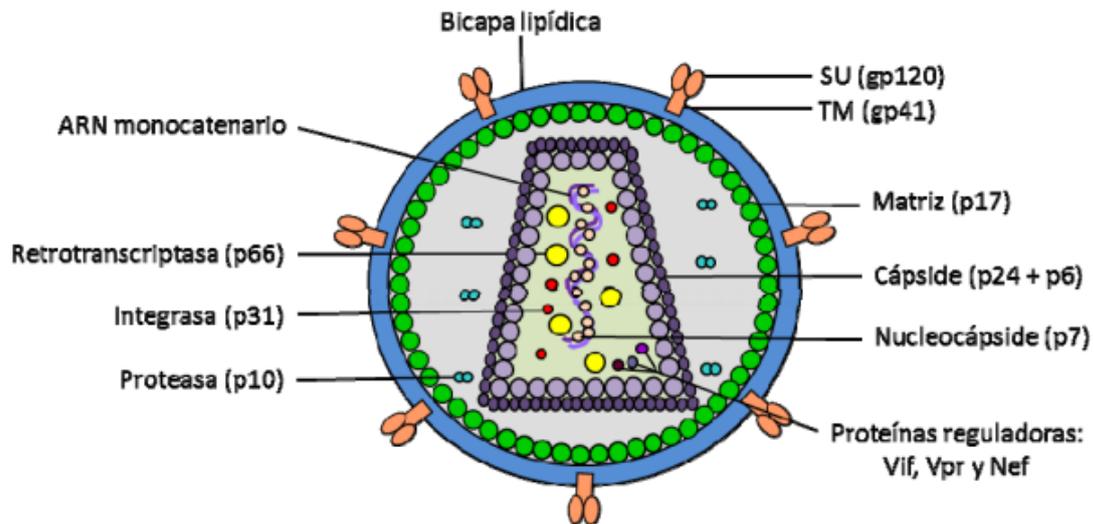


Figura 1. Estructura del virión del VIH-1 (tomado de Eduardo Seclén Hidalgo, 2012)

La envoltura viral está formada por una bicapa lipídica en la que se insertan las glicoproteínas gp120 y gp41, ambas codificadas por el gen de la envoltura (gen *env*). A continuación, se encuentra la matriz formada por la proteína p17, seguida de la cápside viral formada por la proteína p24 y estabilizada por la proteína p6. El material genético del virus se localiza dentro de la cápside viral en interacción con la proteína p7. Además, las enzimas virales transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN) así como las proteínas reguladoras Vif, Vpr y Nef se encuentran en el interior de la cápside. La proteasa viral (PR) se encuentra entre la cápside y la matriz (39-41).

El genoma del VIH-1 consiste en una hebra de ARN de aproximadamente 9719 nucleótidos de longitud, lineal, no segmentada, de cadena sencilla y polaridad positiva. En cada partícula vírica hay dos copias idénticas de esta molécula de ARN genómico, cuyos extremos 5' están unidos entre sí por puentes de hidrógeno, lo que hace de la familia de los retrovirus los únicos virus animales cuyo genoma es diploide.

Estructuralmente, el genoma del VIH-1 está formado por tres genes principales: *gag*, *env* y *pol* (**Figura 2**). *Gag* y *env* codifican para las proteínas estructurales, mientras que *pol* codifica las enzimas virales esenciales para el ciclo replicativo.

Adicionalmente, alrededor de la región de *env*, se sitúan en diferentes marcos de lectura las regiones codificantes de las proteínas reguladoras Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr y Vpu. El genoma del VIH-1 se encuentra flanqueado en ambos extremos 3' y 5' por las terminales largas repetidas (*LTR*), que desempeñan un papel crucial en la replicación del genoma viral así como en su integración al genoma de la célula hospedera (42).

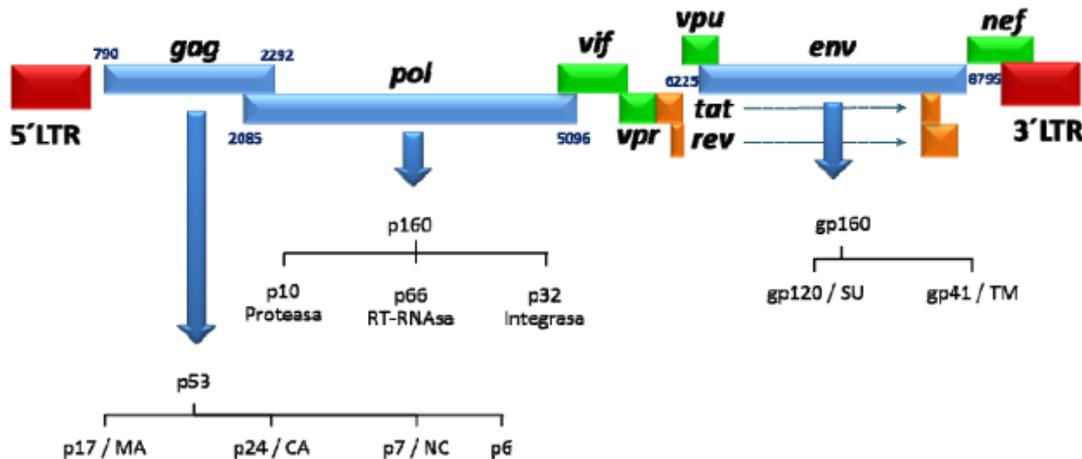


Figura 2. Estructura del genoma del VIH-1 (tomado de Eduardo Seclén Hidalgo, 2012)

3.5 Replicación del VIH-1

El VIH infecta *in vivo* las células que expresan las moléculas CD4+: los LT, las células del linaje de los monocitos, los macrófagos, entre otras.

El VIH-1 inicia su ciclo replicativo (**Figura 3**) mediante la unión entre la glicoproteína viral gp120 y el receptor celular CD4. Seguidamente, el complejo CD4-gp120 interacciona con los co-receptores CCR5 o CXCR4, provocando un cambio conformacional en la glicoproteína gp41 que promueve la fusión entre las membranas viral y celular, liberándose la cápside viral en el interior celular (43). Después de la fusión, en el citoplasma ocurre el desnudamiento viral dependiente de pH, se eliminan la cápside y la nucleocápside quedando libre el genoma viral listo para ser procesado (44). Luego la RT transcribe el ARN a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) que posteriormente convierte en ADN de doble cadena (ADNdc). A continuación el ADNdc es transportado

por el complejo de pre-integración desde el citoplasma al núcleo, donde la IN incorpora la molécula de ADNdc al ácido desoxirribonucleico (ADN) celular.

El provirus integrado se replica únicamente cuando el ADN celular se replica. En muchas células individuales el virus se encuentra en estado de latencia y en otras se expresa de forma continua, razón por la cual la infección por este virus se clasifica como crónicamente activa (45). En las células T en reposo la actividad vírica es mínima. No es hasta que ocurre la activación celular por infecciones a repetición o exposición a antígenos alogénicos cuando el virus se activa del estado quiescente. Otros factores esenciales en la activación del VIH son la coinfección de las células hospederas con virus no relacionados con potencial para la activación de la expresión génica viral, la infección por más de una cepa del VIH o por parásitos entéricos, el uso de drogas o diversos factores tóxicos y genéticos(32, 46).

La transcripción del provirus por la ARN polimerasa II celular tiene como resultado un transcrito primario con dos funciones principales, por una parte, servir de precursor para la formación de los ARN mensajeros y por otra parte, actuar como ARN genómico que se incorpora a las cápsides nuevamente ensambladas (47-50). La actividad cooperada de las proteínas reguladoras Tat y Rev permite el control preciso de la replicación vírica (32).

Finalmente ocurre el empaquetamiento del ARN viral y el ensamblaje de los viriones inmaduros. El virus abandona la célula por un mecanismo de gemación y se efectúa la maduración de la partícula viral fuera de la célula, por acción de la PR viral (32).

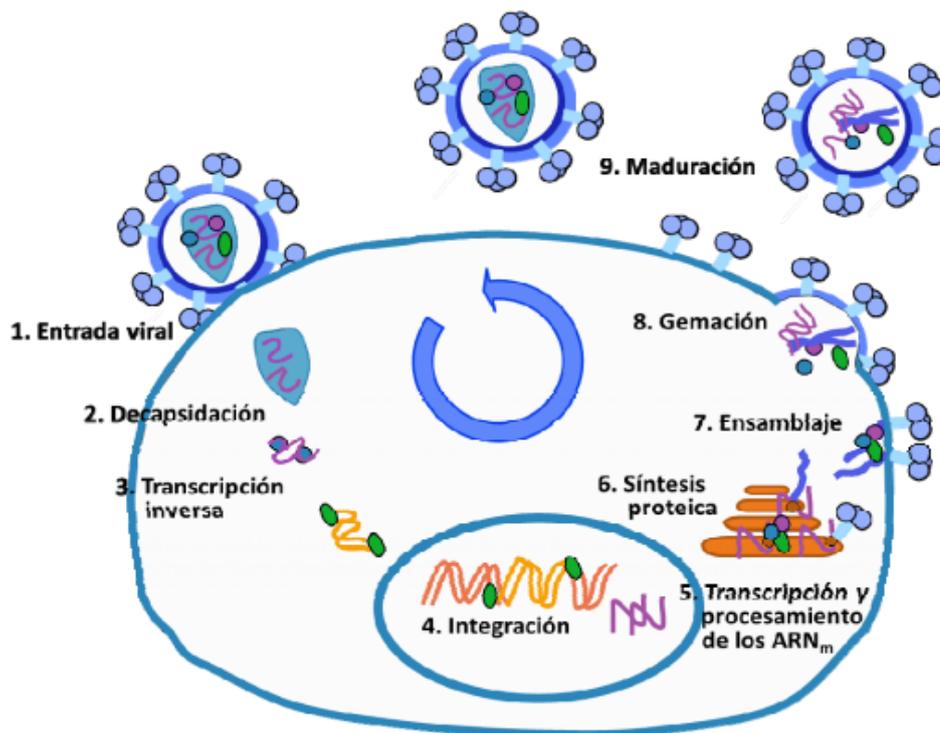


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH-1 (tomado de Eduardo Seclén Hidalgo, 2012)

3.6 Historia natural de la enfermedad

Hace algunos años se pensaba, que el período que existía entre la infección y la progresión a sida, conocido hasta ese momento como período de latencia clínica, reflejaba un estado subyacente de latencia viral. Sin embargo, se ha corroborado la actividad progresiva del VIH en el tejido linfóide, demostrando que la replicación viral persiste desde la infección a un ritmo asombroso (51, 52). El síndrome viral agudo de la infección primaria por VIH-1 (que se define, por el período de tiempo transcurrido desde la infección inicial con VIH-1 hasta el desarrollo de la respuesta de anticuerpos) muestra síntomas que con frecuencia se parecen a los de la mononucleosis infecciosa. Estos aparecen en los días o semanas posteriores a la exposición al VIH-1, no obstante, es probable que los signos clínicos y los síntomas no se presenten en todos los pacientes. Durante la infección aguda suele haber una viremia alta en plasma que puede durar días y hasta semanas (53), con una disminución notoria de células T CD4+. El conteo de LT CD4+, posteriormente se eleva otra vez, normalmente hasta valores inferiores a los anteriores a la infección. Después

de la infección aguda, habitualmente se alcanza un equilibrio entre la replicación viral y la respuesta inmune del huésped, y es probable que muchas personas infectadas no presenten manifestaciones clínicas de la infección por VIH-1 durante años. Aún en ausencia de tratamiento ARV, este período de latencia clínica puede durar de ocho a diez años o más (54). Sin embargo, este término puede llevar a conclusiones erróneas, por el elevado recambio del virus y la constante destrucción diaria de las células T CD4+. Al finalizar esta etapa pueden aparecer diversos síntomas o enfermedades que no cumplen con la definición de sida. Estos incluyen leves signos inmunológicos, dermatológicos, hematológicos y neurológicos. También pueden desarrollarse síntomas generales tales como fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna y diarrea. Finalmente, ocurre la progresión de la enfermedad hacia el sida, que se caracteriza por un constante aumento de la viremia, la disminución del conteo de LT CD4+ y por último, una profunda inmunosupresión (54).

Sin embargo, el curso de la infección puede variar dramáticamente y en algunos casos la progresión a sida puede presentarse rápidamente. La progresión a sida es un proceso multifactorial, donde se imbrican factores del hospedero, del virus y del ambiente, los que determinan si una persona infectada habrá de desarrollar rápidamente la inmunodeficiencia clínicamente franca, o si esta persona pertenece al grupo de los no progresores a largo plazo, que representan aproximadamente el cinco por ciento del total de los pacientes infectados.

3.6.1 Uso de co-receptores y tropismo viral

En 1996 se identificaron los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 como componentes principales para completar el proceso de entrada viral, además del receptor celular CD4. Se observó que las variantes de VIH NIS, que además eran generalmente M-trópicas, utilizaban el co-receptor CCR5 para entrar en la célula por lo que se denominaron virus R5, mientras que a las cepas IS y T-trópicas que utilizaban el co-receptor CXCR4 se les llamó virus X4 (55-57).

Estos hallazgos permitieron establecer la clasificación actual para los aislamientos del VIH-1 basándose en el uso del co-receptor. Según esta

clasificación, las variantes virales R5-trópicas son las que utilizan el co-receptor CCR5 para la entrada viral y las X4-trópicas las que utilizan el co-receptor CXCR4. Las variantes duales-trópicas son las que pueden utilizar cualquiera de los 2 co-receptores (**Figura 4**) (58).

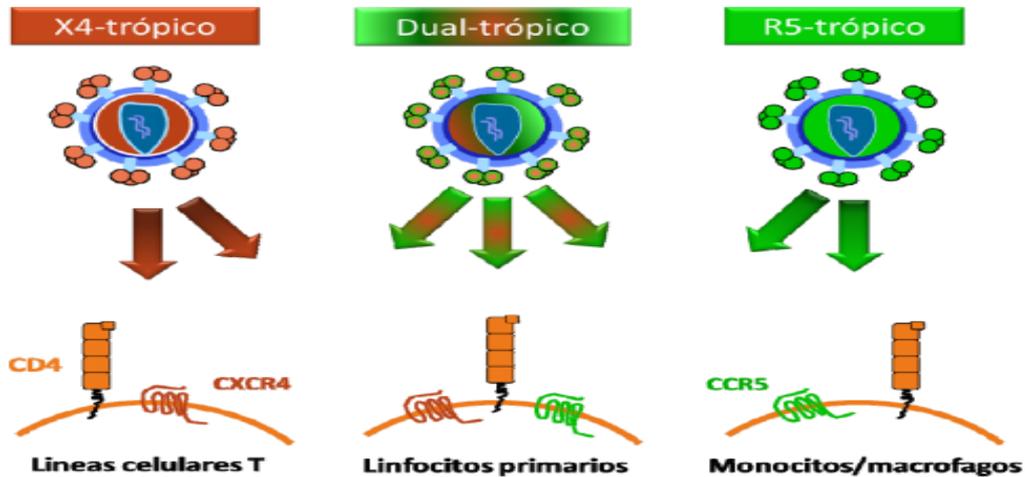


Figura 4. Variante del VIH-1 en función de su tropismo viral (tomado de Eduardo Seclén Hidalgo, 2012)

El uso de uno u otro co-receptor, o de ambos, determina el tropismo (fenotipo). La predicción del fenotipo viral tiene importantes implicaciones en cuanto a la transmisión, patogénesis, caracterización de diferentes grados de progresión a sida en los individuos infectados; así como en el momento de evaluar algunas opciones terapéuticas, como el empleo de los antagonistas del co-receptor CCR5 (59).

Las variantes virales R5 se aíslan en el 90-95% de las infecciones primarias por el VIH. Los virus X4 son más citopáticos, *in vitro*, que las cepas R5, por lo que se especula que *in vivo* también podrían ser más virulentos y citopáticos para las células T CD4+ (60). Esto podría explicar el colapso tan rápido de la población de células T CD4+ que ocurre después que los virus X4 empiezan a predominar, lo que conduce a la progresión rápida a sida (60).

Existen diferentes mecanismos moleculares que podrían explicar por qué las variantes R5-trópicas son las responsables del establecimiento de la infección. En primer lugar, existe una mayor expresión del co-receptor CCR5 con respecto al CXCR4 en los tipos celulares que ocupan la mucosa genital (61,

62). Además, las partículas virales fundadoras son transportadas en primer lugar a los nódulos linfáticos, donde infectan células T (63, 64), que también presentan mayores niveles de CCR5. Por último, el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal constituye el principal sitio de replicación del virus en humanos (65-70), además de presentar el mayor reservorio de células T CD4+ de memoria que expresan CCR5. Otro factor importante a tener en cuenta es que las variantes X4-trópicas son más susceptibles a la acción del sistema inmunológico debido, principalmente, a la menor cantidad de sitios de glicosilación que poseen en gp120. Otra hipótesis acerca de su emergencia consiste en que se generan como consecuencia de una debilitación del sistema inmune, cuando este ya no es capaz de neutralizarlas (71-74). Los estudios sobre la patogenicidad del VIH-1 según su tropismo han dado resultados controvertidos, sin resolver si las variantes X4-trópicas son naturalmente más patogénicas y por tanto, responsables de la progresión de la enfermedad o si la emergencia de dichas variantes es consecuencia del deterioro del sistema inmunológico, que no es capaz ya de evitar la aparición de las mismas (75). Por tanto, todavía se desconoce si la aparición de variantes X4-trópicas es causa o consecuencia del deterioro del sistema inmune.

3.7 Variabilidad genética de VIH-1

Las tasas de mutación de los virus ARN, incluidos los retrovirus, se ha estimado entre 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones por nucleótido por ronda de copia (76-78). La base bioquímica de esta alta tasa de mutación es la ausencia de la actividad correctora de errores (exonucleasa 3'-5'), en la RT, y la alta tasa de replicación viral (79).

La variación genética de los virus ARN no sólo puede ocurrir por mutaciones puntuales (transiciones y transversiones) sino también por inserciones y supresiones, por recombinación homóloga y no homóloga y por reordenamiento de segmentos en virus de genoma segmentado (80, 81). Las poblaciones de virus ARN se replican como distribuciones complejas de genomas diferentes pero genéticamente relacionados a los que se les denomina cuasiespecies (76). Otros autores las describen como distribuciones dinámicas de genomas víricos no idénticos pero genéticamente muy cercanos, sometidos a un continuo proceso de variación, competición y selección (82).

Las cuasiespecies constituyen un reservorio de variantes víricas, que presentan un amplio rango de fenotipos respecto a virulencia, tropismo, cinética de replicación y composición antigénica. El tamaño poblacional es de gran importancia en la heterogeneidad genética. En un individuo infectado por VIH-1 pueden existir de 10^9 a 10^{12} viriones, con un recambio de virus y de células infectadas muy elevado (83). Los análisis filogenéticos basados en las secuencias génicas del VIH-1, principalmente de los genes *gag* y *env*, han revelado cuatro grandes grupos (84) : M ,O , N y P (6). A su vez del grupo M se han identificado subtipos que van del A al D, F-H, J y K (**Figura 5**). En los subtipos A y F se distinguen sub-subtipos designados como A1, A2, A3, A4 y F1, F2 (7) .

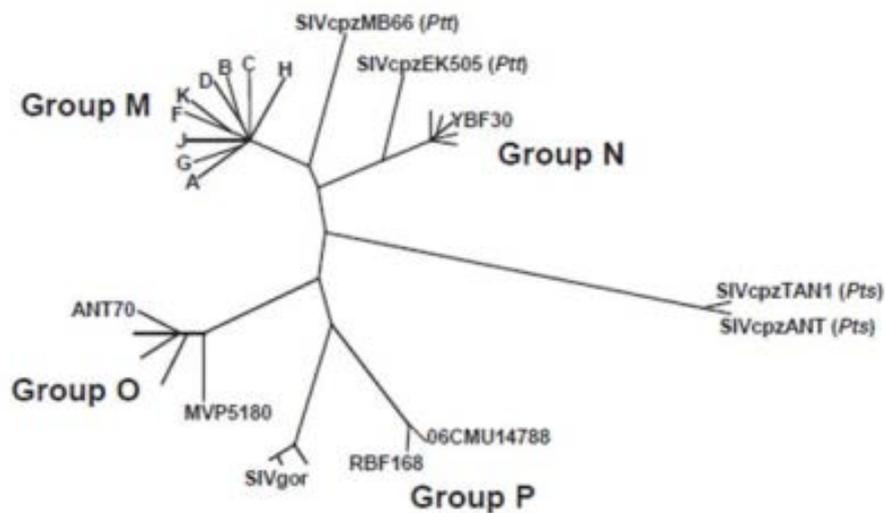


Figura 5. Relación filogenética de los grupos M, N, O y P de VIH-1 con varios aislados de Virus de Inmunodeficiencia en Simios (VIScpz y VISgpr)(tomado de Knipe and Howley, 2013)

Los virus de un mismo subtipo difieren de un 15 a un 20% en el gen *env*, mientras que los de diferentes subtipos difieren entre un 25 y un 35% (32). Las secuencias nucleotídicas del VIH-1 identificadas solo tienen un 50% de homología con las del VIH-2. En este último se distinguen 8 grupos denominados con las letras de la A a la H (7, 85). La recombinación constituye una fuente adicional de variación del VIH y desempeña un papel esencial en su evolución y en la expansión geográfica de los subtipos. La generación de retrovirus recombinantes requiere que dos virus infecten una célula, bien simultáneamente, a través de un episodio único de transmisión, bien de forma

secuencial, en varios episodios. En el VIH-1, la recombinación se puede producir entre diferentes cepas del mismo subtipo (intra-subtipo), de distintos subtipos (inter-subtipo) o de diferentes grupos (inter-grupo) (86, 87). La recombinación en los retrovirus requiere de la co-encapsidación en cada virión de los ARNs genómicos genéticamente distintos. La recombinación entre los genomas encapsidados en dos virus diferentes es posible solamente mediante la infección productiva de una única célula por ambos viriones, lo que permite la generación de partículas heterocigóticas. En un ciclo infectivo posterior, puede generarse un genoma recombinante mediante saltos alternativos de la RT entre ambos genomas co-encapsidados (8).

La nomenclatura actual de CRF y los criterios para definir las se adoptaron en 1999. Según estos criterios, para definir una CRF, se deben caracterizar tres virus sin relación epidemiológica entre ellos, con idénticos patrones de recombinación y agrupación consistente en árboles filogenéticos. De los tres virus se necesita tener secuenciado, al menos, dos genomas completos (≥ 8 kb). Las CRFs se designan con números consecutivos a medida que se van describiendo, seguidos por los subtipos parentales, o cpx cuando derivan de más de dos subtipos parentales (8). Las FRs del VIH-1 son mucho más prevalentes de lo admitido hasta la fecha, con una distribución geográfica mucho más amplia. Esto se aplica no sólo a las CRFs sino también a las URFs (9).

La recombinación *in vitro* puede ligar mutaciones en el VIH-1 y aumentar la resistencia a un determinado antirretroviral o generar virus multirresistentes (88). Este fenómeno puede darse también *in vivo*. Ella puede facilitar la adquisición de mutaciones que compensen la pérdida de la capacidad replicativa de estos virus, producida por mutaciones previas que causan resistencia. La alta frecuencia de recombinantes encontrados en las zonas donde circulan múltiples formas genéticas nos advierte sobre el posible efecto negativo del uso incontrolado de las ARVs. Esto podría potenciar la aparición y circulación generalizada de cepas multirresistentes generadas a partir de la recombinación (89, 90).

3.8 Epidemiología

En el 2016 se estimó que existían 36,7 millones de personas viviendo con el VIH-1 a nivel mundial, de ellas 1,8 millones de personas eran nuevos diagnósticos, con un total de 1 millones de muertes por sida a nivel global para ese año. Desde el comienzo de la epidemia 76,1 millones [65,2 millones–88,0 millones] de personas contrajeron la infección por el VIH, de los cuales 35,0 millones de personas han fallecido a causa de enfermedades relacionadas con el sida (2).

La gran mayoría de las personas están infectada por cepas que pertenecen al grupo M, los grupos O y N de VIH-1 representan menos de un 1% de las infecciones en el mundo y se han detectado casi exclusivamente en África centro-occidental. El grupo O ha sido identificado en personas de Camerún y países vecinos, mientras que el N y P solo se ha encontrado en Camerún(91, 92).

3.8.1 Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1

La distribución geográfica de subtipos del VIH-1 es un proceso dinámico, dada la gran movilidad de la sociedad humana moderna. Aparecen subtipos en áreas donde no se habían descrito con anterioridad. La generación de FRs contribuye ampliamente a ésta diversidad, la que se vislumbra en aumento con la diseminación de subtipos a nivel global (93, 94).

La distribución global de subtipos y recombinantes en los períodos del 2000-2003 y 2004-2007 muestran una amplia distribución de subtipos a nivel mundial, con un notable incremento de CRFs y una disminución de las URFs, así como un incremento global de las FRs. En el período 2004-2007, el subtipo C representó cerca del total de las infecciones con un 48%, seguido por el subtipo A (12%) y el B (11%), además de las FRs, CRF02_AG (8%), CRF01_AG (5%), el subtipo G (5%), y el D (2%). Los subtipos F, H, J, K, en conjunto causan cerca del uno por ciento de las infecciones mundiales. Las CRFs y URFs son responsables cada una del cuatro por ciento de las infecciones globales, las que unidas al resto de las CRFs (CRF02_AG (8%), CRF01_AG (5%)), arrojan un 16 %, mientras que los recombinantes todos (CRFs y URFs) representan un 20% (93).

En África Central se encuentra una gran diversidad viral con la presencia de todos los subtipos, así como de CRFs y URFs. En África Occidental se detectan todos los subtipos, sin embargo, predominan la CRF02_AG y el subtipo G. La mayoría de las infecciones en África Oriental son debidas al subtipo A. En el sudeste de África, Etiopía y la India, la epidemia es exclusivamente causada por el subtipo C (93).

El subtipo B predomina en América del Norte, el Caribe, América Latina, Europa Central, Europa Occidental y Australia. En Europa Central y Occidental son detectadas muchas CRFs y URFs. La epidemia en Europa Oriental y Asia Central es dominada por el subtipo A y B (95). En el sur y sudeste de Asia la CRF01_AE es responsable de la mayoría de las infecciones. En el este de Asia la epidemia está dominada por la CRF07_BC, CRF08_BC, CRF01_AE y el subtipo B. El norte y medio Oriente de África, está afectado mayoritariamente por el subtipo B y varias CRFs (93).

3.8.2 Epidemiología en Cuba

Hasta el cierre del año 2016 en Cuba se habían documentado 26 361 personas infectados con VIH-1 y 17 553 (80,7%) estaban recibiendo tratamiento antirretroviral. Cuba se convirtió en el primer país del mundo en eliminar la transmisión vertical en este año. Solo 3 casos de VIH en 148 nacimientos, para una tasa de infección de un 2,0%. La transmisión sexual es el factor de riesgo más frecuente para adquirir VIH-1 en Cuba. La transmisión parental y la exposición constituyen otras causas de infección, con mucha menor incidencia. El mayor número de casos son del sexo masculino con un 80,8%, y los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) constituyen el 73,7%. Entre las provincias con mayor prevalencia de la infección por VIH en edades entre 15 y 40 años están: La Habana (67%), Isla de la Juventud (49%) y Santiago de Cuba (28%). En 2016 fallecieron 407 personas a causa del sida, 2% más que en el 2015 (399), de ellos el 34% tenían menos de 5 años de diagnosticados con VIH, el 30% eran debut sida y el 19% habían sido diagnosticados en el propio 2016 (19).

Los diferentes estudios realizados de la epidemia cubana han identificado los subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, CRF01_AE, CRF02_AG, CRFs_BG y las FRs

complejas como la CRF18_cpx y la CRF19_cpx, así como recombinantes únicos, resultado de la circulación de los diferentes subtipos en el país(96), (97),(21),(22) Algunos de estos subtipos fueron adquiridos en África en la década del 70 y del 80 (23, 98).

3.9 Tratamiento antirretroviral

En los años 90, el conocimiento de la estructura, el ciclo replicativo del VIH y la interacción con el hospedero, permitió el surgimiento de la terapia antirretroviral de alta eficacia (TARVAE), como una combinación de tres o más fármacos pertenecientes a dos o más familias de fármacos antirretrovirales, la cual llevaba a una disminución en los niveles de ARN viral y a un aumento en el conteo de LT CD4+ (99).

Hasta la fecha, se han aprobado 27 drogas por la FDA para el tratamiento de los pacientes infectados con el VIH-1. Estas están distribuidas en cinco clases diferentes atendiendo a sus mecanismos moleculares y su perfil de resistencia: (1) inhibidores de la RT análogos de nucleósidos (ITIAN), (2) inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (ITINAN), (3) inhibidores de la proteasa (IPR), (4) inhibidores de la entrada e (5) inhibidores de la integrasa (IIN) (100).

En Cuba, antes de Mayo del 2001, se trataba a un número reducido de pacientes infectados con VIH-1 (terapia que se recibía por donación o se importaba). El país comienza la producción de un grupo de estos medicamentos (genéricos) en el año 2001 y los pacientes se incorporaron al tratamiento paulatinamente, pero no es hasta el 2003 que se logra una cobertura total del tratamiento (101). A partir del año 2004 (Proyecto Ronda 6 del Fondo Mundial) el país adquiere otro grupo de medicamentos que le permite diversificar la terapia y posibilita su empleo en pacientes con mala respuesta al tratamiento.

Las directrices de la Organización Mundial de Salud (OMS) sobre el tratamiento ARV del año 2015 recomiendan: "tratar a todos" y realizar la profilaxis pre-exposición (PrEP), lo que significa tratar a muchas más personas (112). La calidad del tratamiento debe incluir la prevención de la transmisión de cepas resistentes y el cambio inmediato de regímenes fallidos. Si el escalado del tratamiento está acompañado de regímenes fallidos y cargas virales no

suprimidas, existe el riesgo de un incremento de las cepas resistentes. Esto, a su vez, puede poner en riesgo los actuales regímenes de ARV y aumentar el costo del tratamiento exitoso, lo que lleva a más muertes y compromete la sostenibilidad de los programas de tratamiento (112).

Una buena adherencia al tratamiento puede suprimir la replicación viral por décadas reduciendo entonces la morbi-mortalidad y aumentando la calidad y expectativa de vida de los individuos infectados; sin embargo, la terapia no elimina la infección por VIH-1, que es considerada crónica y sin cura (112).

3.9.1 Inhibidores de la Entrada

La entrada viral es el primer paso del ciclo de replicación del VIH y por tanto representa una importante diana para la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la infección. Este primer paso involucra una serie compleja de interacciones entre las glicoproteínas de superficie y de transmembrana del virus y los receptores y co-receptores presentes en la membrana celular. Estas interacciones culminan con la fusión de las membranas y la liberación del virus en el citoplasma (102, 103).

Los inhibidores de la entrada están constituidos por un grupo heterogéneo de agentes que pueden actuar en cualquiera de las diferentes etapas del proceso de entrada viral: 1) unión de la glicoproteína gp120 de la envoltura viral al receptor CD4, 2) unión de gp120 a los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4 y 3) fusión de la membrana viral y celular (104).

El inhibidor de la fusión enfuvirtida (T-20) y el antagonista de CCR5, MVC, son hasta el momento los únicos inhibidores de la entrada aprobados para el tratamiento de la infección por VIH. Desde la aprobación de nuevos antirretrovirales orales de gran eficacia como darunavir, raltegravir, maraviroc y etravirina, el uso de T-20 se ha restringido fundamentalmente a pacientes con opciones terapéuticas muy limitadas (105).

3.9.1.1 Antagonista de CCR5

Los antagonistas de los receptores de quimiocinas inhiben alostéricamente la unión de la glicoproteína gp120 del VIH al co-receptor celular CCR5, impidiendo la entrada del virus a la célula. Ellos provocan un cambio

conformacional que impide la interacción con la región V3 de la envoltura de viral (106). Debido a su mecanismo de acción, la actividad antiviral de los antagonistas de CCR5 está limitada a variantes R5-trópicas del VIH-1.

El MVC es el primer antagonista de CCR5 con potente actividad antiviral aprobado en el año 2007 por la FDA, el cual bloquea la interacción entre el VIH-1 y el co-receptor CCR5 en células inmunes sanas, evitando que ciertas cepas (R5-trópico) del VIH entren e infecten a la célula. Actualmente, este fármaco es el único inhibidor del co-receptor CCR5 que ha sido aprobado para uso clínico (107). Se puede utilizar en pacientes infectados que no han recibido tratamiento antirretroviral, pero preferiblemente se reserva para aquellos que han experimentado fracasos terapéuticos después de terapias antirretrovirales tradicionales (108). Actualmente está bajo investigación, además, el cenicriviroc, que se encuentra en ensayos Fase II y parece bloquear el receptor CCR2, también empleado por este virus (105).

Los regímenes de tratamiento con MVC pueden usarse menos que otros regímenes, debido a que su uso presupone como requisito un ensayo inicial de tropismo. Además, hay actualmente disponibles una gran selección de regímenes de tratamiento tolerables que no requieren genotipificación antes de su uso. Estos regímenes de tratamiento pueden estar basados en ITIAN, ITINAN, IPR/potenciados e IIN (107, 109).

3.10 Resistencia a los antirretrovirales

Una de las principales razones para el fracaso de la terapia antirretroviral es el desarrollo de cepas resistentes de VIH. Cuando los niveles farmacológicos no son suficientes para controlar la carga viral (CV) y suprimir la replicación se puede producir la selección de cepas resistentes que con el tiempo se convertirán en las poblaciones predominantes (24, 110).

La menor susceptibilidad a un fármaco generalmente depende de la presencia de cambios genéticos en el genoma de vírico, que supone una alteración de la enzima diana del medicamento (111).

El VIH se hace resistente debido a una o más mutaciones en las regiones del genoma viral que codifican para las moléculas blanco de los ARV. Esto da como resultado la producción de proteínas ligeramente diferentes en estructura

y aunque todavía funcionan en la replicación, ya no son blancos efectivos para los agentes ARV y la susceptibilidad del virus se reduce (111).

En el último reporte de OMS se revela que en seis de los once países donde se estudió la resistencia antirretroviral, tanto de África, Asia y América Latina, más del 10% de las personas presentaban una cepa resistente a algunos de los medicamentos ARV (112).

Se ha observado que las mutaciones asociadas a resistencia pueden ser fijadas en el genoma viral y ser transmitidas a nuevos hospederos, lo cual generará una población viral intrínsecamente resistente a uno o varios medicamentos antirretrovirales, que posteriormente se traducirá en falla virológica en este individuo (113). Por ello, comprender los mecanismos de resistencias es fundamental para lograr una TARVAE óptima (114).

La resistencia a los antirretrovirales puede dividirse en dos clases : resistencia primaria, común en un individuo recién infectado y resistencia secundaria, que aparece luego de un período bajo terapia, dada por la presión selectiva que ejerce el fármaco sobre el virus (7). El grado de resistencia que presentan los antirretrovirales depende de la barrera genética de cada fármaco en particular o grupo de ARVs, la que está definida por el número de mutaciones que se requiere para provocar resistencia. Los fármacos con baja barrera genética pueden requerir de una sola mutación para producir resistencia. La alta barrera genética, en cambio, está definida por un gran número de mutaciones necesarias para producir resistencia (114). El monitoreo virológico de rutina en los pacientes bajo terapia ARV es importante para la detección temprana de fallo al tratamiento, así como la prevención del desarrollo de mutaciones (115).

En la actualidad existen varias técnicas, estudios genotípicos y fenotípicos, para realizar el análisis de la resistencia. Los ensayos genotípicos de resistencia habituales detectan mutaciones si estas están presentes en más de un 20% de la población viral (114, 116) .

3.10.1 Resistencia a los antagonistas de los co-receptores

Como con cualquier antirretroviral, la resistencia a ellos es inevitable, sin embargo, su perfil de resistencia es diferente a cualquier otra clase de antirretrovirales, ya que ellos se unen a una proteína de la célula huésped, no a

una proteína viral. Los posibles mecanismos de resistencia que la literatura comenta son: 1) conmutación de tropismo (utilización de CXCR4 en lugar de CCR5 para la entrada), 2) aumento de la afinidad por el co-receptor CCR5, 3) utilización del co-receptor aun en presencia de su agonista natural, y 4) incremento de la entrada del virus a la célula (117). La razón más común para el fracaso de la terapia con este compuesto es la emergencia de variantes virales minoritarias, no detectadas, que utilicen el receptor CXCR4 (118).

El perfil de resistencia a MVC es muy complejo, pero la mayoría de las mutaciones se presentan en la región del lazo V3 y en las regiones V2, C3, y V4 de la gp120, así como también en la gp41 (105). Se conocen un grupo de mutaciones presentes en CCR5 que afectan ligeramente la capacidad de CCR5 de unirse a su ligando o la habilidad del virus para utilizar esta molécula como co-receptor (119).

Estudios *in vitro* han demostrado que no existe una relación entre el subtipo viral y la resistencia a los antagonistas de los co-receptores (7).

La resistencia a MVC a menudo ocurre cuando se selecciona un virus de VIH-1 con tropismo X4, previamente no detectable, bajo presión del tratamiento con este fármaco. Esto ocurre cuando los virus R5-trópicos, que constituyen previamente la mayoría de las especies virales, son suficientemente reprimidos. Sin embargo, no existe hasta el momento ningún patrón establecido de mutaciones que pueda ayudar a predecir la resistencia.

Las mutaciones más comunes que se han reportado ocurren en la tercera región variable (V3) de la gp120 y son: sustituciones de glicina (G) a arginina (R) en la posición 11 (G11R), prolina (P) a R en posición 13 (P13R) y alanina a lisina (K) en la posición 25 (A25K) (105). Otros estudios *in vitro* han demostrado que las mutaciones en el bucle V3 de gp120 por lo general no confieren resistencia completa a MVC (105), sino que se necesita la cooperación de varias mutaciones. Además de las mutaciones descritas anteriormente se han descrito las susituciones de alanina a treonina en la posición 316 (A316T), isoleucina a valina en la posición 323 (I323V) y alanina a serina en la posición 319 (A319S) por secuenciación genética de aislamientos primarios de subtipos

B y G de VIH-1. También se produjeron deleciones de isoleucina y serina en posición 315 y posición 317, respectivamente (105).

Todavía se conoce poco acerca de la relación que existe entre las mutaciones en el co-receptor CCR5 y la reducción de la susceptibilidad frente a una infección por cepas R5. Por lo tanto, conocer la secuencia de genes del receptor CCR5, acompañado de los datos epidemiológicos, es relevante a la hora de comenzar una terapia en la que se utilicen esta nueva clase de droga (120).

3.11 Ensayos genotípicos para detectar resistencia a los inhibidores de los co-receptores

La literatura describe la existencia de una correlación entre la presencia de mutaciones que confieren resistencia y la pérdida de la eficacia antiviral, lo que permite considerarlas un marcador precoz de fracaso terapéutico aún antes de que ocurra una elevación de la CV (115, 120, 121).

Las variantes resistentes pueden detectarse mediante técnicas genotípicas o fenotípicas. El primer método se basa en el análisis de la secuenciación o ultra secuenciación de la región V3 de *env* que está fuertemente asociado al uso de co-receptores, el que se torna complejo en el momento de interpretar los resultados. El fenotípico se basa en cocultivos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados o utilizando virus recombinantes, lo que implicaría la disponibilidad de un laboratorio con nivel 3 de bioseguridad. La selección del método se basa en las condiciones locales, el costo y el tiempo del que se disponga (103).

Cuando se detecta un fallo virológico en un paciente deben realizarse las pruebas de resistencia en el momento en que la TARVAE este activa (122), ya que la población viral resistente será sustituida por otra sensible a las pocas semanas de retirar los fármacos. Los resultados de estas pruebas se deben interpretar teniendo presente los estudios previos de resistencia, la historia terapéutica y la adherencia del paciente (122). Entre las técnicas mencionadas anteriormente, las pruebas genotípicas son más sencillas, rápidas y accesibles para la mayor parte de laboratorios y permiten la detección de mutaciones antes de que se detecten cambios de susceptibilidad en las pruebas fenotípicas.

La secuenciación del lazo V3 (compuesta por 35 aminoácidos) de la gp120 es el método que se elige con mayor frecuencia porque es más accesible y requiere poco tiempo para su realización (123).

Para el análisis de la resistencia a los antagonista de los co-receptores, desde principios de los años noventa, se han descrito y desarrollado diferentes reglas y algoritmos, entre las que podemos citar: la regla 11/25, la regla de la carga neta, *WetCat*, *Geno2pheno* (G2P) coreceptor, *WebPSSM*, *FortinbrasPSSM*, y métodos combinatorios (124).

La regla 11/25 fue el primer algoritmo de interpretación propuesto, además de ser uno de los más sencillos y populares. Dicha regla se basa en la observación de que aquellos aislados que presenten aminoácidos básicos como la arginina (R) o la lisina (K) en las posiciones 11 y/o 25 se asocian con un fenotipo X4-trópico. La ausencia de R o K en estas posiciones se asocia con un tropismo R5-trópico (125). En general, se ha observado que esta regla presenta una gran especificidad (80-90%) pero baja sensibilidad (30-40%) para clasificar virus X4-trópicos. Más recientemente, se ha propuesto una modificación de la regla 11/25 que mejora el valor predictivo para la determinación del tropismo (126). Se trata de la regla 11/24/25 que considera una variante como X4-trópica cuando en la posición 11, 24, ó 25 aparece algún aminoácido básico, en caso contrario se identificará como R5-trópica (127).

Se recomienda la determinación del tropismo del VIH-1 en las siguientes situaciones clínicas: cuando se considera incluir antagonistas de CCR5 en la terapia, en un fallo a la terapia con MVC, por baja tolerancia o alta toxicidad con disfunciones neurológicas, en diagnósticos recientes o en pacientes no tratados antes de comenzar una terapia (123).

En general, la minimización del tiempo entre la evaluación del tropismo viral y el comienzo de la terapia es crucial para obtener una respuesta óptima ante un tratamiento con antagonistas de CCR5 (106, 128). Todavía se conoce poco acerca de la relación que existe entre las mutaciones presentes en el lazo V3 de la glicoproteína viral gp120 y el cambio de tropismo o la resistencia a los antagonistas de los co-receptores. Igualmente sucede con la posible relación entre las variantes genéticas y los fenotipos virales. Por lo tanto, estudiar la

secuencia de genes del lazo V3 de la gp120 del VIH-1 de las variantes genéticas cubanas, así como sus mutaciones y su posible asociación con variables virales, epidemiológicas y clínicas es relevante para comprender mejor la epidemia del VIH en Cuba; especialmente si se considerara incluir en el futuro antagonistas de CCR5 en la terapia antirretroviral cubana para tratar las infecciones con variantes R5 de VIH-1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio y universo.

Se realizó un estudio analítico de corte transversal para caracterizar genéticamente la región C2-V3 de la molécula gp120 del VIH-1 en muestras cubanas recibidas para estudios de resistencia a la terapia antirretroviral, en el Laboratorio de Infecciones de Trasmisión Sexual (ITS) del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), en el período de enero del 2015 a julio del 2016.

Criterios de inclusión:

- Aceptación de los pacientes para formar parte de la investigación (firma del consentimiento informado).
- Haber amplificado mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) el gen *pol* durante la realización del estudio de resistencia a la terapia antirretroviral. El límite de sensibilidad de esta PCR es de 1000 copias/mL (valor de carga viral del paciente).
- Que el resultado del subtipo viral detectado en el gen *pol* arrojara que la muestra tenía alguno de los subtipos más representativos de la epidemia cubana de VIH-1: Subtipo B, CRFs_BG (BG_20, 23, 24), CRF19_cpx, CRF18_cpx.
- Disponibilidad de 1 mL de plasma para la amplificación del gen *env* del VIH y posterior secuenciación de un fragmento de la región C2-V3.

4.2 Obtención de la información.

La información clínica, inmunológica y virológica de los pacientes en estudio se obtuvo de una encuesta o modelo de recogida de información que se realizó a cada uno de ellos en el momento de toma de la muestra (Anexo I), de la base de datos SIDATRAT (Base de datos de individuos seropositivos al VIH) y de los resultados del subtipo viral obtenidos en el Laboratorio de ITS del IPK a partir de la secuenciación y análisis del gen *pol* (**Tabla 1**).

Tabla 1. Operacionalización de las variables epidemiológicas, clínicas y virológicas que se incluirán en la planilla de recolección de datos

| Variables | Tipo | Escala | Descripción |
|--|--------------------------------|--|---|
| Sexo | Cualitativa nominal dicotómica | F M | Según sexo biológico. |
| Edad | Cuantitativa continua | <15 15-45 >45 | Se tuvo en cuenta la edad cumplida en años al momento de la toma de muestra. |
| Orientación sexual | Cualitativa nominal | HSH HT | Disposición o conducta de mantener relaciones sexuales con personas de su propio sexo y/o del sexo opuesto. |
| Región de residencia | Cualitativa Nominal | La Habana Región Occidental Región Central Región Oriental | Lugar de residencia, según encuesta epidemiológica realizada a los pacientes |
| Fecha de diagnóstico de VIH-1 | Cualitativa Nominal | Mes y año | Mes y año de la fecha en que fue confirmada la infección por VIH-1. |
| Carga viral de VIH-1 | Cuantitativa discontinua | <1000 100-10000 >10000 | Cantidad de partículas virales por mililitros de sangre (copias/mm ³) al momento de la toma de la muestra. |
| Conteo de células T CD4⁺. | Cuantitativa discontinua | <200 200-350 >350 | Conteo de LT CD4 ⁺ (células/mm ³) al momento de la toma de muestra. |
| Predicción del Fenotipo viral | Cualitativa nominal | R5 R5X4 X4 | Habilidad del virus para unirse a los co-receptores celulares CCR5 y/o CXCR4, determinada mediante la herramienta bioinformática G2P. |
| Subtipo de VIH-1 | Cualitativa nominal | A, B, C, D, F, G, H, URFs, CRFs (CRF18_cpx, CRF19_cpx, CRFs_BG 20, 23 y 24). | Subtipo viral de VIH-1 con el cual se encuentra infectado el paciente estudiado. |
| Mutaciones en la región V3 de gp120 del VIH-1 | Cualitativa nominal | Si tiene No tiene | Presencia de mutaciones que confieren resistencia a Maraviroc y/o cambio de tropismo (posiciones 11 y 25), carga neta y mutaciones específicas de cada subtipo viral. |
| SIDA al diagnóstico de VIH-1 | Cualitativa nominal | Si tiene No tiene | SIDA al momento del diagnóstico de la infección por VIH. |
| SIDA actual | Cualitativa nominal | Si tiene No tiene | SIDA al momento de la toma de la muestra. |
| Progresión a sida | Cuantitativa continua | <3 años (Progresión rápida) 3-10 años (Progresión normal) No sida | Tiempo transcurrido entre la fecha de infección y el comienzo de la fase sida. Debut sida: pacientes que al diagnóstico de VIH o en el primer año de diagnóstico clasifican como paciente en estadio sida. |

Un total de 73 muestras de pacientes fueron incluidas en la investigación. Los resultados del subtipo de VIH-1 en la región del gen *pol* se obtuvieron a partir del análisis de las secuencias realizado como rutina en el laboratorio de ITS para los ensayos de resistencia y subtipo, que abarca un fragmento de 1300 pares de bases (pb) que se corresponde con los codones 1-99 de la PR y 1-335 de la RT. Según el análisis de secuencia para este gen, las muestras habían sido subtipadas como se describe a continuación: CRF19_cpx, 24 (32,9%); B, 20 (27,4%); CRFs_BG 20-23-24 (27,4%) y CRF 18_cpx, 9 (12,3%).

4.3 Aspectos éticos.

Esta investigación forma parte de un proyecto de Ciencia Técnica Asociado a Programas titulado: “**Vigilancia de la resistencia antirretroviral (ARV) y evolución molecular del VIH en Cuba**” y ha sido aprobado por el Comité de Revisión de Ética Médica del IPK (CEI-IPK 08-12).

El estudio se realizó de acuerdo con la última revisión de la Declaración de Helsinki y lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales, de la medicina actual. Los individuos, después de recibir toda la información necesaria a través de charlas y material escrito, decidirán si participarán o no en el estudio. El personal médico le explicó al paciente durante la consulta de atención los aspectos relacionados con la ejecución del estudio así como la importancia del mismo; empleando un lenguaje claro y sencillo para facilitar su comprensión.

El personal médico también solicitó al participante la firma del Consentimiento Informado (Anexo II); asimismo le comunicó que podía retirarse del estudio sin perjuicio alguno en el momento que lo deseara. Se entregó además una copia del consentimiento informado a cada uno de los participantes. Luego de manifestar su completa disposición a participar en el estudio, se realizó una entrevista y un examen físico por un personal médico calificado. Esta información se recogió en un modelo de recogida de información previamente elaborado. Toda la información individual relacionada con los sujetos quedó debidamente custodiada por los responsables del estudio, de forma tal que se garantizó la absoluta confidencialidad de los datos personales.

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo teniendo en cuenta las buenas

prácticas de laboratorio y las medidas de bioseguridad. Las muestras clínicas se procesaron en gabinetes de seguridad clase II, según la clasificación del Centro Nacional de Seguridad Biológica de Cuba para el trabajo con virus.

El personal médico, que atendió a los pacientes con VIH, tuvo derecho a conocer los resultados derivados del diagnóstico.

4.4 Procesamientos para la recolección de muestras.

4.4.1 Obtención y procesamiento de las muestras clínicas

Para obtener 5 mL de plasma, se centrifugaron 10 mL de sangre (obtenidos a través de punción venosa) durante 10 min a 1500 rpm y 4°C. Una vez separado el plasma, se realizaron alícuotas de 1mL, las cuales se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

4.4.2 Extracción del ARN viral.

Se tomó 1mL de plasma por cada paciente y se centrifugó 14000 rpm durante una hora a 4°C. El sobrenadante se descartó dejando sólo 140 µL, con el que se disolvió el sedimento mediante vórtex por 15 segundos. Una vez disuelto se emplearon los 140 µL para la extracción del ARN viral, siguiendo el protocolo estándar para extracción de ARN descrito por el fabricante, utilizando el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit, de manera manual o automática (Extractor automático QIAcube, Alemania). El ARN extraído se conservó a -80°C hasta su utilización en la RCP.

4.4.3 Reverso Transcripción y PCR (RT-PCR) del gen env (gp160).

Síntesis y amplificación del ADNc: La RT del ARN viral a ADNc y la posterior amplificación mediante RCP de los 3876 pb del gen *env* completo (gp 160) se llevó a cabo utilizando el estuche comercial Super ScriptTM One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (InvitrogenTM, EU). La mezcla de reacción se preparó en las siguientes condiciones:

- ✓ 25 µL de Buffer 2X Reaction Mix, (0,4 mM de cada Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP) y 2,4 mM de MgSO₄).
- ✓ 0,5 uL de cada cebador: KVL008 y KVL009 a 20 uM cada uno.
- ✓ 10,5 uL de MgSO₄ a 5 mM.

- ✓ 1 µL de la enzima SuperScriptTM III RT/Platinum® Taq High Fidelity 100run (Invitrogen TM, EU).
- ✓ 0,25 uL de Inhibidor de RNasa a 40U/µL (Roche, Alemania).
- ✓ H₂O hasta completar un volumen final de 40 µL.

Finalmente a esta mezcla se le agregaron 10 µL del ARN extraído. La reacción de RT-PCR se realizó bajo las condiciones de ciclaje que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la RT-RCP

| Descripción. | Temperatura. | Tiempo. |
|------------------------------|--------------|----------|
| Transcripción reversa. | 55°C | 30 min |
| Desnaturalización inicial | 94°C | 2 min |
| 40 ciclos de: | | |
| Desnaturalización. | 94°C | 15 s |
| Hibridación de los cebadores | 52°C | 30s |
| Extensión. | 68°C | 4 min |
| Fin de los ciclos | | |
| Extensión final | 68°C | 5 min |
| Almacenamiento | 4°C | 12 horas |

4.4.4 PCR anidada de la región gp120.

La amplificación de los 2346 bp del gen que codifica para la proteína gp120 del VIH-1 se realizó utilizando el estuche comercial Expand High Fidelity (HF) PCR System (Roche, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla final de reacción se preparó de la siguiente manera:

- ✓ Expand HF Buffer 10X (Roche,Alemania)
- ✓ 2 mM MgCl₂, 200 uM dNTPs
- ✓ 0,4 uM del cebador AV317: 5'- TCAAGCAGGACATAAYAAGGTAGG-3' y 0,4 uM del cebador AV323: 5'- CTGCTCCYAAGAACCCAA-3'
- ✓ 2,6 U de la enzima Expand HF(Roche,Alemania)

Se utilizaron 2 μ L del producto de amplificación del gen *env* obtenido durante la reacción de RT-PCR.

Las condiciones de ciclaje se describen en la Tabla 3. Este protocolo, incluyendo la RT-PCR (gp160) y la PCR anidada (gp120), fue descrito por Van Leathem y cols. en el año 2005 (129).

Tabla 3. Condiciones de la PCR anidada.

| Descripción. | Temperatura. | Tiempo. |
|-------------------------------------|--------------|----------|
| Desnaturalización inicial | 95°C | 2 min |
| 10 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94°C | 15 s |
| Hibridación de los cebadores | 55°C | 30s |
| Extensión | 68°C | 3 min |
| 40 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94°C | 15 s |
| Hibridación de los cebadores | 55°C | 30s |
| Extensión | 68°C | 3 min* |
| Fin de los ciclos. | | |
| Extensión final | 72°C | 10 min |
| Almacenamiento | 4°C | 12 horas |

* Incremento de 5s en cada etapa de extensión.

4.4.5 Análisis de los productos de las PCR anidada del gen *env*.

Para analizar los productos obtenidos en la PCR anidada se tomaron 10 μ L de los mismos más 2 μ L del indicador de corrida (*Blue/Orange 6 X loading Dye*, Promega, EU) y se aplicaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (BDH, 0,1 μ g/mL). Este gel se sometió a una electroforesis horizontal utilizando como tampón de corrida TBE 1X (0,4 M de Tris; 0,5 M de ácido bórico y 0,01 M de ácido etilendiaminotetracético. La corrida se realizó a 120 V durante 30 min. Las bandas de ADN amplificadas se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision TM). La talla

correcta de la amplificación se determinó mediante la comparación con el patrón de migración del marcador de peso molecular 1kb DNA StepLadder (Promega, USA). Además se utilizaron controles positivos (C+), constituidos por una muestra de plasma que contenga VIH y que previamente había sido probada, así como controles negativos (C-) constituidos por agua en vez de ADN. Ambos fueron incluidos en cada ensayo desde el paso de extracción del ARN con el objetivo de descartar posibles inhibiciones o contaminaciones en la PCR.

4.4.6 Purificación y secuenciación de los productos de la PCR anidada.

Los productos amplificados de la región gp120 del gen *env* se purificaron utilizando el estuche comercial QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes.

Para secuenciar el fragmento de 144 pb que codifica para la región C2-V3 de la gp120, se emplearon dos reacciones de secuencia por cada producto purificado de la PCR anidada. Para las reacciones de secuenciación se prepararon mezclas constituidas por 1 µL de cada uno de los cebadores de secuencia (AV306: 5'-TGTCAGCACAGTACAATGTACACA-3'; AV309: 5'-CARTAGAAAATTCYCCTCYA CA-3'), 8 µL de la mezcla de reacción de secuencia DTCS Quick Star Master Mix (Dye Terminador CycleSequencing (DTCS) Quick Start Kit (BeckmanCoulter, USA), 5 µL de ADN purificado y 6 µL de H₂O, hasta completar 20 µL de reacción. Para esta reacción se realizaron 50 ciclos: 96°C por 30s, 50°C durante 20s y 60°C por 4 min.

Una vez concluida la reacción de secuencia, se realizó la purificación de los productos siguiendo el protocolo descrito en el estuche comercial DTCS Quick Star Master Mix (Beckman Coulter, EU).

La separación de los productos obtenidos en la reacción de secuencia se realizó en un secuenciador automático Beckman Coulter modelo CEQTM8800 utilizando el procedimiento de análisis de datos crudos para productos de PCR. Los cebadores y protocolos de la región de la envoltura fueron reportados por Van Leathem y colaboradores en el 2005 (129).

4.4.7 Edición de las secuencias.

Las dos secuencias obtenidas de la región C2-V3 del gen *env* de cada ADN se ensamblaron y editaron utilizando el programa *SequencherTMVersion* 4.9 (Genes Codes Corporation, USA), usando como referencia la secuencia nucleotídica de la cepa de VIH-1 B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455. Al final se obtuvieron secuencias consensos de cada muestra de los pacientes analizados.

4.4.8 Clasificación por subtipos.

Las bases de datos COMET versión 2 (disponible en (<http://comet.retrovirology.lu>) (130), y REGA versión 3 (disponible en <http://bioafrica.mrc.ac.za:8080/Rega-genotipo-3.0.2/VIH/typingtool/>) (131, 132) se utilizaron para realizar la clasificación inicial del subtipo de las secuencias.

4.4.9 Análisis filogenético.

Dado que la epidemia cubana se caracteriza por un alto número de CRFs y URFs (23), todas las asignaciones se confirmaron con análisis filogenético manual. Las secuencias fueron alineadas utilizando MUSCLE y editadas mínimamente con Mega 6 (133). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud, basado en el modelo de Tamura-3 parámetros del programa Mega 6. El árbol consenso, inferido a partir de 1000 réplicas, se utilizó para representar la historia evolutiva de las secuencias analizadas. Las distancias evolutivas fueron computadas utilizando el método de Tamura-3 parámetros, el porcentaje de variación entre los sitios fue modelado con distribución gamma. Se utilizaron 12 secuencias de referencias de los subtipos incluidos en el análisis, para establecer los diferentes subtipos de VIH-1 (con un total de 298 nucleótidos) que se compararon con las secuencias cubanas obtenidos en este estudio.

Las secuencias inicialmente clasificadas como CRF20_BG, CRF23_BG o CRF24_BG fueron nombradas CRFs_BG, debido a los puntos de recombinación similares en la región pol y la falta de puntos de recombinación en la región *env* (22). El subtipo asignado por ambas herramientas bioinformáticas fue confirmado mediante análisis filogenético.

4.4.10 Predicción del fenotipo viral.

El tropismo viral se predijo utilizando la herramienta genotípica G2P versión 2.5 [co-receptor] (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de>). Sobre la base de las directrices alemanas, los tropismos se dividieron en tres grupos de acuerdo con la probabilidad de identificar incorrectamente un virus R5 como X4. Una tasa de falsos positivos (FPR) $\leq 5\%$ son principalmente X4 y $\geq 20\%$ son principalmente las variantes R5. Por lo tanto, clasificamos secuencias del lazo V3 con FPR $\geq 20\%$ como virus R5, con FPR $>5\%$ y $<20\%$ como virus con tropismo dual (R5X4) y con FPR $\leq 5\%$ como virus X4 como se describió anteriormente (26, 134, 135).

Las mutaciones que confieren cambio en el tropismo viral se analizaron manualmente. La carga neta de V3 se calculó restando residuos de carga negativa [ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E)] de los cargados positivamente [arginina (R) y lisina (K)] en el lazo V3. Una carga neta positiva de V3 ≥ 5 fue considerada como predictiva de tropismo X4, mientras que una carga positiva por debajo de 5 fue predictiva de tropismo R5 (136). Por otra parte, también se realizó el análisis de acuerdo con la regla 11/25, donde se considera que la presencia de aminoácidos cargados positivamente (R o K) en las posiciones 11 o 25 del lazo V3 es predictiva de tropismo X4 (136). Se identificaron manualmente las mutaciones asociadas a resistencia a MVC en el lazo V3, según lo publicado en la literatura (105), ya que no existe ningún algoritmo establecido para la detección de estas mutaciones de manera automática.

4.4.11 Análisis estadístico.

Se confeccionó una base de datos en Excel. La media, la desviación estándar (*SD*), la mediana, el rango inter-cuartil (*RIC*), y las frecuencias (%) se utilizaron para describir las características de los pacientes. Las pruebas de χ^2 y de Fisher se utilizaron para comparar variables categóricas y continuas. Se estimaron las Razones de Desigualdad (*OR*) y su intervalo de confianza (*IC*) del 95%. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión de software estadístico SPSS 18 (SPSS Inc., Chicago, IL). Para realizar las comparaciones

entre variables cuantitativas se utilizaron las pruebas de Anova y Mann Withney (Programa Graph pad prism 5).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Características generales de los pacientes estudiados

La mayoría de los pacientes analizados en el estudio eran del sexo masculino (74%), de orientación sexual HSH (67,1%) y residentes de la Habana (64,4%), con una mediana de la edad de 38,4 años (**Tabla 4**), lo cual coincide con los datos publicados por la Vice dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública de Cuba hasta el cierre del año 2016, donde se reporta que la epidemia de VIH afecta más al sexo masculino, el que representa más de las tres cuartas partes de toda la epidemia (80,8%). Los HSH constituyen el 73,7% de todos los casos diagnosticados y el 89,9% entre los del sexo masculino. Entre las provincias con mayor prevalencia de la infección por VIH en edades entre 15 y 40 años están La Habana (67%), Isla de la Juventud (49%) y Santiago de Cuba (28%) (19).

El 94,5% de las muestras procesadas pertenecían a pacientes que reciben TARVAE, ya que el laboratorio de ITS del departamento de Virología realiza la vigilancia de la resistencia ARV en pacientes tratados. A nivel nacional se registra que 17553 individuos se encuentran recibiendo Terapia Antirretroviral, para un 80,8% de cobertura nivel nacional (19). El promedio de años de diagnóstico de VIH, al momento de la toma de muestra era de 8,4 años y solo el 12,3 % tenía diagnóstico reciente por lo que la mayoría las muestras pertenecían a pacientes con más de 10 años de diagnosticados, seguidos por los que tenían de 5-10 años. A medida que se prolonga el tiempo de diagnóstico de VIH, existen más probabilidades de estar en tratamiento y, por ende, que aparezcan mutaciones de resistencias y fallo a la terapia ARV. Es predecible entonces, que entre los pacientes estudiados, predominaran aquellos con más de 5 años de tratamiento.

Tabla 4. Características epidemiológicas, clínicas e inmunológicas de los pacientes estudiados

| Características | Número | % |
|---|-----------------------|-------|
| | 73 | 100,0 |
| Edad: mediana (RIC) | 38,4 (29,9-47,6) | |
| <15 | 2 | 2,7 |
| 15-30 | 17 | 23,3 |
| >30-45 | 30 | 41,1 |
| >45-60 | 20 | 27,5 |
| >60 | 2 | 2,7 |
| Desconocido | 2 | 2,7 |
| Sexo | | |
| Masculino | 54 | 74,0 |
| Región de residencia | | |
| La Habana | 47 | 64,4 |
| Oeste (excluida Habana) | 11 | 15,1 |
| Centro | 8 | 11,0 |
| Este | 5 | 6,8 |
| Desconocido | 2 | 2,7 |
| Orientación sexual | | |
| HSH | 49 | 67,1 |
| Años de Diagnóstico de VIH: mediana (RIC) | 8,4 (2,9-13,6) | |
| ≤1 año (Diagnóstico reciente) | 9 | 12,3 |
| >1-3 años | 9 | 12,3 |
| >3-5 años | 3 | 4,1 |
| >5-10 años | 20 | 27,5 |
| >10 años | 30 | 41,1 |
| Desconocido | 2 | 2,7 |
| Tratado con ARV | 69 | 94,5 |
| SIDA al diagnóstico de VIH | 8 | 10,9 |
| SIDA actual | 46 | 63,0 |
| Evolución a SIDA a partir del diagnóstico | | |
| ≤ 1 año | 19 | 26,0 |
| 1-3 años | 8 | 10,9 |
| >3 años | 19 | 26,0 |
| No sida | 25 | 32,4 |
| Desconocido | 2 | 2,7 |
| Carga viral en copias/mL: mediana (RIC) | 43000 (11000- 170000) | |
| <1000 | 3 | 4,1 |
| 1000-10000 | 13 | 17,8 |
| >10000-100000 | 30 | 41,1 |
| >100000 | 25 | 34,3 |
| Desconocido | 2 | 2,7 |
| Conteo de CD4 en células/mL: mediana (RIC) | 214 (77-298) | |
| <200 | 34 | 46,6 |
| 200-350 | 21 | 28,8 |
| 350-500 | 11 | 15,1 |
| >500 | 6 | 8,2 |
| Desconocido | 1 | 1,3 |

El 63% de los pacientes estudiados tenían sida, de ellos, el 10,9% fueron clasificados como sida desde el momento del diagnóstico de VIH, el 26% durante el primer año del diagnóstico de la infección y el 36,9% en los primeros tres años. En Cuba se informó que en el año 2016 fallecieron a causa del sida, 407 pacientes. De ellos, el 34% tenían menos de 5 años de diagnosticados con VIH, el 30% eran debut sida y el 19% habían fallecido el mismo año en que se diagnosticaron (19), lo que concuerda con las características de los pacientes del presente estudio. Desde hace al menos una década, se ha venido describiendo una cifra significativa de pacientes que al momento del diagnóstico de VIH ya se encuentran en fase sida o desarrollan sida en menos de tres años después del diagnóstico. Kouri y col., (137) describen la rápida progresión a sida en individuos infectados con la variante viral CRF19_cpx, una de las formas genéticas de VIH-1 de mayor prevalencia en la isla, lo que podría justificar parcialmente este hallazgo, sin descartar la posibilidad del diagnóstico tardío en algunos pacientes.

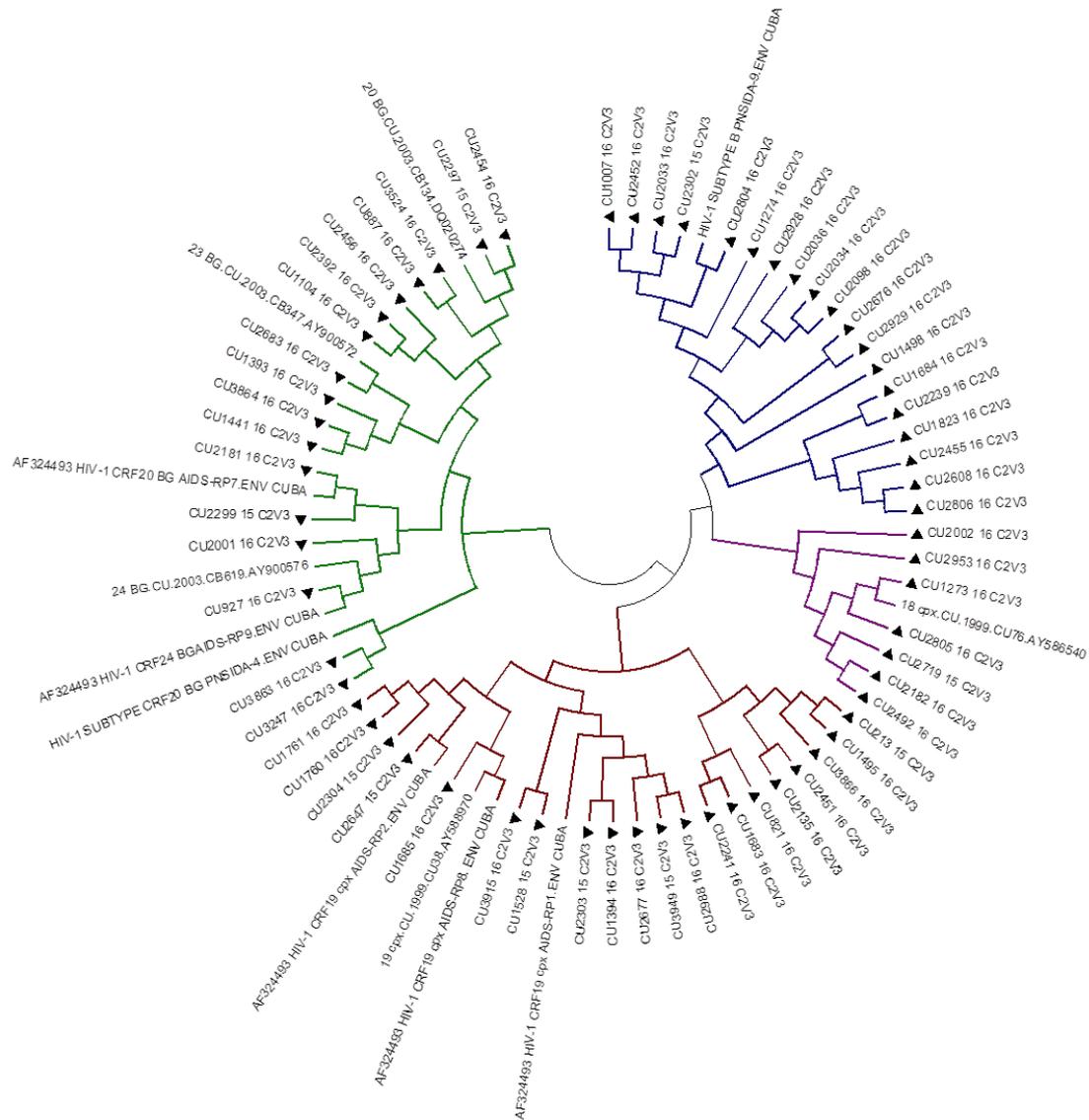
La CV plasmática es el principal parámetro para el seguimiento de la TARVAE. Se considera que hay un fracaso virológico cuando la CV es detectable pasadas 24 semanas desde el comienzo del tratamiento ARV, o si tras hacerse indetectable ésta vuelve a aparecer (valores >50 copias/mL) en dos determinaciones consecutivas separadas entre 2-4 semanas (138).

La mediana de la CV del VIH en los pacientes estudiados fue elevada (43000 copias/mL), exhibiendo el 75,4% de ellos más de 10000 copias/mL del virus. Así mismo, la mediana del conteo de CD4 fue baja (214 células/mL) y el 46,6% de los pacientes tenía conteos celulares por debajo de 200 células/mL. Como se ha explicado con anterioridad este laboratorio realiza la vigilancia de la resistencia en pacientes tratados, de manera que resulta justificado encontrar un alto número de pacientes exhibiendo altos conteos de CV y bajos conteos de linfocitos T CD4+, como resultado del fallo terapéutico (138). Por otro lado, como se describió anteriormente, el 63% de los pacientes estaban clasificados en estadio SIDA al momento del estudio, lo que implica bajos conteos de linfocitos.

5.2 Detección de subtipo de VIH-1 en la región C2V3 de la envoltura de VIH-1 y análisis del subtipo global.

El análisis filogenético es la técnica de referencia para el subtipado y discriminación entre subtipos y CRFs de VIH, sin embargo debido a su complejidad se necesita de personal altamente entrenado en programas bioinformáticos por lo que no está implementado en la práctica habitual del laboratorio de virología clínica. Para facilitar la realización de análisis filogenéticos en la práctica del laboratorio, se han desarrollado varias herramientas de subtipado automático para el VIH-1 que se encuentran disponibles en diferentes webs (REGA, Standford, COMET, Geno2pheno, NCBI, STAR, EuResist, TherapyEdge y jpHMM). Aunque son rápidas, fáciles de usar y muy útiles para la identificación del subtipo B, presentan el inconveniente de su menor sensibilidad para la discriminación entre los subtipos no-B, especialmente en las CRFs, con respecto al análisis filogenético convencional (138).

La confirmación de los subtipos de VIH-1 del presente estudio, determinados inicialmente mediante los programas bioinformáticos *COMET* y *Rega Subtyping tool V.3*, se realizó mediante el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas en 63 de las 73 muestras estudiadas, ya que éstas fueron las que tenían la secuencia completa de la región C2V3 que codifica para un fragmento de la proteína de envoltura gp120 (**Figura 6**). En las 10 muestras restantes solo estaban disponibles las secuencias de la región V3. El análisis se realizó utilizando el programa Mega 6 e incluyó 75 secuencias nucleotídicas de VIH, 63 secuenciadas en el presente estudio y 12 secuencias de referencia, de los subtipos representativos de la epidemia cubana. Los resultados obtenidos mediante la filogenia coincidieron en el 100% de las muestras, con lo que se había obtenido mediante los programas bioinformáticos, por esta razón, decidimos continuar el análisis de los resultados con las 73 muestras que habíamos incluido para estudiar, teniendo en cuenta el subtipo obtenido de manera automática.



F

figura 6. Árbol filogenético de la región C2V3 del gen env de VIH-1

El análisis incluyó 75 secuencias nucleotídicas, 63 secuenciadas en el presente estudio y 12 de referencias. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud (ML), basado en el modelo de Tamura-3 parámetros del programa Mega 6. El árbol consenso, inferido a partir de 1000 réplicas, se utilizó para representar la historia evolutiva de las secuencias analizadas. Los diferentes subtipos se muestran en ramas con diferentes colores: **Azul**, subtipo B; **Violeta**, CRF18_cpx; **Marrón**: CRF19_cpx; **Verde**, CRFs_BG (20, 23, 24). Las muestras cubanas secuenciadas en el presente estudio se encuentran marcadas con un triángulo negro, el resto son secuencias de referencia de los diferentes subtipos de VIH-1, incluidos en este estudio.

Para la selección de la muestra del presente estudio se tuvo en cuenta, que estuvieran representados los subtipos de VIH-1 más frecuentes en la epidemia cubana (ver acápite de materiales y métodos). De las 73 muestras escogidas, según el subtipo viral detectado previamente en el gen pol, pudimos observar que al secuenciar la región C2V3 del gen de la envoltura viral, de manera general coincidieron los subtipos, aunque se encontraron algunas diferencias

en nueve muestras, que presentaron un subtipo viral diferente en la envoltura; estas variantes virales fueron consideradas como URFs (**Tabla 5**). Según el subtipo detectado en el gen pol y el de env (gen pol/gen env) los nueve URFs se clasificaron como: dos CRF19_cpx/CRFs_BG, dos CRFs_BG/CRF19_cpx y el resto fueron un CRF19_cpx/B, un CRF18_cpx/CRF19_cpx, un B/CRFs_BG, un B/CRF18_cpx y un CRF18_cpx/B (**Tabla 7**).

Tabla 5. Subtipos detectados mediante secuenciación parcial de dos regiones del VIH-1 en las muestras analizadas

| Subtipo VIH-1 | Subtipo en pol (%) | Subtipo en env, C2V3 (%) | Subtipo global (%) |
|--------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|
| CRF 19_cpx | 24 (32,9) | 24 (32,9) | 21 (28,8) |
| B | 20 (27,4) | 20 (27,4) | 18 (24,6) |
| CRFs BG_(20,23,24) | 20 (27,4) | 21 (28,8) | 18 (24,6) |
| CRF 18_cpx | 9 (12,3) | 8 (10,9) | 7 (9,6) |
| URF | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 9 (12,3) |
| Total | 73 (100,0) | 73 (100,0) | 73 (100,0) |

En Cuba, a pesar de la baja prevalencia de la infección con el VIH-1 circulan gran variedad de subtipos (8), principalmente B, C, G y H, las CRFs_BG y los recombinantes complejos, CRF18_cpx y CRF19_cpx (8, 21, 22, 139). Mientras que los recombinantes BG tienen origen cubano, los CRF18_cpx y CRF19_cpx parecen tener origen africano (8, 21, 22, 139), pero se comportan de manera epidémica solo en Cuba. Esta diversidad contrasta con la epidemia casi exclusiva de Subtipo B en el resto del Caribe (94%) (140).

Najera y col., en un artículo publicado en la década del 2000 diserta sobre el sub-registro de URFs en zonas donde circulan a la vez múltiples subtipos y CRFs, así como la posibilidad de generar nuevas formas genéticas en aquellas poblaciones donde esto ocurre (80). Como se aprecia en la Tabla 5 en nueve muestras el subtipo no coincidió en los dos fragmentos de los genes secuenciados, por lo que fueron clasificados como URF, fenómeno este plausible dada las características de la epidemia cubana, donde circulan gran cantidad de variantes genética (8, 21, 22).

5.3 Predicción del uso del co-receptor viral y el Subtipo de VIH-1.

El VIH-1 utiliza los receptores de quimoquinas CCR5 o CXCR4 como los co-receptores principales para entrar en la célula. Aquellas cepas con tropismo por linfocitos T (LT), que expresan el co-receptor CXCR4, (virus X4 o R5X4) (141, 142) se asocian de forma consistente con un menor recuento de células T CD4 + en pacientes que reciben tratamiento ARV (143, 144) y con una progresión más rápida de la enfermedad en los pacientes no tratados (145-147), independientemente del conteo basal de linfocitos TCD4 + o los niveles del ARN viral (148, 149).

Es por ello, que conocer el fenotipo viral (basado en el uso del co-receptor) permite hacer una predicción de la patogénesis de la enfermedad y el tipo de progresión a sida (150). De igual modo es de gran importancia estudiar el fenotipo viral en el momento de seleccionar una terapia antirretroviral que incluya antagonistas de los co-receptores CCR5, ya que éstos solo son efectivos cuando el paciente se encuentra infectado con una variante R5 (151). Esto sucede generalmente en individuos que se encuentran en los primeros años de la infección por VIH.

Los métodos genotípicos, basados en el análisis por secuenciación de la tercera región variable (V3) de la glicoproteína de la envoltura gp120 del VIH-1, se presentan frente a los ensayos fenotípicos, como una alternativa más económica, rápida y factible de desarrollar en cualquier laboratorio de virología que cuente con tecnología para realizar estudios genotípicos de secuenciación (124). En este sentido, para las variantes virales R5 y X4-trópicas, la secuencia de aminoácidos de la región V3 de gp120 determina en gran medida el uso preferencial del co-receptor celular de entrada del virus a la célula diana de tipo CCR5 y/o CXCR4. Aunque conviene reseñar, que otras regiones de la envoltura como V1/V2 y C4 también parecen estar implicadas en este proceso (138).

Al analizar el tropismo viral, mediante la predicción del uso del co-receptor viral con el programa G2P, en las 73 muestras del presente estudio, se pudo observar que, de manera general, el 58,9% de los virus (43/73) utilizaban el co-

receptor CCR5, lo que implica que eran virus R5 o macrófago trópicos y que el 41,1 % (30/73) eran virus con capacidad para utilizar el co-receptor CXCR4 (R5X4 el 23,3% y X4 el 17,8% de los virus) (**Tabla 6**).

La literatura reporta que del 60 a 80% de los sujetos, en las primeras etapas de la infección por el VIH, portan variantes virales R5 y se considera que son los principales tipos de virus responsables de las nuevas infecciones. Las variantes virales X4 o R5X4 emergen en aproximadamente el 50% de los individuos en etapas posteriores de la enfermedad, generalmente asociado a rápida depleción de las células TCD4 y progresión a sida (152, 153). En general, los cambios de tropismo ocurren de R5 a X4, pero ocasionalmente se pueden ver también de X4 a R5 (154). Como se describió en la Tabla 4, el promedio de años de diagnóstico del VIH en los pacientes estudiados era de 8,4 años y el 68,6% de ellos tenía más de 5 años de diagnóstico. Aún más, el 63% clasificaban en estadio sida, por lo que es de esperar que un porcentaje elevado de pacientes de este estudio porte virus que sean T trópicos, o sea que utilicen el co-receptor de entrada CXCR4 (virus R5X4 o X4).

Tabla 6. Comparación de la predicción del uso del co-receptor entre los subtipos de VIH detectados

| Predicción del uso del co-receptor | Subtipo en C2V3 env | | | | | Subtipo Global (C2V3 env y pol) | | | | |
|------------------------------------|---------------------|--|-----------|------------|------------|---|------------|-----------|------------|-----------|
| | Muestras totales | CRF 19_cpx | B | BG(20-24) | CRF 18_cpx | CRF 19_cpx | B | BG(20-24) | CRF 18_cpx | URF |
| | 73 (100,0) | 24 (100,0) | 20(100,0) | 21 (100,0) | 8 (100,0) | 21 (100,0) | 18 (100,0) | 18(100,0) | 7(100,0) | 9 (100,0) |
| R5 | 43(58,9) | 9 (37,5) | 13 (65,0) | 15 (71,4) | 6 (75,0) | 9 (42,9) | 12 (66,7) | 12 (66,7) | 6 (85,7) | 4 (44,4) |
| Valor p R5 | | 0,02 OR:0,303 IC:0,108-0,845 | 0,392 | 0,290 | 0,457 | 0,0663 OR:0,397 IC:0,141-1,011 | 0,441 | 0,441 | 0,228 | 0,473 |
| R5X4 | 17(23,3) | 9 (37,5) | 2 (10,0) | 5 (23,8) | 1(12,5) | 7 (33,3) | 2 (11,1) | 5 (27,8) | 1 (14,3) | 2 (22,2) |
| Valor p R5X4 | | 0,044 OR:3,07 IC:1,00-9,43 | 0,125 | 0,941 | 0,747 | 0,229 | 0,209 | 0,757 | 1,000 | 1,000 |
| X4 | 13(17,8) | 6 (25,0) | 5 (25,0) | 1 (4,8) | 1(12,5) | 5 (23,8) | 4 (22,2) | 1 (5,5) | 0 (0,0) | 3 (33,3) |
| Valor p X4 | | 0,385 | 0,501 | 0,320 | 0,747 | 0,501 | 0,723 | 0,492 | 0,339 | 0,195 |
| R5X4/X4* | 30 (41,1) | 15 (62,5) | 7 (35,0) | 6 (28,6) | 2 (25,0) | 12 (57,1) | 6 (33,3) | 6 (33,3) | 1 (14,3) | 5 (55,6) |
| Valor p R5X4/X4* | | 0,02 OR: 3,77 IC:1,135-10,536 | 0,359 | 0,290 | 0,548 | 0,0663 OR:2,518 IC:0,90-6,97 | 0,441 | 0,441 | 1,000 | 0,473 |

*Incluye la suma de los virus con tropismo dual (R5/X4) y los que usan el co-receptor CXCR4 (X4).

Se ha debatido mucho si la aparición de virus X4 es causa o consecuencia de la depresión inmune (155). Utilizando modernas herramientas de genotipificación ultrasensibles, el virus X4 puede detectarse en prácticamente cualquier paciente poco después de la infección por el VIH, pero a niveles muy bajos, lo que sugiere que el VIH está siendo contenido por el sistema inmunológico. Por el contrario, en los estudios epidemiológicos el cambio de tropismo R5 a X4 precedió a la disminución del conteo de los LT CD4+ (156).

Aunque las pruebas de tropismo son obligatorias antes de utilizar un inhibidor de CCR5, no se ha establecido que los médicos de asistencia soliciten una prueba de tropismo para predecir si sus pacientes podrían tener un mayor riesgo de progresión clínica o si, en su lugar, deberían basarse en otros predictores más clásicos como el recuento de CD4 +, CV, etc. En un estudio previo de cohorte (152), los sujetos con variantes X4, que no recibieron tratamiento antirretroviral, tuvieron un descenso más rápido en los recuentos de linfocitos T CD4 + y sufrieron más eventos clínicos durante los 12 meses siguientes. Sin embargo, estas diferencias no se observaron en los sujetos que recibieron terapia.

Un estudio anterior realizado en Cuba por Lobaina y cols, en el año 1996 detecta que el 72,7% de los pacientes estudiados exhibían un tropismo preferencial por los linfocitos, indicando que el co-receptor utilizado para la entrada era el CXCR4. Aunque este resultado difiere de lo observado en el presente estudio, cabe señalar que la caracterización biológica llevada a cabo por Lobaina y cols. fue de aislamientos de VIH-1 de pacientes con una evolución clínica rápida a sida, los cuales son conocidos por utilizar en mayor proporción el co-receptor X4 (157). Por otro lado, Kourí y cols en 2016 (158) publicaron un estudio de 42 muestras de pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 (tratados y no tratados) y ellos describieron que el 38,1% de los pacientes portaban virus con capacidad reducida para el uso del co-receptor CCR5 (virus R5X4 o X4), lo cual coincide con los hallazgos de la presente investigación.

Sucupira MC y col., confirman la presencia de cepas con mayor patogenicidad in vitro durante la infección temprana por VIH, lo que sugiere que incluso entre individuos recientemente infectados, la progresión rápida puede ser una

consecuencia de la aparición temprana de cepas que utilizan el co-receptor X4. Es por ello que la caracterización de la región V3 del VIH-1 mediante secuenciación pudiera ser útil para predecir la progresión de la enfermedad y orientar las decisiones de inicio del tratamiento (159).

Es bien conocido que el cambio del fenotipo viral, de variantes de virus que utilizan el co-receptor CCR5 a CXCR4, se ha asociado con la rápida progresión a SIDA en Subtipo B de VIH-1 (160), mientras que datos recientes reportan progresión rápida similar en pacientes infectados con virus de otros subtipos de VIH que utilizan el CXCR4 (161).

Sin embargo, otros estudios han mostrado diferencias cuantitativas en la prevalencia del uso de CXCR4 entre los subtipos. La mayoría de los estudios iniciales sobre la evolución del uso del co-receptor de VIH-1 fueron en cepas pertenecientes al subtipo B (148, 162), que sigue siendo el mejor caracterizado en términos de uso de co-receptor. Un panorama más completo se tiene desde la extensión de estos estudios a los subtipos no B. Una de las mayores discrepancias ha sido la observación de una baja frecuencia de uso CXCR4 en las cepas del subtipo C (163-168). Las infecciones por subtipo-C de VIH-1 representan más de la mitad de las epidemias mundiales de VIH-1 (169), y son tan mortales como la infección por el subtipo B. Aunque se ha sugerido que la sub representación de las cepas que utilizan CXCR4 es debido a un sesgo de muestreo, los estudios posteriores en pacientes tratados de Zimbabwe (170) y un estudio reciente de Sudáfrica reportan una mayor prevalencia de variantes utilizando X4 que en el pasado (171). También se comenta que esto sea el resultado de la evolución en curso de la epidemia de VIH-1 de las cepas del subtipo-C en África.

Al analizar la relación entre el subtipo viral en el gen de la envoltura y el fenotipo o tropismo viral en las muestras estudiadas, se demostró que es tres veces más probable que los virus CRF19_cpx tengan tropismo viral dual R5X4, comparado con las otras variantes virales ($p=0,044$; OR: 3,07; IC: 1,00-9,43). Esta asociación se hace aún más significativa con la adición de los virus los CRF19_cpx X4 a los R5/X4 ($p=0,02$; OR: 3,77; IC: 1,135-10,536) (**Tabla 6**). No se encontró relación estadísticamente significativa para otra variante viral con el uso del co-receptor.

Al considerar los subtipos virales de manera global (teniendo en cuenta los subtipos detectados en los genes *pol* y *env*), se vuelve a observar el hallazgo reportado previamente en estudios de Cuba (19) que es más frecuente que los virus CRF19_cpx utilicen el co-receptor CXCR4, al compararlo con los otros subtipos, sin embargo no alcanza la significación estadística ($p=0,0663$; OR: 2,518, IC: 0,90-6,97) ya que tres de los virus clasificados en *env* como CRF19_cpx, no lo fueron en *pol*, por lo que se clasificaron de manera global como URF.

Un estudio reciente, realizado en Cuba, halló que el CRF19_cpx se asoció con una progresión rápida a sida y una de las hipótesis para explicar esta progresión rápida fue el hallazgo de niveles más altos de expresión de RANTES y una proporción significativamente más frecuente de virus X4 entre los pacientes infectados con esta variante viral (21). Otro estudio de Kourí y col., demuestra nuevamente la asociación del virus CRF19_cpx con tropismo X4 (137), aunque el número de muestras estudiadas de este subtipo fue reducido. Los resultados de la presente investigación refuerzan estos hallazgos descritos exclusivamente en Cuba. El virus CRF19_cpx es una forma genética compleja solo reportada en Cuba (21) pero con evidencias ancestrales en África Central (8, 21, 139). En la actualidad, se ha convertido en la tercera variante del VIH-1 en frecuencia que circula en Cuba (entre 17-19%) (158).

Esta forma recombinante contiene en su genoma los subtipos D (C-parte de Gag, PR, TR y *nef*), subtipo A (N-parte de Gag, Integrasa, Env) y subtipo G (*Vif*, *Vpr*, *Vpu* y parte C-terminal de Env) (21). Los subtipos D y A han sido asociados con rápida y lenta progresión a sida, respectivamente comparado con el subtipo B (172-174). La probabilidad de tener un virus que utiliza el co-receptor X4 en las infecciones que no se encuentran en estadio sida, es mayor en el subtipo D que en el A (175), sugiriendo un cambio temprano de tropismo hacia X4 (168). No obstante estos hallazgos no explicarían nuestras observaciones debido a que en el virus CRF19_cpx, la región que codifica para las proteínas de la envoltura, responsable del tropismo, deriva del subtipo A. Por este motivo debemos tratar de relacionar otras características epidemiológicas, del virus o de la respuesta inmune, con la asociación entre esta variante viral y el uso de este co-receptor.

Estudios como los de Cashin K. y col.,(176) apoyan la hipótesis de que las cepas R5 del subtipo de C pueden evolucionar in vivo a través de interacciones alteradas con CCR5, que puede manifestarse in vitro como un incremento en la capacidad para emplear co-receptores alternativos (176). Schuitemaker H. y col., (177) refieren un aumento de la presencia de cepas que utilizan CXCR4 en el subtipo D (175, 178, 179). Esta observación es consistente con el ritmo más rápido de la progresión de la enfermedad reportada para la infección con este subtipo tanto en África (172, 175, 180), como fuera de este continente (181).

La situación es más compleja con los genotipos mixtos (tanto CRFs como URFs) con sólo unos pocos aislamientos caracterizados hasta la fecha (182, 183). Como se observa en la Tabla 7, de los nueve virus clasificados como URFs, cinco se clasificaron como virus que utilizan el co-receptor CXCR4 (dos R5X4 y tres X4) y al analizar los virus recombinantes únicos con tropismo dual o X4 que componen a estos recombinantes se observó que cuatro de los cinco (80%) tenían incluido al CRF19_cpx en su genoma. En tres de estas muestras el CRF19_cpx se identificó en el gen de la envoltura y en la otra, en el gen de la polimerasa viral (dos CRFs_BG/CRF19_cpx, un CRF18_cpx/CRF 19_cpx y un CRF19_cpx/B), lo que indica una vez más la relación entre el virus CRF19_cpx y el uso del co-receptor CXCR4.

Un reciente estudio en Guinea Bissau, muestra una alta frecuencia de tropismo X4 (86%) en la forma recombinante CRF02_AG (184). De igual manera, también se ha reportado recientemente en España una alta incidencia de tropismo X4 entre usuarios de drogas intravenosas infectados con el recombinante CRF14_BG (185), así como la asociación de CRF01_AE con el fenotipo X4 en Tailandia (186).

Tabla 7. Distribución de los virus recombinantes únicos detectados entre las muestras estudiadas

| Subtipos Gen pol/Gen env | URF | % | R5 | % | X4 | % | R5X4 | % |
|-----------------------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|
| CRF_BG/CRF19_cpx | 2 | 22.2 | 0 | 0.0 | 1 | 33.3 | 1 | 50.0 |
| CRF18_cpx/CRF19_cpx | 1 | 11.1 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 1 | 50.0 |
| CRF19_cpx/B | 1 | 11.1 | 0 | 0.0 | 1 | 33.3 | 0 | 0.0 |
| CRF19_cpx/CRF_BG | 2 | 22.2 | 2 | 50.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| B/CRF_BG | 1 | 11.1 | 1 | 25.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| B/CRF18_cpx | 1 | 11.1 | 0 | 0.0 | 1 | 33.3 | 0 | 0.0 |
| CRF18_cpx/B | 1 | 11.1 | 1 | 25.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| Total | 9 | 100.0 | 4 | 100.0 | 3 | 100.0 | 2 | 100.0 |

Abreviaturas: CRF, forma recombinante circulante del inglés *circulant recombinant form*; URF, forma recombinante única, del inglés *unique recombinant form*; R5, virus que utiliza el co-receptor de entrada CCR5; X4 virus que utiliza el co-receptor de entrada X4; R5X4, virus con tropismo dual, que puede utilizar ambos co-receptores de entrada: R5 o X4. En rojo aparecen marcados los URF con tropismo dual o X4 que incluyen al CRF19_cpx en su genoma.

Se ha planteado la hipótesis de si la recombinación inter-subtipo puede dar lugar a cepas más patógenas si los fragmentos genómicos de diferentes subtipos se unen en un virus con mayor capacidad de replicación, pero no se ha encontrado ninguna prueba directa para este escenario, aunque los resultados de la presente investigación apuntan a robustecer esta hipótesis (187).

5.4 Mutaciones en la región V3 de la proteína de envoltura gp120 en las secuencias cubanas de VIH-1

Las proteínas de la envoltura del VIH-1 gp120 y gp41 son los blancos para los anticuerpos que inhiben la infectividad del virus, por lo que han sido utilizadas para el diseño de vacunas, no obstante, hasta ahora no se ha logrado ninguna vacuna efectiva frente al VIH. Las dificultades pueden ser en parte debidas a la extrema variación entre las diversas cepas de virus. El lazo V3 de la gp120 es uno de los componentes de la región de unión al receptor celular y es el principal determinante del uso del co-receptor (188). La longitud de esta región es de aproximadamente 34-35 aminoácidos y la variación entre las secuencias aminoacídicas es como promedio de un 20%. Se ha reportado que estas secuencias varían considerablemente entre las cepas virales y la variabilidad es más pronunciada en la corona del lazo V3 (aproximadamente 14 aminoácidos en el medio de V3). Es reconocida la importancia funcional de V3,

ya que una delección en esta región implica la pérdida de la infectividad viral (188).

Al estudiar las características de las secuencias de aminoácidos de la región V3 de la envoltura de VIH-1, se observaron muchas diferencias entre las 73 muestras analizadas, al comparar las mismas con la secuencia consenso del subtipo B (**Figura 7**). Al estimar la divergencia evolutiva entre las secuencias nucleotídicas de la región V3 estudiadas, se pudo observar que, como promedio, la distancia entre ellas fue de 9% (rango de 3 al 16%). La distancia aminoacídica detectada fue de 11%, con un rango de 0 a 40% entre las secuencias estudiadas, lo cual coincide con el 20% de variación entre las secuencias aminoacídicas que se reporta como promedio en la literatura, al analizar el lazo V3 (188), aunque hay secuencias que superaron este porcentaje.

Según el estudio titulado “Genotypic Prediction of Co-receptor Tropism of HIV-1 Subtypes A and C” (189) las herramientas actualmente disponibles están diseñadas sobre todo en base a cepas del subtipo B y por lo tanto, en general no son aplicables a subtipos no B. Sin embargo, las infecciones por VIH-1 causadas por el subtipo B sólo representan aproximadamente el 11% de las infecciones en todo el mundo. Este estudio, ha demostrado que los enfoques disponibles para la predicción del uso de los co-receptores no son tan eficaces en la determinación del tropismo de cepas de subtipo A. Los algoritmos de predicción funcionan bien en el subtipo B, en el que se desarrollaron, y también mostraron una alta precisión de predicción para el subtipo C. Sin embargo, en los subtipos A y las CRFs, los algoritmos existentes mostraron bajos rendimientos de predicción con una sensibilidad inferior al 20%. Ellos concluyen que existe la necesidad de desarrollar nuevos algoritmos que faciliten la predicción del tropismo del VIH-1 para el subtipo A, para mejorar el tratamiento antirretroviral eficaz (189).

Aún más, estudios recientes sobre los subtipos C, D, CRF01 y CRF02 (3-6) indican que las reglas podrían diferir, dependiendo del subtipo. Las distribuciones de los co-receptores entre los diferentes subtipos de VIH-1 también difieren considerablemente (190-193). La enfermedad progresa más rápidamente en pacientes con una infección de subtipo D, tal vez debido a la alta prevalencia de cepas con tropismo X4 y poblaciones de virus mixtos (172,

181), lo cual está en concordancia con los hallazgos reportados en el presente estudio, así como en otros estudios del virus CRF19_cpx de Cuba (194). Por lo tanto, es esencial predecir con exactitud el tropismo, tanto para el inicio de la terapia dirigida al co-receptor CCR5, como para los estudios de patogenia. El empleo de métodos fenotípicos, podría constituir una de las herramientas que permitirían confirmar el tropismo viral (194).

En la presente investigación, se observó alta concordancia, para las 43 muestras clasificadas como R5, con el programa de predicción del fenotipo viral a partir del genotipo (G2P), al compararlo con el análisis mediante el cálculo de la carga neta (40/43, 93%) y con la regla 11/25 (42/43, 97,7%). También se aprecia correspondencia parcial para las 13 muestras clasificadas como X4 con el programa G2P, al compararlo con el análisis mediante el cálculo de la carga neta (9/13, 69,2%) y con la regla simple 11/25 (6/13, 46,1%). Sin embargo, esta correlación falló al analizar las muestras con tropismo dual o R5X4 (FPR \geq 5% y $<$ 20%) ya que según la regla 11/25 todas se clasificaron como virus R5 y mediante la carga neta 15 de 17 fueron también consideradas como R5 (**Figura 7**).

Los estudios realizados con variantes del subtipo B han demostrado que la presencia de un aminoácido cargado positivamente en una o en las dos posiciones específicas del bucle V3 (posiciones 11 y 25) está fuertemente asociado con un fenotipo que usa CXCR4 en aislados primarios del subtipo B (136, 186), lo que sugiere que estos aminoácidos juegan un papel crucial en la interacción de gp120 con los co-receptores. De hecho, ha sido demostrado que las regiones V1/V2 y V3 están implicadas en la interacción con CCR5 y CXCR4 (195-197). En varios modelos del complejo de la glicoproteína de la envoltura gp41-gp120, V2 interactúa directamente con V3 y ambos participan en la unión al co-receptor (198-200). Como se muestra para subtipo B del VIH-1, el bucle V3 también parece ser el principal determinante genético en la elección del co-receptor en el subtipo-D y A (179). En estudios más recientes, las cepas del subtipo C que usaban el CXCR4 no muestran la misma dependencia que otros subtipos en los residuos cargados positivamente en el bucle V3 (201, 202). Algunos autores han construido sus propias reglas para predecir el uso de CXCR4 en cepas del subtipo D, como Raymond y col.,(203) en base a uno de

los siguientes criterios: (i) R (arginina) o K (lisina) en la posición 11 de la región hipervariable V3 de gp120, (ii) R en la posición 25 de V3 y una carga neta de 5, o (iii) una carga neta de 6.

La comparación de las secuencias aminoacídicas del lazo V3 entre las 73 muestras mostró diferencias significativas entre los diferentes subtipos. Los aminoácidos Histidina (H) o Treonina (T) en la posición 13 fueron mucho más frecuentes en el subtipo B (13/20) y en el CRF18_cpx (6/8), comparado con el CRF19_cpx (7/24) y el CRFs_BG (0/21) ($p=0,0001$). Por el contrario, la Arginina (R) fue más prevalente en esa posición en las FRs CRF19_cpx y CRFs_BG (16, cada uno), mientras que solo tres muestras del subtipo B y dos del CRF18_cpx tenían este aminoácido ($p=0,0001$).

La R en la posición 18 (14/20) se detectó con más frecuencia en el subtipo B comparado con las variantes no B (CRFs_BG (19/21), CRF18_cpx (7/8) y CRF19_cpx (16/24)), que en esta posición tenían principalmente glutamina (Q) ($p=0,0001$). Adicionalmente, los virus CRF19_cpx tenían Valina (V) en la posición 12 (21/24 muestras, 87,5%) y 19 (18/24 muestras, 75%) en contraste a la Isoleucina (I) y Alanina (A) detectada en estas posiciones, respectivamente, para casi todas las muestras de las otras variantes virales analizadas. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0001$).

Se identificaron aminoácidos característicos del CRF19_cpx en el lazo V3 (V12, R13, Q18, V19, 22G), los que fueron significativamente más frecuentes en esta variante viral, en comparación con el subtipo B. También los CRFs_BG 20-23-24 tenían estas mutaciones en las posiciones 13 y 18 en comparación con el subtipo B ($p < 0,0001$). Estos cambios coinciden con los hallazgos publicados recientemente en secuencias cubanas(158). Otros investigadores también han informado previamente la asociación entre algunas variantes virales y determinadas mutaciones del lazo V3. Zhang y cols. en el 2014 encontraron que la posición mutación E25R/Q/N fue la más frecuente entre los subtipos C, B y CRF07_BC. (204).

Con el fin de proporcionar una mejor caracterización genotípica, sería interesante estudiar la presencia de otros polimorfismos específicos del CRF19_cpx en otros segmentos de gp120.

| Posición en gp120 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | SUBTIPO CV3 | FPR G2P | TROPISMO G2P | REGIA 11/25 | CARGA META | |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|-------------|-----------|--------------|-------------|------------|---|
| Posición lazo V3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | | | | | |
| Secuencia consenso B | C | T | R | P | N | N | T | R | R | K | X | I | X | I | | | G | P | G | R | A | F | Y | X | T | G | X | I | I | G | X | I | R | Q | A | H | C | | | | | |
| Subtipo B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HXB2 (cepa referencia) | | | | | | | | | | | R | | R | | Q | R | | | | | | | V | T | I | | K | | | N | M | | | | | | B | | X4 | X4 | 8 | |
| CU2302_15 | | | | | | | | | | | S | | H | M | | | | | | | K | V | | A | E | G | | | D | | K | | | | | | B | 1.7 | X4 | R5 | 4 | |
| CU1007_16 | | | | | | | | | | | S | | S | M | | | | | | | | | V | T | | | E | | | D | | | | | | | B | 9 | RSX4 | R5 | 4 | |
| CU1274_16 | | | | | | | | | | | R | S | V | T | | | | | | | | | | T | | | E/G | | | N | | | | | | | B | 22.4 | R5 | R5 | 4 | |
| CU1498_16 | | | | | | | | | | | R | S | H | | | | | | | | | | | A/G | | | D | | | D | | | | | | | B | 30.1 | R5 | R5 | 3 | |
| CU1684_16 | | | | | | | | | | | Q | S | P/S | | | | | | | | K | | | A | | D | | | D | | | | | | | | B | 95.5 | R5 | R5 | 2 | |
| CU1823_16 | | | | | G | | | | | | G | | H | | | | | | | | | | F | A | S | Q | Q | | | D | | | | | | | B | 21.4 | R5 | R5 | 4 | |
| CU2033_16 | | | | | | | | | | | R | R | T | T/M | | | | | | | | | | T | | K/R | V | | N | | K/R | R | | | | | B | 1.5 | X4 | X4 | 8 | |
| CU2034_16 | | | | | | | | | | | R | G | R | | | | | | | | | | V | A | | | K | | | D | | | | | | | B | 21.5 | R5 | X4 | 6 | |
| CU2036_16 | | | | | | | | | | | S | | H | | | | | | | | | | | T | | | E | | | D | | | | | | | B | 24.7 | R5 | R5 | 3 | |
| CU2098_16 | | | | | | S | | | | | R | S | P | | | | | | | | G | I | | T | | D | | | D | | | | | | | | B | 53.9 | R5 | R5 | 2 | |
| CU2239_16 | | | | | | | | | | | Q | S | L | R | | | | | | | S | I/L | | T | | N | | | D | | | R | | | | B | 1.7 | X4 | R5 | 4 | | |
| CU2452_16 | | | | | | | | | | | T | S | P | M | | | | | | | | | V | L | | S | | | D | | | | | | | | B | 94.6 | R5 | R5 | 2 | |
| CU2455_16 | | | | | | | | | | | R | | T | M | | | | R | A/G | | | | V | L | K/T | A/G | E | | | R/I/G | D | | | K | H/D | | B | 1.1 | X4 | X4 | 8 | |
| CU2608_16 | | | | | | | | | | | S | | Q | M | | | | | | | | | | F | A | | D | | | D | | | | | | | B | 87.8 | R5 | R5 | 3 | |
| CU2676_16 | | | | | | | | | | | S | V | H | | | | | | | | | | L | T | | | D | | | D | | | | | | | B | 21 | R5 | R5 | 4 | |
| CU2804_16 | | | | | | | | | | | G | | H | | | | | | | | | | | T | | E | | | D | | | | | | | | B | 20.7 | R5 | R5 | 3 | |
| CU2806_16 | | | | | | | | | | | S | | H | M | | | | | | | K | | | A | | D | | | D | | | | | | | | B | 55.3 | R5 | R5 | 3 | |
| CU2807_16 | | | | | | | | | | | S | | H | M | | | | | | | | | | A | | D | | | D | | | | | | | | B | 49.7 | R5 | R5 | 3 | |
| CU2929_16 | | | | | | | | | | | R | V | T | F | | | | | | | | | V | W | T | | Q | | | D | | | | | | | B | 1.1 | X4 | X4 | 5 | |
| CU2929_16 | | | | | | | | | | | S | | T | | | | | | | | K | | W | | A | | E | | | L | | | | | | Y | B | 15.4 | RSX4 | R5 | 3 | |
| CRF19_cpx | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CU1528_15 | | | | | | | | | | | S | V | S/R | | | | | | | | | V | Y | A | | D/A | | | D | | | | | | | | CRF19_cpx | 6.7 | RSX4 | R5 | 5 | |
| CU2171_15 | | | | | | | | | | | S | V | R | | G | E | S | D | A | | Q | | | H/Y | A | | D/A | | | N | | | | | | | CRF19_cpx | 1.7 | X4 | R5 | 1 | |
| CU2303_15 | | | | | S | | | | | | S | A | R | | G | I | | R | G | | Q | V | | A | D | K | | | D | | | K | Y | | | CRF19_cpx | 0 | X4 | X4 | 7 | | |
| CU2304_15 | | | | | | | | | | | Q | G | V | H | | | | | | | | Q | V | | R | | D | | | D | | | | | | | CRF19_cpx | 94.6 | R5 | R5 | 1 | |
| CU2647_15 | | | | | | | | | | | Q | S | V | R | | | | | | | | A | V | | R | | E | | | D | | | R | H/Y | | | CRF19_cpx | 6.3 | RSX4 | R5 | 4 | |
| CU3949_15 | | | | | | | | | | | S | V | H/R | | | | | | | | | Q | V | | A | | E | | | D | | | | | | | CRF19_cpx | 67.33 | R5 | R5 | 3 | |
| CU213_16 | | | | | | | | | | | S/G | V | H | L | | | | | | | | | Q | A | | E | | | D | | | K | Y | | | CRF19_cpx | 5 | X4 | R5 | 4 | | |
| CU821_16 | | | | | | | | | | | T | S | V | R | | | | | | | | Q | V | | G | | R | | | D | | | R | Y | | | CRF19_cpx | 5 | X4 | X4 | 5 | |
| CU935_16 | | | | | | | | | | | S | V | R | | | | | | | | | Q | V | Y | A | | D | | | N | | | H/Y | | | CRF19_cpx | 16.9 | RSX4 | R5 | 4 | | |
| CU1394_16 | | | | | | | | | | | R | I | | | | | | | | | | Q | V | | A | | D | | | D | | | | | | | CRF19_cpx | 22.1 | R5 | R5 | 3 | |
| CU1495_16 | | | | | | | | | | | T | S | E | H | | | | | | | | | F | Q | R | E | | | D | | | | K | Y | | | CRF19_cpx | 2.7 | X4 | R5 | 5 | |
| CU1683_16 | | | | | | | | | | | E | S | V | S | | | | | | | | A | | | R | | E/D | | | D | | | R | | | | CRF19_cpx | 43.3 | R5 | R5 | 2 | |
| CU1685_16 | | | | | | | | | | | S | V | R | | | | | | | | | Q | V | | A | | D | | | D | | | | | | | CRF19_cpx | 30.1 | R5 | R5 | 3 | |
| CU1760_16 | | | | | | | | | | | Q | S | V | R | | | | | | | | Q | V | | A | | A | | | N | | | | | | | CRF19_cpx | 63.4 | R5 | R5 | 4 | |
| CU1761_16 | | | | | | | | | | | Q | S | V | R | | | | | | | | Q | V | | A | | A | | | N | | | | | | | CRF19_cpx | 63.4 | R5 | R5 | 4 | |
| CU2135_16 | | | | | | | | | | | T | G | V | R | | | | | | | | Q | V | | T | | N | | | D | | | | | | | CRF19_cpx | 8.5 | RSX4 | R5 | 3 | |
| CU2241_16 | | | | | | | | | | | E | G | V | H | | | | | | | | | Q | V | | R | R | D | | | D | | | | | | | CRF19_cpx | 20.1 | RSX4 | R5 | 3 |
| CU2281_16 | | | | | | | | | | | R | G | V | H | | | | | | | | | Q | V | | R | T/R | D | | | D | | | | | | | CRF19_cpx | 34.9 | R5 | R5 | 3 |
| CU2451_16 | | | | | | | | | | | S/G | V | R | | | | | | | | | K | V | | T | | N | | I/V | D | | | K | H/Y | | | CRF19_cpx | 9.6 | RSX4 | R5 | 6 | |
| CU2677_16 | | | | | | | | | | | E | S | V | R | | | | | | | | | Q | V | | A | R | D | | | T/I | N/V | | | | | CRF19_cpx | 7.8 | RSX4 | R5 | 4 | |
| CU2980_16 | | | | | | | | | | | S | V | R | | | | | | | | | | Q | V | | A | | D | | | N | | | | | | | CRF19_cpx | 36.4 | R5 | R5 | 4 |
| CU3571_16 | | | | | | | | | | | T | S | V | R | | | | | | | | Q | I/V | | N | | D | | | D | | | | | | | | CRF19_cpx | 17.4 | RSX4 | R5 | 2 |
| CU3866_16 | | | | | | | | | | | G | V | H | | | | | | | | | | | T | | E | | | D | | | | K | Y | | | CRF19_cpx | 11.4 | RSX4 | R5 | 4 | |
| CU3915_16 | | | | | | | | | | | R | V | Y | | | | | | | | | M | | | R | D | A | | | V | T/I | D | | | | | Y | CRF19_cpx | 2.6 | X4 | X4 | 5 |
| CRFs_BG (20, 23, 24) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CU751_15 | | | | | | | | | | | S | | S | F | | | | | | | | Q | | | A | | D | | | D | | | | | | | CRF_BG | 79.2 | R5 | R5 | 2 | |
| CU1527_15 | | | | | | | | | | | S | | R | | | | | | | | | Q | | | A | | D | | | D | | | K | Q | | | CRF_BG | 32.1 | R5 | R5 | 3 | |
| CU2297_15 | | | | | | | | | | | R | S | R/S | F | | | | | | | | Q | | | T | | E | | | D | | | | | | | CRF_BG | 55.4 | R5 | R5 | 3 | |
| CU2299_15 | | | | | | | | | | | R | S | R | | | | | | | | | Q | | | H | A | | A | | M | | N | P | K | | | F | CRF_BG | 26.5 | R5 | R5 | 5 |
| CU887_16 | | | | | | | | | | | S | | R/S | I/F | | | | | | | | Q | | I/F | A | | E | | | D | | | | | | | F | CRF_BG | 12.5 | RSX4 | R5 | 3 |
| CU927_16 | | | | | | | | | | | S | | S | F | | | | | | | | A | | Q | | A | | E | | V | | D | | | | | Y | CRF_BG | 90.9 | R5 | R5 | 2 |
| CU1104_16 | | | | | | | | | | | S | V | S | L | | | | | | | | Q | T | | A | | D | | | D | | | | | | | F | CRF_BG | 92.9 | R5 | R5 | 2 |
| CU1393_16 | | | | | | | | | | | R | S | R | | | | | | | | | Q | | | A | | D/A | | | T/I | D | | | | | | Y | CRF_BG | 51.3 | R5 | R5 | 3 |
| CU1441_16 | | | | | | </ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Se observó que, en la punta del bucle V3 de los subtipos No-B del presente estudio, fue más prevalente la secuencia aminoacídica GPGQ (79,2%, 42/53 muestras, $p < 0,0001$), mientras que en los subtipos B predominó el motivo GPGR (70%, 14/20 muestras). Un estudio publicado en el 2010 (205) sobre la variabilidad del bucle V3 comenta que la secuencia aminoacídica GPGR es frecuentemente encontrada en el subtipo B del VIH-1, mientras que la GPGQ predomina entre todas las demás cepas del VIH-1 (206), lo cual coincide con los hallazgos del presente estudio. Este estudio trata de establecer una comparación entre secuencias del lazo V3 de pacientes franceses y brasileños y ellos encuentran que el motivo GPGR fue predominante en pacientes franceses y fue menos frecuente en pacientes brasileños, los que mostraron una mayor diversidad en la punta del bucle V3. Ellos además comentan que se ha identificado una variante del subtipo B (B-Br) con el motivo GWGR en una alta proporción de pacientes infectados con el subtipo B en Brasil y esta variante ha sido reconocida como predominante en varios estudios (207, 208).

5.5 Mutaciones asociadas a cambio de tropismo y resistencia a MVC

A pesar de que la resistencia a MVC se encuentra asociada con una gran variedad de cambios aminoacídicos tanto en la gp120 como en la gp41, los cambios en el lazo V3 se han identificado como los principales contribuyentes al fenotipo de resistencia a casi todos los agonistas y antagonistas de CCR5 (209).

Al analizar las secuencias del lazo V3 de las 73 muestras estudiadas, pudimos observar alguna mutación asociada a resistencia a MVC en 44 de ellas (60,3%, Figuras 7 y 8). Se detectaron mutaciones en las posiciones 11, 13, 25, 316, 323 y 319, las cuales han sido publicadas en la literatura como las más frecuentes, asociadas a resistencia a MVC (105). Las mutaciones en las posiciones 11 (11R) y 25 (25K/R) del lazo V3 que implican, además de resistencia al MVC, cambio de tropismo R5 a X4, se detectaron solo en el 5,5 (4/73) y 6,8% (5/73) de las muestras, respectivamente. Sin embargo, la mutación P13R, estuvo presente en el 50,7% de las secuencias (37/73), siendo la misma más frecuente en las variantes CRF_19 cpx y recombinantes BGs. Teniendo en

cuenta que esta cifra es muy elevada, especialmente para los pacientes de este estudio, que no han recibido terapia con MVC, habría que explorar si realmente se trata de una mutación de resistencia natural a esta droga ó si está relacionada con un polimorfismo de estas variantes genética. Las mutaciones A316T, I323V y A319S, se detectaron en el 5,5%, 8,2% y 5,5%, respectivamente, y generalmente estuvieron presentes en los virus recombinantes BGs (Figuras 7 y 8).

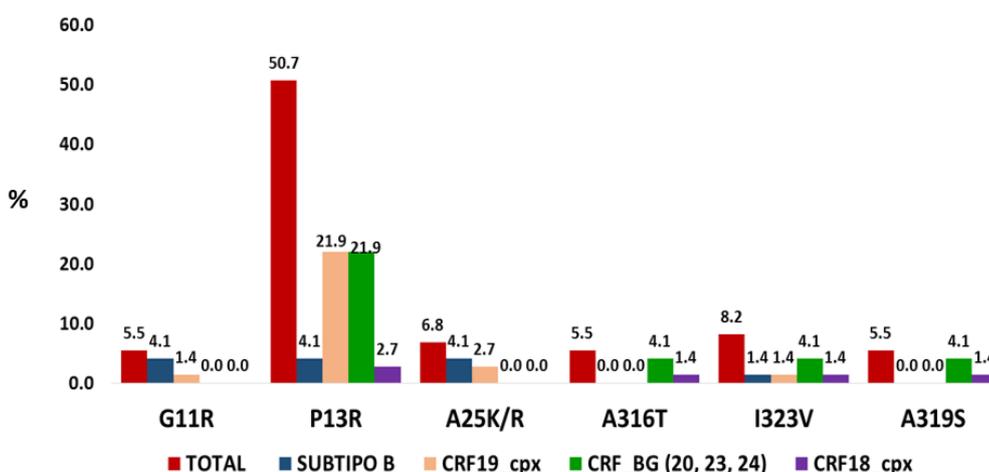


Figura 8. Mutaciones asociadas al cambio de tropismo y resistencia al Maraviroc en los pacientes estudiados

Hasta la actualidad, no se han determinado con exactitud los patrones de mutaciones que predicen resistencia a los antagonistas de CCR5. Existen muy pocas mutaciones específicas que se han observado más de una vez en cepas de VIH resistentes al MVC, sugiriendo que cada gen *env* de VIH puede proveer una vía genética diferente para el desarrollo de resistencia a los antagonistas de los co-receptores. Estudios *in vitro* han demostrado que las mutaciones en el bucle V3 de gp120 por lo general no confieren resistencia completa a MVC (105), sino que se necesita la cooperación de varias mutaciones. Aún queda por definir exactamente si estas mutaciones realmente confieren resistencia o si en algunos casos solo son polimorfismos (209).

Se ha sugerido que las mutaciones que ocurren naturalmente a MVC podrían ser más comunes en el subtipo C que en el subtipo B (210). El análisis de 65 muestras mostró que el 52,3% (75% del subtipo C y 18,2% del subtipo B)

presentaban al menos una mutación asociada con la resistencia a MVC. Una mutación comúnmente observada fue A316T en la región gp120, ocurriendo en 67,8%. La mutación I323V en la región gp120 ocurrió en el 7,14% del subtipo C y no se observó en los subtipos B (210).

Asimismo, hay otras regiones de la gp120, fuera del lazo V3 que juegan un papel importante en la resistencia a los antagonistas de CCR5 y que no fueron abordadas en la presente investigación, ya que solo se pudo secuenciar la región C2-V3 de la gp 120 (211), sugieren que las mutaciones en el bucle V4 de VIH-1 pueden contribuir a la resistencia a MVC y Vicriviroc sola o combinada con mutaciones en los bucles V2 y V3. Las mutaciones L317W/I408T y V169M/L317W/I408T tuvieron el mayor impacto en la susceptibilidad al MVC, principalmente debido a la presencia de la mutación I408T en V4. Esta mutación podría disminuir la energía de activación necesaria para permitir a la gp41 someterse a los cambios conformacionales próximos y adquirir un estado más estable de baja energía. (211)

Se necesitan más estudios en otras variantes virales, para ver si las variaciones en sitios específicos de V3 y otras regiones variables de la envoltura viral pueden influir en la infectividad del virus, escape del sistema inmune y resistencia al MVC.

5.6 Relación entre variables epidemiológicas, clínicas, inmunológicas y de carga viral, con el tropismo viral y el subtipo de VIH-1

Los pacientes que presentaban virus con tropismo CCR5 se encontraban principalmente en las edades entre 15 a 45 años (73,9%) (**Tabla 8**), un poco más de la mitad (59,5%) eran HSH, el 50% aún no habían sido clasificados como sida, por lo que tener virus R5 fue más frecuente en los pacientes que no tenían sida, comparado con los que sí lo tenían ($p=0,02$, OR: 6,250, IC: 1,852-21,096).

Los virus R5 predominan en la etapa más temprana de la infección (102) por lo que es de esperar que estos virus se encuentren entre individuos de menor edad, que posiblemente llevan poco tiempo de infectados, coincidiendo con lo encontrado en el presente estudio.

Por otro lado, la menor edad detectada entre los pacientes infectados con virus R5 también se justifica con lo planteado por Kuritzkes D., en el capítulo de patogenia de la infección por VIH, donde se expresa que la edad al momento de la infección es un factor de riesgo independiente para la progresión de la enfermedad y que las personas de mayor edad tienen mayor riesgo, de progresar a sida, tal vez como consecuencia de la disminución de la reserva celular proveniente del timo (reserva tímica) (212). De acuerdo datos de 22 estudios de cohortes de Europa, Canadá y Australia, en ausencia de una combinación de antirretrovirales, el riesgo de progresar a sida en 6 meses para un paciente de 25 años de edad con un recuento de células CD4 de $350/\text{mm}^3$ oscila entre 0,6%, para una CV de 3000 copias/mL, a 2,5%, si la CV es de 300.000 copias/mL(212). Sin embargo para un recuento de CD4 de 100 células/ mm^3 , el riesgo de progresión a sida, con la misma CV, aumenta a 3,7% y 14,5%, respectivamente(212).

Usualmente, se define que los virus R5 tienen una baja capacidad replicativa con velocidad de replicación lenta (conocidos como slow/low), con valores de CV bajos (102) y no son inductores de sincitios. Estos virus predominan en la etapa más temprana de la infección y se han asociado con una progresión lenta a sida, lo que coincide con lo observado en el presente estudio, donde los que individuos infectados con este tipo de virus tenían conteos de CD4 por encima de 200 células/mL y no tenían sida.

Como se observa en la Tabla 8, los virus con tropismo dual se encontraron principalmente en pacientes con edades comprendidas entre los 30 y los 60 años y que eran HSH (76,5%). El 35,3% tenían entre 5 y 10 años de diagnóstico de VIH y el 41,2% más de 10 años diagnosticados con esta infección. Asimismo, el 16,7% de los pacientes infectados con virus T trópicos o X4 tenían más de 60 años de edad, siendo la diferencia significativa al compararla con los pacientes de los otros grupos ($p=0,027$, OR: 1,200, IC: 1,0-1,546). El 91,7% eran HSH y el 75% además habían sido diagnosticados con VIH hacía más de 10 años ($p=0,012$, OR: 5,429, IC: 1,324-22,261). Se encontró además, asociación significativa entre tener virus X4 y presentar sida al momento de la toma de la muestra para el estudio ($p=0,032$, OR: 7,543, IC: 1,0-62,34).

Al analizar de manera conjunta los virus que usan el co-receptor CXCR4 (tanto con tropismo dual o X4) se observó que estar infectado con un virus R5X4 o X4, al momento del estudio, era más frecuente entre pacientes con más de 10 años de diagnóstico de la infección por VIH (16/29 pacientes, $p=0,056$, OR: 2,462, IC: 1,0-6,5). Además fue 6 veces más probable tener sida ($p=0,002$, OR: 6,250, IC: 1,852-21,096) y conteos de CD4 menor de 200 células/mL ($p=0,003$, OR: 4,444, IC: 1,610-12,265) en aquellos pacientes infectados con virus R5X4 o X4.

Se ha reportado que los virus que utilizan el co-receptor CXCR4 (virus X4 o R5X4) se diferencian de los virus R5 en que ellos infectan células T con una velocidad de replicación rápida y tienen alta capacidad replicativa (conocidos como rapid/high), emergiendo en una etapa más tardía de la infección, después de varios años de infección con VIH y además se asocian con una progresión rápida a sida(102). Esto coincide con las características observadas en los virus duales y X4 secuenciados en el presente estudio, ya que se presentaron con mayor frecuencia entre los individuos de mayor edad, que tenían más de 10 años de diagnosticados y que se encontraban en estadio sida.

Xiaoshan Li. Y col.,(161) hallaron asociación entre el tropismo de CXCR4 y menores recuentos de CD4. Sin embargo, a diferencia de los resultados de la presente investigación, el estudio realizado en China reveló cepas de la CRF01_AE, con una alta frecuencia de tropismo X4, que son prevalentes en la población de jóvenes HSH de ese país, lo que podría causar una pérdida severa del recuento de linfocitos T CD4 y una progresión rápida de la enfermedad (161). Las observaciones del análisis de los clúster de transmisión contradicen la hipótesis de que los virus R5 se seleccionan en la transmisión y apoyan la idea de que las infecciones R5 o X4/dual resultan de un proceso estocástico.(213)

Tabla 8. Comparación de las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes estudiados, con la predicción del fenotipo y el subtipo de VIH-1

| Datos de los pacientes | Predicción del Fenotipo viral | | | | | | Subtipo Viral en región C2V3 env | | | | | | | |
|--|-------------------------------|------|------|------|-----|------|----------------------------------|------|----|------|---------------------|------|-------------|------|
| | R5 | % | R5X4 | % | X4 | % | CRF 19_cp x | % | B | % | CRF_B G (20, 23,24) | % | CRF 18_cp x | % |
| | 42* | 100 | 17 | 100 | 12* | 100 | 23* | 100 | 20 | 100 | 20* | 100 | 8 | 100 |
| Rango de Edad | | | | | | | | | | | | | | |
| <15 | 2 | 4,8 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 5,0 | 1 | 12,5 |
| 15-30 | 13 | 31,0 | 4 | 23,5 | 0 | 0,0 | 9 | 39,1 | 3 | 15,0 | 5 | 25,0 | 0 | 0,0 |
| >30-45 | 18 | 42,9 | 7 | 41,2 | 5 | 41,7 | 7 | 30,4 | 9 | 45,0 | 10 | 50,0 | 4 | 50,0 |
| >45-60 | 9 | 21,4 | 6 | 35,3 | 5 | 41,7 | 5 | 21,7 | 8 | 40,0 | 4 | 20,0 | 3 | 37,5 |
| >60 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 16,7 | 2 | 8,7 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Región de Residencia | | | | | | | | | | | | | | |
| La Habana | 26 | 61,9 | 11 | 64,7 | 10 | 83,3 | 15 | 65,2 | 13 | 65,0 | 13 | 65,0 | 6 | 75,0 |
| Oeste (excluida Habana) | 8 | 19,0 | 3 | 17,6 | 0 | 0,0 | 3 | 13,0 | 4 | 20,0 | 4 | 20,0 | 0 | 0,0 |
| Centro | 5 | 11,9 | 2 | 11,8 | 1 | 8,3 | 3 | 13,0 | 2 | 10,0 | 2 | 10,0 | 1 | 12,5 |
| Este | 3 | 7,1 | 1 | 5,9 | 1 | 8,3 | 2 | 8,7 | 1 | 5,0 | 1 | 5,0 | 1 | 12,5 |
| Sexo Masculino | 30 | 71,4 | 13 | 76,5 | 11 | 91,7 | 14 | 60,9 | 14 | 70,0 | 17 | 85,0 | 7 | 87,5 |
| Orientación sexual HSH | 25 | 59,5 | 13 | 76,5 | 11 | 91,7 | 13 | 56,5 | 14 | 70,0 | 15 | 75,0 | 6 | 75,0 |
| Años de Diagnóstico de VIH | | | | | | | | | | | | | | |
| ≤1 año | 7 | 16,7 | 2 | 11,8 | 0 | 0,0 | 4 | 17,4 | 1 | 5,0 | 4 | 20,0 | 0 | 0,0 |
| >1-3 años | 6 | 14,3 | 2 | 11,8 | 1 | 8,3 | 4 | 17,4 | 2 | 10,0 | 3 | 15,0 | 0 | 0,0 |
| >3-5 años | 3 | 7,1 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 5,0 | 2 | 10,0 | 0 | 0,0 |
| >5-10 años | 12 | 28,6 | 6 | 35,3 | 2 | 16,7 | 5 | 21,7 | 8 | 40,0 | 5 | 25,0 | 2 | 25,0 |
| >10 años | 14 | 33,3 | 7 | 41,2 | 9 | 75,0 | 10 | 43,5 | 8 | 40,0 | 6 | 30,0 | 6 | 75,0 |
| Tratado con ARV | 40 | 95,2 | 17 | 100 | 12 | 100 | 22 | 95,7 | 20 | 100 | 19 | 95,0 | 8 | 100 |
| SIDA al diagnóstico de VIH | 4 | 9,5 | 2 | 11,8 | 2 | 16,7 | 2 | 8,7 | 3 | 15,0 | 2 | 10,0 | 1 | 12,5 |
| SIDA actual | 21 | 50,0 | 14 | 82,4 | 11 | 91,7 | 14 | 60,9 | 13 | 65,0 | 13 | 65,0 | 6 | 75,0 |
| Evolución a SIDA después del diagnóstico de VIH | | | | | | | | | | | | | | |
| ≤ 1 año | 10 | 23,8 | 5 | 29,4 | 4 | 33,3 | 6 | 26,1 | 6 | 30,0 | 5 | 25,0 | 2 | 25,0 |
| 1-3 años | 3 | 7,1 | 3 | 17,6 | 2 | 16,7 | 1 | 4,3 | 2 | 10,0 | 4 | 20,0 | 1 | 12,5 |
| >3 años | 8 | 19,0 | 6 | 35,3 | 5 | 41,7 | 7 | 30,4 | 5 | 25,0 | 4 | 20,0 | 3 | 37,5 |
| No sida | 21 | 50,0 | 3 | 17,6 | 1 | 8,3 | 9 | 39,1 | 7 | 35,0 | 7 | 35,0 | 2 | 25,0 |

*Para este análisis se excluyó un paciente de este grupo, ya que tenía incompleta la información clínico-epidemiológica.

La prevalencia de las variantes de X4 aumenta con la disminución del recuento de células CD4 y varios estudios muestran un riesgo significativamente mayor de progresión de la enfermedad entre los pacientes con virus X4 (IS) (212). Un estudio con macacos infectados con un virus quimérico (SIV/HIV quimérico) que expresa en la envoltura de VIH-1, virus con tropismo CXCR4, muestra un rápido agotamiento de células TCD4, lo que sugiere una función causal de los virus X4 en la rápida progresión de la enfermedad(212). El largo intervalo entre la infección y la aparición de los virus X4, en la mayoría de los pacientes, aboga por una fuerte selección de éstos virus al comienzo del curso de la enfermedad por VIH. Por lo tanto, la posibilidad de que las variantes X4 son una consecuencia, más que una causa, de avanzar a la inmunodeficiencia sigue siendo una explicación plausible para la asociación del virus X4 con la progresión de la enfermedad. El desarrollo de antagonistas de los receptores de quimiocinas como una nueva clase de agentes antirretrovirales puede proporcionar nuevas herramientas para abordar esta importante cuestión de la patogénesis (212).

En la presente investigación (**Tabla 8**), el virus CRF19_cpx se asoció con infección en individuos jóvenes (39,1% entre los 15 y 30 años) ($p=0,025$, OR: 3,548 IC: 1,136-11,077). No se encontró ninguna otra característica clínico-epidemiológica asociada este virus o a otro subtipo de VIH-1. En otros estudios cubanos este grupo etario se ha asociado con la infección reciente por VIH y es en este grupo donde se observa la mayor incidencia de la infección por VIH en la epidemia cubana. Esto nos hace pensar en un incremento en la incidencia de esta forma genética de VIH (el CRF19_cpx) en la población recién infectada con VIH en Cuba (19). En otro estudio, sin embargo, se encontró esta variante viral más prevalente en la región central de Cuba, lo que no se ha observado en estudios posteriores (23).

Hay otros factores, no abordados en la presente investigación, que también modulan el cambio de tropismo viral R5 a dual y X4 y con la progresión más rápida de la enfermedad. Dentro de ellos se describen los factores genéticos del hospedero. Entre los más importantes están los polimorfismos en los genes que codifican los co-receptores de quimiocinas y sus ligandos y en los genes HLA. Aproximadamente el 10% de los individuos caucásicos llevan un alelo

defectuoso que tiene una supresión de 32 bases en el gen CCR5 (también conocida como deleción 32). El 1% de las personas son homocigóticos para esta deleción y resistentes a la infección por virus R5(212). Los individuos infectados que son heterocigotos para el alelo CCR5 se pueden infectar con VIH pero tienen una progresión más lenta de la enfermedad que aquellos con el alelo de tipo salvaje (212). Este efecto es limitado a los pacientes con cepas R5 de VIH-1, porque los virus inductores de sincitio utilizan el receptor CXCR4 (212). También se ha descrito que la mutación en el gen CCR2 (otro de los co-receptores utilizados por el virus) reduce asimismo la tasa de progresión de la enfermedad (212), posiblemente retrasando la aparición del virus X4. Por el contrario, las mutaciones en el promotor de la región del CCR5 (CCR5 P1) se asocian con la aceleración en la progresión de la enfermedad (212).

Al analizar los valores de CV y de CD4, divididos por rangos (**Tabla 9, Figura 7**), observamos que los pacientes que presentaban virus con tropismo CCR5 (virus R5) exhibían valores relativamente bajos de CV (entre 1000 y 10000 copias/mL) comparado con los otros virus ($p=0,024$, OR: 5,4, IC: 1,107 -26,339), así como conteos de CD4 por encima de 200 células/mL, específicamente entre 200 y 350 células/mL ($p=0,025$, OR: 3,846, IC: 1,129-13,1). Por el contrario, el 64,7% de los virus R5X4 mostraron valores altos de CV, siendo cinco veces más probable que los virus con tropismo dual tuvieran valores de CV por encima de 10^5 copias /mL ($p=0,004$, OR: 5,238, IC: 1,632-16,812), comparado con los otros virus. Adicionalmente, el 76,5% de los pacientes infectados con estos virus presentaban conteos de CD4 por debajo de 200 células/mL ($p=0,007$, OR: 5,107, IC: 1,468-17,774). El 75% de los virus con tropismo X4 exhibían valores de CV entre 10^4 y 10^5 copias/mL por lo que este tipo de virus también se asoció con valores de CV por encima de 10^4 copias/mL ($p=0,016$, OR: 5,045, IC: 1,233-20,649).

Tabla 9. Distribución de los rangos de carga viral y de los conteos de CD4 de los pacientes estudiados y la relación con la predicción del fenotipo y el subtipo de VIH-1

| | Predicción del Fenotipo viral | | | | | | Subtipo Viral en región C2V3 env | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|------|------|------|-----|------|----------------------------------|------|----|------|---------------------|------|------------|------|--|
| | R5 | % | R5X4 | % | X4 | % | CRF 19_cpx | % | B | % | CRFs_BG (20, 23,24) | % | CRF 18_cpx | % | |
| | 42* | 100 | 17 | 100 | 12* | 100 | 23* | 100 | 20 | 100 | 20* | 100 | 8 | 100 | |
| Carga viral (copias/mL) | | | | | | | | | | | | | | | |
| <1000 | 1 | 2,4 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 5,0 | 0 | 0,0 | |
| >1000-10000 | 12 | 28,6 | 1 | 5,9 | 1 | 8,3 | 4 | 17,4 | 3 | 15,0 | 6 | 30,0 | 1 | 12,5 | |
| >10000-100000 | 17 | 40,5 | 5 | 29,4 | 9 | 75,0 | 12 | 52,2 | 9 | 45,0 | 6 | 30,0 | 4 | 50,0 | |
| >100000 | 12 | 28,6 | 11 | 64,7 | 2 | 16,7 | 7 | 30,4 | 8 | 40,0 | 7 | 35,0 | 3 | 37,5 | |
| Conteo de CD4 (células/mL) | | | | | | | | | | | | | | | |
| <200 | 14 | 33,3 | 13 | 76,5 | 7 | 58,3 | 11 | 47,8 | 8 | 40,0 | 11 | 55,0 | 4 | 50,0 | |
| 200-350 | 16 | 38,1 | 0 | 0,0 | 4 | 33,3 | 8 | 36,4 | 6 | 30,0 | 4 | 19,0 | 2 | 25,0 | |
| >350-500 | 8 | 19,0 | 2 | 11,8 | 1 | 8,3 | 2 | 9,1 | 5 | 25,0 | 2 | 9,5 | 2 | 25,0 | |
| >500 | 4 | 9,5 | 2 | 11,8 | 0 | 0,0 | 2 | 9,1 | 1 | 5,0 | 3 | 14,3 | 0 | 0,0 | |

*Para este análisis se excluyó un paciente de este grupo que tenía incompleta la información clínico-epidemiológica

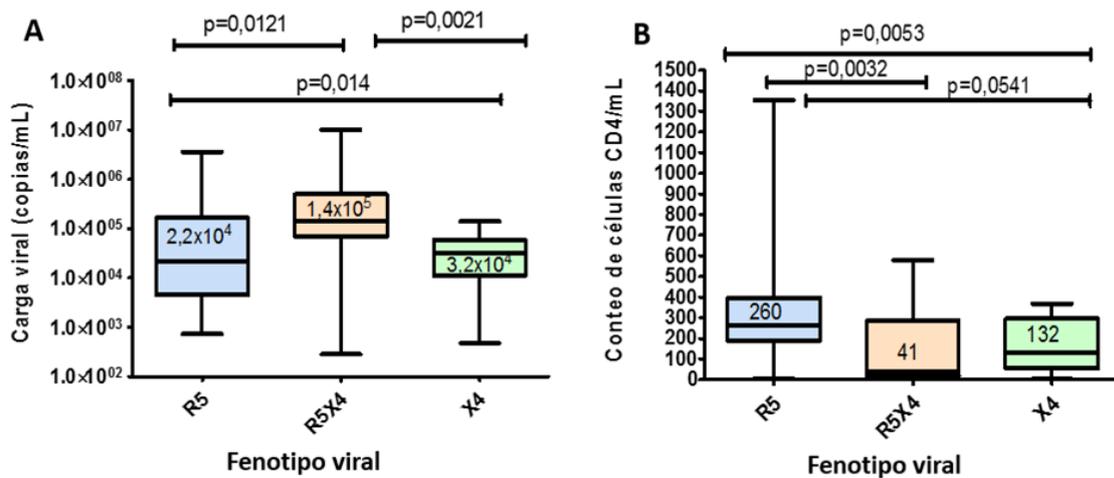


Figura 9. Comparación de los valores de carga viral y del conteo de CD4 según la predicción del fenotipo viral en las muestras estudiadas

Las variaciones de los recuentos de células T CD4 + en el tiempo se considera un predictor central de la progresión de la enfermedad, la muerte y el inicio del tratamiento (214, 215), y es utilizado por OMS para definir estadificación de la enfermedad (216).

Aunque la replicación del virus, y por consiguiente la CV es el motor que impulsa la progresión a sida, el recuento de células CD4 es el marcador más útil para predecir el riesgo inmediato de desarrollar determinadas infecciones oportunistas (217).

Como se ha descrito previamente en la discusión de los resultado de la presente investigación, los virus R5 se tienen baja capacidad replicativa y por tanto se asocian a bajos niveles de CV y mayores conteos de células CD4, lo contrario se refiere para los virus R5X4 o X4, que tienen mayor capacidad replicativa, son inductores de sincitios y por tanto exhiben mayores niveles de CV y bajos conteos de células TCD4, lo que coincide con los hallazgos mostrados en este estudio(218).

Otros estudios previos de China (Xiaoshan Li. Y col.) y Cuba hallaron también la asociación entre el tropismo de CXCR4 y menores recuentos de CD4 (26).

Como se observa en la Figura 10A, las medianas de la CV fueron diferentes entre los virus con diferente tropismo o fenotipo viral ($p=0,014$), Particularmente, los virus con tropismo dual mostraron los mayores valores de CV (mediana $1,4 \times 10^5$ copias/mL), comparado con los otros tipos de virus, seguido por los

virus X4 ($3,2 \times 10^4$ copias/mL). Se encontraron valores de CV significativamente mayores entre los virus R5X4 comparado con los otros virus ($p=0,0121$ entre R5X4 vs R5 y $p=0,0021$ entre R5X4 vs X4). De igual manera, los conteos de CD4 también fueron diferentes entre los pacientes infectados con los tres tipos de virus, clasificados según el uso del co-receptor ($p=0,0053$), siendo los conteos significativamente superiores entre los pacientes infectados con virus de tipo R5 (mediana de 260 células/mL), comparado con los pacientes infectados con virus R5X4 o X4 que mostraron medianas de 41 y 132 células/mL, respectivamente (**Figura 10B**).

En un gran estudio de cohortes en Londres, los sujetos con VIH (cepa dual/mixto o X4) tuvieron disminuciones más rápidas en el recuento de células T CD4 + que aquellos con R5 en ausencia de TARVAE. Sin embargo, el recuento de células T CD4 + aumentó, mientras que el tiempo de supresión viral y las tasas de supresión viral en 2 años fueron similares entre los grupos de los sujetos tratados (152). En otro estudio que caracterizó los factores virales que influyen en la rápida progresión del VIH (219), la mayor capacidad replicativa del virus y el uso de co-receptores CXCR4 estuvieron estrechamente vinculados con el agotamiento acelerado de las células TCD4 + y la progresión rápida de la enfermedad. En un análisis previo realizado por este grupo de autores, los sujetos con presentación tardía y $CD4 \leq 100$ al momento del diagnóstico de VIH que tenían cepas X4, y se asociaron con un recuento de LT CD4+ significativamente menor que los infectados con virus R5, además mostraron un deterioro del recuento de células TCD4 + durante los siguientes dos años de TARVAE (220).

Vancoillie L. y col, (221) en el 2017 emplean la secuenciación masiva para predecir la preferencia en el uso del co-receptor de los aislados virales obtenidos. En seis pacientes reveló la presencia de una mezcla de variantes que usaban CCR5 y CXCR4 antes del inicio del TARVAE. En tres de estos seis pacientes las variantes que emplean CCR5 y CXCR4 se detectaron alternativamente en el tiempo. Este hallazgo aboga contra la evolución viral porque en caso de evolución y concomitante presión selectiva, se podría esperar la detección consistente de descendientes de la misma cepa con el uso de co-receptor sin cambios, o posiblemente un solo cambio, en un determinado

punto de tiempo (221).

Algunos estudios informan una recuperación del recuento de células T CD4 más pobre en sujetos tratados, con supresión virológica, infectados con virus X4 en relación con individuos en iguales condiciones pero que portan virus R5 (178, 182). Las discrepancias entre los resultados en diferentes estudios pueden deberse a la heterogeneidad de las poblaciones que se están estudiando (por ejemplo, las diferencias en la CV y los recuentos de células T CD4 + en la entrada al estudio, el uso de antirretrovirales y la duración del seguimiento).

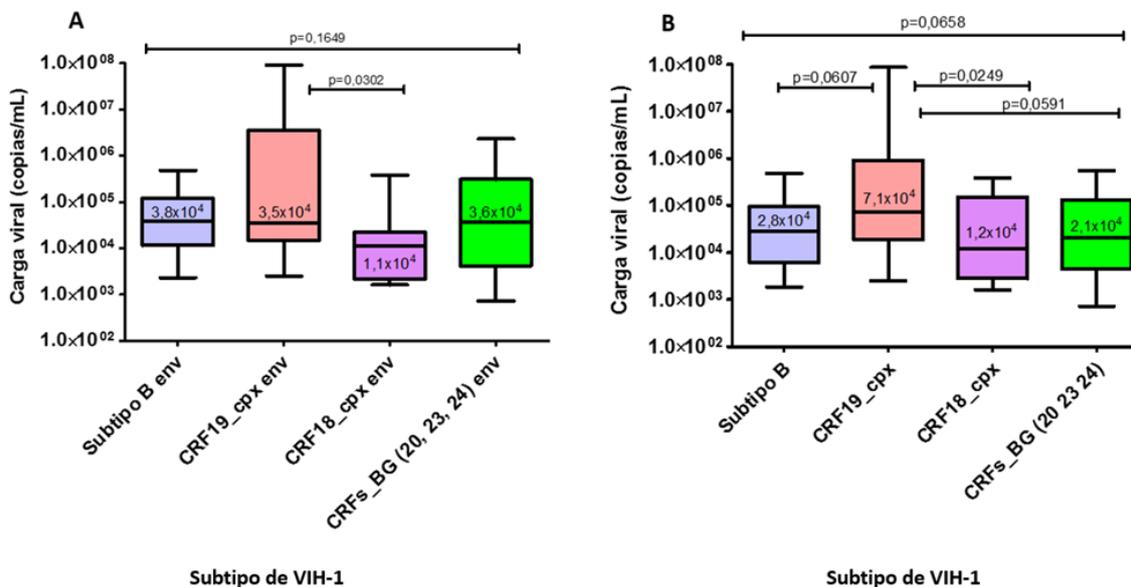


Figura 10. Comparación de los valores de carga viral según la variante viral detectada en la región C2V3 del gen *env* (A) y en el gen *pol* (B) en las muestras estudiadas

Al comparar los valores de CV entre los diferentes subtipos virales, teniendo en cuenta la variante detectada al secuenciar la región C2V3 del gen *env* (**Figura 8A**) y *pol* (**Figura 8B**), se observan mayores niveles de CV en los virus CRF19_cpx, comparado con los otros virus, particularmente al analizar los subtipos en el gen de la polimerasa ($p=0,0658$), donde alcanza la significación estadística al comparar el CRF19_cpx con el CRF18_cpx ($p=0,0249$) y con los CRFs_BG (20, 23, 24) ($p=0,0591$).

En un estudio previo de progresión rápida a SIDA publicado por Kourí y cols (26) utilizando también muestras de VIH de pacientes cubanos, al comparar los principales subtipos de VIH-1 detectados (B y CRFs_BG 20-23-24) con el CRF19_cpx, se observó que los pacientes infectados con este último tenían mayores niveles de CV al diagnóstico de VIH, mientras que al momento de la toma de la muestra la diferencia se observó solo al comparar con los CRF20–23–24_BG, lo cual coincide con los resultados observados en este estudio, a pesar que no contábamos con el dato de CV al diagnóstico de los pacientes (26).

La alta CV del CRF19_cpx, quizás resultante de la alta replicación viral (222) podría apoyar la hipótesis de que esta variante viral tiene mayor capacidad replicativa, que es un rasgo distintivo de los virus que utilizan el co-receptor CXCR4 (222). Además, el hecho de que los mayores valores de CV se observaron al tener en cuenta el subtipo de VIH detectado en el gen *pol*, apoya hallazgos previos (26) sobre la alta adecuación (fitness) observada en la PR (codificada por el gen *pol*) del CRF19_cpx y sugiere que *pol* tendría un papel más importante (en este gen el virus CRF19_cpx tiene subtipo D) en la patogénesis de la enfermedad.

Sin embargo, otros genes del subtipo D del virus CRF19_cpx (*gag* y *nef*), no investigados en este estudio, pudieran también asociarse con la replicación viral incrementada y la patogenia in vivo. Los genes *gag* y *nef* contienen la mayor cantidad de epítopes de CD8 y son frecuentemente reconocidos por el sistema inmune (223), por lo que deben ser estudiados en investigaciones futuras.

Además, diferencias en la CV explican sólo una pequeña variabilidad en las tasas de disminución de células CD4 en pacientes que no reciben terapia antirretroviral, lo que sugiere que otros factores como la activación inmune, conduce a la pérdida de CD4 en la infección por VIH. De hecho, la proporción de células T CD8 activadas, medida como el porcentaje de células que expresan CD38, predice el riesgo de progresión de la enfermedad independientemente de la CV y el recuento de CD4. Los niveles de IL-6 y Proteína C-Reactiva están elevados en pacientes con infección por el VIH y predicen de forma independiente el desarrollo de enfermedades

oportunistas.(212)

Los hallazgos del presente estudio refuerzan la hipótesis de que el virus CRF19_cpx utiliza preferentemente el co-receptor CXCR4 (virus dual o X4), lo que podría tener impacto en la rápida progresión de la infección así como en la limitación del empleo de MVC para pacientes infectados con esta variante viral.

CONCLUSIONES

- Las características epidemiológicas de los pacientes estudiados coincidieron con el comportamiento de la epidemia cubana de VIH.
- Se confirmó la gran diversidad genética del VIH-1 en Cuba, con la consiguiente posibilidad de generar nuevas formas recombinantes únicas.
- Se corroboró que en la variante CRF19_cpx es más prevalente el fenotipo R5X4/X4.
- La elevada frecuencia de mutaciones que confieren resistencia a Maraviroc en la región V3 de VIH-1 de los recombinantes cubanos , indican que podría existir resistencia natural al Maraviroc o que pudieran ser solo polimorfismos asociados a estas variantes virales no-B.
- Existieron diferencias en algunas variables clínicas, epidemiológicas, inmunológicas y virológicas entre las variantes de VIH que utilizan el co-receptor CXCR4 (R5X4 o duales) o CCR5, en la muestra analizada.
- La mayor carga viral observada en los virus CRF19_cpx sustenta la hipótesis de que esta variante viral tiene mayor capacidad replicativa.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio, con un diseño representativo del país, sobre la prevalencia de resistencia primaria y secundaria a Maraviroc en Cuba.
- Realizar estudios del fenotipo de VIH en los que se analicen otras regiones del gen *env* que pudieran ser determinantes en el uso del co-receptor.
- Estudiar el comportamiento del fenotipo viral y uso del co-receptor *in vitro*, de la variante viral CRF19_cpx.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Barouch DH, Whitney JB, Moldt B, Klein F, Oliveira TY, Liu J, et al. Therapeutic Efficacy of Potent Neutralizing HIV-1-Specific Monoclonal Antibodies in SHIV-Infected Rhesus Monkeys. *Nature*. 2013;503(7475):224-8.
2. UNAIDS. www.UNAIDS.com 2016.
3. Aldrich C, Hemelaar J. Global HIV-1 diversity surveillance. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(12):691-4.
4. Popovic M, Sarin PS, Robert-Gurroff M, Kalyanaraman VS, Mann D, Minowada J, et al. Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus). *Science (New York, NY)*. 1983;219(4586):856-9.
5. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control*. 1992;41(Rr-17):1-19.
6. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*. 2009;15(8):871-2.
7. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *The New England journal of medicine*. 2008;358(15):1590-602.
8. Thomson MM, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS reviews*. 2005;7(4):210-24.
9. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*. 2002;29(2):184-90.
10. HIV Sequence Database. 2016 [cited October 2016]. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory [database on the Internet]. , [cited October 2016]. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>.
11. Schwalbe B, Schreiber M. Effect of lysine to arginine mutagenesis in the

V3 loop of HIV-1 gp120 on viral entry efficiency and neutralization. PLoS ONE. 2015;10(3):e0119879.

12. Poveda E, Alcamí J, Paredes R, Córdoba J, Gutiérrez F, Llibre JM, et al. Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. AIDS reviews. 2010;12(3):135-48.

13. Bozzette SA, McCutchan JA, Spector SA, Wright B, Richman DD. A cross-sectional comparison of persons with syncytium- and non-syncytium-inducing human immunodeficiency virus. The Journal of Infectious Diseases. 1993;168(6):1374-9.

14. Tersmette M, de Goede RE, Al BJ, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, et al. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. Journal of Virology. 1988;62(6):2026-32.

15. Sede MM, Moretti FA, Laufer NL, Jones LR, Quarleri JF. HIV-1 Tropism Dynamics and Phylogenetic Analysis from Longitudinal Ultra-Deep Sequencing Data of CCR5- and CXCR4-Using Variants. PLoS ONE. 2014;9(7).

16. Smyth RP, Davenport MP, Mak J. The origin of genetic diversity in HIV-1. Virus research. 2012;169(2):415-29.

17. Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, et al. Maraviroc for Previously Treated Patients with R5 HIV-1 Infection. The New England journal of medicine. 2008;359(14):1429-41.

18. Swenson LC, Chui CK, Brumme CJ, Chan D, Woods CK, Mo T, et al. Genotypic analysis of the V3 region of HIV from virologic nonresponders to maraviroc-containing regimens reveals distinct patterns of failure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2013;57(12):6122-30.

19. MINSAP. Registro Nacional VIH del Ministerio de Salud Pública. 2016.

20. Kouri V, Aleman Y, Perez L, Perez J, Fonseca C, Correa C, et al. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2012;55(4):348-55.

21. Casado G, Thomson MM, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba.

- Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999). 2005;40(5):532-7.
22. Sierra M, Thomson MM, Posada D, Perez L, Aragonés C, González Z, et al. Identification of 3 phylogenetically related HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant forms in Cuba. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999). 2007;45(2):151-60.
23. Perez L, Thomson MM, Bleda MJ, Aragonés C, González Z, Perez J, et al. HIV Type 1 molecular epidemiology in Cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2006;22(8):724-33.
24. Perez L, Kouri V, Aleman Y, Abrahantes Y, Correa C, Aragonés C, et al. Antiretroviral drug resistance in HIV-1 therapy-naive patients in Cuba. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;16:144-50.
25. Kouri V, Aleman Y, Perez L, Perez J, Fonseca C, Correa C, et al. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. *Journal of the International AIDS Society*. 2014;17(4 Suppl 3):19754.
26. Kouri V, Khouri R, Aleman Y, Abrahantes Y, Vercauteren J, Pineda-Pena AC, et al. CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine*. 2015;2(3):244-54.
27. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5786):523-6.
28. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science (New York, NY)*. 2000;287(5453):607-14.
29. Essex M, McLane MF, Lee TH, Falk L, Howe CW, Mullins JI, et al. Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. *Science (New York, NY)*. 1983;220(4599):859-62.
30. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, NY)*. 1983;220(4599):865-7.
31. Quinnan GV, Jr., Masur H, Rook AH, Armstrong G, Frederick WR, Epstein

- J, et al. Herpesvirus infections in the acquired immune deficiency syndrome. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1984;252(1):72-7.
32. Freed EO, Martin MA. HIVs and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. II. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2108-85.
33. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 1981;30(21):250-2.
34. Joncas JH, Delage G, Chad Z, Lapointe N. Acquired (or congenital) immunodeficiency syndrome in infants born of Haitian mothers. *The New England journal of medicine*. 1983;308(14):842.
35. 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 (New York, NY)*. 1983;220(4599):868-71.
36. Sarngadharan MG, Popovic M, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science (New York, NY)*. 1984;224(4648):506-8.
37. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science (New York, NY)*. 1984;224(4648):497-500.
38. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (New York, NY)*. 1986;233(4761):343-6.
39. Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science (New York, NY)*. 1998;280(5371):1880-4.
40. Varmus H, Nathanson N. Science and the control of AIDS. *Science (New York, NY)*. 1998;280(5371):1815.
41. Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, et al. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004;9:2388-413.
42. Karpas A. Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2004;79(4):911-33.

43. Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312(5996):763-7.
44. Adamson CS, Freed EO. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral research*. 2010;85(1):119-41.
45. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993;362(6418):355-8.
46. Skolnik PR, Kosloff BR, Hirsch MS. Bidirectional interactions between human immunodeficiency virus type 1 and cytomegalovirus. *The Journal of Infectious Diseases*. 1988;157(3):508-14.
47. Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine*. 1991;324(5):308-17.
48. Cullen BR. The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell*. 1990;63(4):655-7.
49. Cullen BR. Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell*. 1993;73(3):417-20.
50. Cullen BR. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*. 1998;93(5):685-92.
51. Ho DD. Therapy of HIV infections: problems and prospects. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1996;73(1):37-45.
52. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emami EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):117-22.
53. Hecht FM, Grant RM, Petropoulos CJ, Dillon B, Chesney MA, Tian H, et al. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *The New England journal of medicine*. 1998;339(5):307-11.
54. Lawson VA, Oelrichs R, Guillon C, Imrie AA, Cooper DA, Deacon NJ, et al. Adaptive changes after human immunodeficiency virus type 1 transmission. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2002;18(8):545-56.
55. Berger EA. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS (London, England)*. 1997;11 Suppl A:S3-16.
56. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Current*

opinion in immunology. 1997;9(4):551-62.

57. Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*. 1997;235(2):179-90.

58. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature*. 1998;391(6664):240.

59. Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(16):13433-41.

60. Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *The Journal of Infectious Diseases*. 1994;169(5):968-74.

61. Fear WR, Kesson AM, Naif H, Lynch GW, Cunningham AL. Differential Tropism and Chemokine Receptor Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Neonatal Monocytes, Monocyte-Derived Macrophages, and Placental Macrophages. *Journal of Virology*. 1998;72(2):1334-44.

62. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature medicine*. 1997;3(12):1369-75.

63. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2004;20(1):111-26.

64. Pope M, Haase AT. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nature medicine*. 2003;9(7):847-52.

65. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science (New York, NY)*. 1998;280(5362):427-31.

66. Harouse JM, Gettie A, Tan RC, Blanchard J, Cheng-Mayer C. Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs. *Science (New York, NY)*. 1999;284(5415):816-9.

67. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs

Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004;200(6):749-59.

68. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004;200(6):761-70.

69. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*. 2005;434(7037):1148-52.

70. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*. 2005;434(7037):1093-7.

71. Schellekens PT, Roos MT, De Wolf F, Lange JM, Miedema F. Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected men. *Journal of clinical immunology*. 1990;10(2):121-7.

72. Tersmette M, Miedema F. Interactions between HIV and the host immune system in the pathogenesis of AIDS. *AIDS (London, England)*. 1990;4 Suppl 1:S57-66.

73. Miedema F, Tersmette M, van Lier RA. AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunology today*. 1990;11(8):293-7.

74. Schreiber M, Wachsmuth C, Muller H, Hagen C, Schmitz H, van Lunzen J. Loss of antibody reactivity directed against the V3 domain of certain human immunodeficiency virus type 1 variants during disease progression. *The Journal of General Virology*. 1996;77 (Pt 10):2403-14.

75. Shaheen F, Collman RG. Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors. *Current opinion in infectious diseases*. 2004;17(1):7-16.

76. Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. *Current topics in microbiology and immunology*. 1992;176:1-20.

77. Domingo E. Rapid evolution of viral RNA genomes. *The Journal of Nutrition*. 1997;127(5 Suppl):958s-61s.

78. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology*. 1997;51:151-78.

79. Freed EO, Mouland AJ. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology*. 2006;3:77.
80. Najera R, Delgado E, Perez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS (London, England)*. 2002;16 Suppl 4:S3-16.
81. Chin MP, Chen J, Nikolaitchik OA, Hu WS. Molecular determinants of HIV-1 intersubtype recombination potential. *Virology*. 2007;363(2):437-46.
82. Domingo E, Mas A, Yuste E, Pariente N, Sierra S, Gutierrez-Riva M, et al. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques*. 2001;57:77-115.
83. Suzuki Y, Suzuki Y. [HIV pathogenesis and intrinsic cellular defense mechanisms]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2010;68(3):415-21.
84. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5463):55-6.
85. Barroso H, Taveira N. Evidence for negative selective pressure in HIV-2 evolution in vivo. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2005;5(3):239-46.
86. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 1989;63(3):1455-9.
87. Hu WS, Rhodes T, Dang Q, Pathak V. Retroviral recombination: review of genetic analyses. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2003;8:d143-55.
88. Moutouh L, Corbeil J, Richman DD. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):6106-11.
89. Steain MC, Wang B, Dwyer DE, Saksena NK. HIV-1 co-infection, superinfection and recombination. *Sexual health*. 2004;1(4):239-50.
90. Carvajal-Rodriguez A, Crandall KA, Posada D. Recombination favors the

evolution of drug resistance in HIV-1 during antiretroviral therapy. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2007;7(4):476-83.

91. First polymerase chain reaction viral load test approved by FDA. Food and Drug Administration. *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care*. 1996;2(7):43.

92. Staszewski S, Loveday C, Picazo JJ, Dellarnonica P, Skinhoj P, Johnson MA, et al. Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in zidovudine-experienced patients. A randomized controlled comparison with zidovudine monotherapy. Lamivudine European HIV Working Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1996;276(2):111-7.

93. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS (London, England)*. 2011;25(5):679-89.

94. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS (London, England)*. 2006;20(16):W13-23.

95. Chan PA, Kantor R. Transmitted drug resistance in nonsubtype B HIV-1 infection. *HIV therapy*. 2009;3(5):447-65.

96. Blanco M, Rolo F, Martínez N, Gessa A, Díaz H, Lubian A. Aplicación del ensayo de Movilidad del Heteroduplex en los estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en Cuba. *Biotecnología Aplicada*. 2001(18):149-53.

97. Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. *AIDS (London, England)*. 2005;19(11):1155-63.

98. Blanco M, Martinez N, Díaz H, Lubían A, Romay D, Regalado L. Detección de nuevos subtipos y FRs del VIH-1 en Cuba mediante el ensayo de movilidad del heteroduplex env / gag. . *Latinoamericana de Microbiología*. 2002;44(4):0034-9771.

99. Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, et al. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998;178(1):70-9.

100. Clotet B, Menendez-Arias L, Schapiro J, Kuritzkes D, Burger D, Telenti A, et al. Guide to Management of HIV Drug Resistance, Antiretrovirals Pharmacokinetics and Viral Hepatitis Infected Subjects. Badalona, Catalonia, España 2008. 2008.
101. Perez J, Perez D, Gonzalez I, Diaz Jidy M, Orta M, Aragones C, et al. Approaches to the management of HIV-AIDS in Cuba. 2004.
102. De Feo CJ, Weiss CD. Escape from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry inhibitors. *Viruses*. 2012;4(12):3859-911.
103. Lobritz MA, Ratcliff AN, Arts EJ. HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance. *Viruses*. 2010;2(5):1069-105.
104. Tilton JC, Doms RW. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral research*. 2010;85(1):91-100.
105. Woollard SM, Kanmogne GD. Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015;9:5447-68.
106. Wilkin TJ, Gulick RM. CCR5 Antagonism in HIV Infection: Current Concepts and Future Opportunities. *Annual review of medicine*. 2012;63:81-93.
107. Sax PE. Maraviroc for treatment-naive patients with HIV-1 infection: is the glass half empty or half full? *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;201(6):797-9.
108. Parra J, Portilla J, Pulido F, Sanchez-de la Rosa R, Alonso-Villaverde C, Berenguer J, et al. Clinical utility of maraviroc. *Clinical Drug Investigation*. 2011;31(8):527-42.
109. Wyatt H, Herman OM, Macartney M, Conibear T, Garcia-Diaz A, Booth C, et al. The utility of genotypic tropism testing in clinical practice. *International Journal of STD & AIDS*. 2015;26(8):593-4.
110. Drake S, Skidmore S, White D. New clinics for HIV testing. Upgrade existing services. *BMJ : British Medical Journal*. 1993;306(6886):1197.
111. Soriano V, Briones C. [Incorporation of the test of resistance to antiretroviral drugs in clinical practice]. *Medicina clinica*. 1999;112(11):412-5.
112. OMS. 2017. Available from: <http://www.who.int/es/>.
113. Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 Pathogenesis: The Virus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;2(12).
114. Afani SA, Gallardo OA. [Antiretroviral resistance in human immunodeficiency virus infection]. *Revista chilena de infectologia : organo*

- oficial de la Sociedad Chilena de Infectología. 2011;28(5):461-9.
115. Roberts T, Bygrave H, Fajardo E, Ford N. Challenges and opportunities for the implementation of virological testing in resource-limited settings. *Journal of the International AIDS Society*. 2012;15(2).
116. Liu TF, Shafer RW. Web Resources for HIV Type 1 Genotypic-Resistance Test Interpretation. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(11):1608-18.
117. Lobritz MA, Ratcliff AN, Marozsan AJ, Dudley DM, Tilton JC, Arts EJ. Multifaceted mechanisms of HIV inhibition and resistance to CCR5 inhibitors PSC-RANTES and Maraviroc. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(6):2640-50.
118. Delgado R. [Mechanisms of resistance and failure of treatment with maraviroc]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2008;26 Suppl 11:28-33.
119. Luu QP, Dean J, Do TT, Carr MJ, Dunford L, Coughlan S, et al. HIV type 1 coreceptor tropism, CCR5 genotype, and integrase inhibitor resistance profiles in Vietnam: implications for the introduction of new antiretroviral regimens. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2012;28(10):1344-8.
120. Pennings PS. HIV Drug Resistance: Problems and Perspectives. *Infectious Disease Reports*. 2013;5(Suppl 1).
121. Wensing AM, Calvez V, Gunthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. 2014 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*. 2014;22(3):642-50.
122. Devereux HL, Youle M, Johnson MA, Loveday C. Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy. *AIDS (London, England)*. 1999;13(18):F123-7.
123. Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vezinet F, Clotet B, De Luca A, et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *The Lancet infectious diseases*. 2011;11(5):394-407.
124. Jensen MA, van 't Wout AB. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS reviews*. 2003;5(2):104-12.
125. Isaka Y, Sato A, Miki S, Kawauchi S, Sakaida H, Hori T, et al. Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology*. 1999;264(1):237-43.

126. Seclen E, Garrido C, Gonzalez Mdel M, Gonzalez-Lahoz J, de Mendoza C, Soriano V, et al. High sensitivity of specific genotypic tools for detection of X4 variants in antiretroviral-experienced patients suitable to be treated with CCR5 antagonists. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(7):1486-92.
127. Cardozo T, Kimura T, Philpott S, Weiser B, Burger H, Zolla-Pazner S. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2007;23(3):415-26.
128. Gilliam BL, Riedel DJ, Redfield RR. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. *Journal of Translational Medicine*. 2011;9(Suppl 1):S9.
129. Van Laethem K, Schrooten Y, Dedecker S, Van Heeswijck L, Deforche K, Van Wijngaerden E, et al. A genotypic assay for the amplification and sequencing of gag and protease from diverse human immunodeficiency virus type 1 group M subtypes. *Journal of Virological Methods*. 2006;132(1-2):181-6.
130. Struck D, Perez-Bercoff D, Devaux C, Schmit J, Danielle P, editors. COMET: A Novel approach to HIV-1 subtype prediction. 8th European HIV Drug Resistance Workshop; 2010; Sorrento, Italy.
131. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, et al. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2005;21(19):3797-800.
132. Pineda-Pena AC, Faria NR, Imbrechts S, Libin P, Abecasis AB, Deforche K, et al. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;19:337-48.
133. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011;28(10):2731-9.
134. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, et al. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *Journal of virology*. 2003;77(24):13376-88.
135. Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Kaiser R. *Bioinformatics*

- prediction of HIV coreceptor usage. *Nature biotechnology*. 2007;25(12):1407-10.
136. Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *Journal of Virology*. 1992;66(5):3183-7.
137. Kouri V, Khouri R, Alemán Y, Abrahantes Y, Vercauteren J, Pineda-Peña AC, et al. CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine*. 2015;2(3):244-54.
138. Lopez-Bernaldo de Quiros JC, Delgado R, Garcia F, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. [Microbiological diagnosis of HIV infection]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2007;25(10):632-8.
139. Delatorre EO, Bello G. Phylodynamics of HIV-1 Subtype C Epidemic in East Africa. *PLoS ONE*. 2012;7(7).
140. Vaughan HE, Cane P, Pillay D, Tedder RS. Characterization of HIV type 1 clades in the Caribbean using pol gene sequences. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2003;19(10):929-32.
141. Este JA, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet*. 2007;370(9581):81-8.
142. Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, Goodenow MM. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS (London, England)*. 2000;14(18):2937-9.
143. Moyle GJ, Wildfire A, Mandalia S, Mayer H, Goodrich J, Whitcomb J, et al. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(6):866-72.
144. Hazenberg MD, Otto SA, Hamann D, Roos MT, Schuitemaker H, de Boer RJ, et al. Depletion of naive CD4 T cells by CXCR4-using HIV-1 variants occurs mainly through increased T-cell death and activation. *AIDS (London, England)*. 2003;17(10):1419-24.
145. Weiser B, Philpott S, Klimkait T, Burger H, Kitchen C, Burgisser P, et al. HIV-1 coreceptor usage and CXCR4-specific viral load predict clinical disease progression during combination antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)*. 2008;22(4):469-79.
146. Daar ES, Kesler KL, Petropoulos CJ, Huang W, Bates M, Lail AE, et al. Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clinical*

Infectious Diseases. 2007;45(5):643-9.

147. Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, et al. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Annals of internal medicine*. 1993;118(9):681-8.

148. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997;185(4):621-8.

149. Goetz MB, Leduc R, Kostman JR, Labriola AM, Lie Y, Weidler J, et al. Relationship between HIV coreceptor tropism and disease progression in persons with untreated chronic HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*. 2009;50(3):259-66.

150. Poveda E, Briz V, de Mendoza C, Benito JM, Corral A, Zahonero N, et al. Prevalence of X4 tropic HIV-1 variants in patients with differences in disease stage and exposure to antiretroviral therapy. *Journal of medical virology*. 2007;79(8):1040-6.

151. Kagan RM, Johnson EP, Siaw M, Biswas P, Chapman DS, Su Z, et al. A Genotypic Test for HIV-1 Tropism Combining Sanger Sequencing with Ultradeep Sequencing Predicts Virologic Response in Treatment-Experienced Patients. *PLoS ONE*. 2012;7(9).

152. Waters L, Mandalia S, Randell P, Wildfire A, Gazzard B, Moyle G. The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(10):1617-23.

153. Hunt PW, Harrigan PR, Huang W, Bates M, Williamson DW, McCune JM, et al. Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(7):926-30.

154. Saracino A, Monno L, Cibelli DC, Punzi G, Brindicci G, Ladisa N, et al. Co-receptor switch during HAART is independent of virological success. *Journal of medical virology*. 2009;81(12):2036-44.

155. Briz V, Poveda E, del Mar Gonzalez M, Martin-Carbonero L, Gonzalez-Gonzalez R, Soriano V. Impact of antiretroviral therapy on viral tropism in HIV-infected patients followed longitudinally for over 5 years. *Journal of Antimicrobial*

Chemotherapy. 2008;61(2):405-10.

156. Detels R, Jacobson L, Margolick J, Martinez-Maza O, Munoz A, Phair J, et al. The multicenter AIDS Cohort Study, 1983 to. *Public Health*. 2012;126(3):196-8.

157. Lobaina L, Noa E, Dubed M, Navea L, Vilarrubia OL, Diaz H. Isolation and virological characterization of HIV-1 in Cuba. Relationship with the clinical status of the patients. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 1996;50(10):501-4.

158. Kouri V, Aleman Y, Díaz D, Pérez L, Limia M C, Soto Y, et al. Co-Receptor Tropism Determined by Genotypic Assay in HIV-1 Circulating in Cuba. *Journal of AIDS & clinical research*. 2016;7(7):592.

159. Sucupira MC, Sanabani S, Cortes RM, Giret MT, Tomiyama H, Sauer MM, et al. Faster HIV-1 disease progression among Brazilian individuals recently infected with CXCR4-utilizing strains. *PLoS ONE*. 2012;7(1):e30292.

160. Esbjörnsson J, Månsson F, Martínez-Arias W, Vincic E, Biague AJ, da Silva ZJ, et al. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease - indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology*. 2010;7:23.

161. Li X, Xue Y, Zhou L, Lin Y, Yu X, Wang X, et al. Evidence that HIV-1 CRF01_AE is associated with low CD4+T cell count and CXCR4 co-receptor usage in recently infected young men who have sex with men (MSM) in Shanghai, China. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89462.

162. Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, et al. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nature medicine*. 1997;3(11):1259-65.

163. Abebe A, Demissie D, Goudsmit J, Brouwer M, Kuiken CL, Pollakis G, et al. HIV-1 subtype C syncytium- and non-syncytium-inducing phenotypes and coreceptor usage among Ethiopian patients with AIDS. *AIDS (London, England)*. 1999;13(11):1305-11.

164. Batra M, Tien PC, Shafer RW, Contag CH, Katzenstein DA. HIV type 1 envelope subtype C sequences from recent seroconverters in Zimbabwe. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2000;16(10):973-9.

165. Bjorndal A, Sonnerborg A, Tscherning C, Albert J, Fenyo EM. Phenotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates of

- Ethiopian AIDS patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1999;15(7):647-53.
166. Peeters M, Vincent R, Perret JL, Lasky M, Patrel D, Liegeois F, et al. Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1999;20(2):115-21.
167. Ping LH, Nelson JA, Hoffman IF, Schock J, Lamers SL, Goodman M, et al. Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates from Malawi: underrepresentation of X4 variants. *Journal of Virology*. 1999;73(8):6271-81.
168. Tscherning C, Alaeus A, Fredriksson R, Bjorndal A, Deng H, Littman DR, et al. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology*. 1998;241(2):181-8.
169. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS (London, England)*. 2011;25(5):679-89.
170. Johnston ER, Zijenah LS, Mutetwa S, Kantor R, Kittinunvorakoon C, Katzenstein DA. High Frequency of Syncytium-Inducing and CXCR4-Tropic Viruses among Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C-Infected Patients Receiving Antiretroviral Treatment. *Journal of Virology*. 2003;77(13):7682-8.
171. Connell BJ, Michler K, Capovilla A, Venter WD, Stevens WS, Papathanasopoulos MA. Emergence of X4 usage among HIV-1 subtype C: evidence for an evolving epidemic in South Africa. *AIDS (London, England)*. 2008;22(7):896-9.
172. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, Chohan V, McClelland RS, Certain L, et al. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(8):1177-80.
173. Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirell D, Watera C, Lyagoba F, et al. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda.

The Journal of Infectious Diseases. 2002;185(9):1244-50.

174. Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, McCutchan F, et al. Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;197(5):707-13.

175. Kaleebu P, Nankya IL, Yirell DL, Shafer LA, Kyosiimire-Lugemwa J, Lule DB, et al. Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*. 2007;45(1):28-33.

176. Cashin K, Jakobsen MR, Sterjovski J, Roche M, Ellett A, Flynn JK, et al. Linkages between HIV-1 specificity for CCR5 or CXCR4 and in vitro usage of alternative coreceptors during progressive HIV-1 subtype C infection. *Retrovirology*. 2013;10:98.

177. Schuitemaker H, van 't Wout AB, Lusso P. Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *Journal of Translational Medicine*. 2011;9(Suppl 1):S5.

178. Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, et al. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *Journal of Virology*. 2007;81(15):7885-93.

179. De Wolf F, Hogervorst E, Goudsmit J, Fenyo EM, Rubsamen-Waigmann H, Holmes H, et al. Syncytium-inducing and non-syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics. *WHO Network for HIV Isolation and Characterization. AIDS Research and Human Retroviruses*. 1994;10(11):1387-400.

180. Vasan A, Renjifo B, Hertzmark E, Chaplin B, Msamanga G, Essex M, et al. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(6):843-52.

181. Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystie I, de Ruiter A, et al. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *Journal of the International AIDS Society*. 2010;13:4.

182. Tebit DM, Zekeng L, Kaptue L, Salminen M, Krausslich HG, Herchenroder O. Genotypic and phenotypic analysis of HIV type 1 primary isolates from western Cameroon. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2002;18(1):39-48.

183. Zhong P, S BU, Konings F, Urbanski M, Ma L, Zekeng L, et al. Genetic and biological properties of HIV type 1 isolates prevalent in villagers of the Cameroon equatorial rain forests and grass fields: further evidence of broad HIV type 1 genetic diversity. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2003;19(12):1167-78.
184. Esbjornsson J, Mansson F, Martinez-Arias W, Vincic E, Biague AJ, da Silva ZJ, et al. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease--indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology*. 2010;7:23.
185. Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(20):9434-8.
186. De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *Journal of Virology*. 1992;66(11):6777-80.
187. van der Kuyl AC, Cornelissen M. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology*. 2007;4:67.
188. Zolla-Pazner S, Cardozo T. Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(7):527-35.
189. Riemenschneider M, Cashin KY, Budeus B, Sierra S, Shirvani-Dastgerdi E, Bayanolhagh S, et al. Genotypic Prediction of Co-receptor Tropism of HIV-1 Subtypes A and C. *Scientific Reports*. 2016;6:24883.
190. Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, et al. Coreceptor Tropism in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype D: High Prevalence of CXCR4 Tropism and Heterogeneous Composition of Viral Populations[▽]. *Journal of Virology*. 2007;81(15):7885-93.
191. Obermeier M, Pironti A, Berg T, Braun P, Daumer M, Eberle J, et al. HIV-GRADE: a publicly available, rules-based drug resistance interpretation algorithm integrating bioinformatic knowledge. *Intervirology*. 2012;55(2):102-7.
192. Obermeier M, Symons J, Wensing AM. HIV population genotypic tropism testing and its clinical significance. *Current opinion in HIV and AIDS*.

2012;7(5):470-7.

193. Obermeier M, Ehret R, Berg T, Braun P, Korn K, Muller H, et al. Genotypic HIV-coreceptor tropism prediction with geno2pheno [coreceptor]: differences depending on HIV-1-subtype. 2012:184.

194. Dina J, Raymond S, Maillard A, Le Guillou-Guillemette H, Rodalec A, Beby-Defaux A, et al. Algorithm-based prediction of HIV-1 subtype D coreceptor use. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(9):3087-9.

195. Cho MW, Lee MK, Carney MC, Berson JF, Doms RW, Martin MA. Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *Journal of Virology*. 1998;72(3):2509-15.

196. Hoffman TL, Stephens EB, Narayan O, Doms RW. HIV type I envelope determinants for use of the CCR2b, CCR3, STRL33, and APJ coreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(19):11360-5.

197. Ross TM, Cullen BR. The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(13):7682-6.

198. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998;393(6686):648-59.

199. Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, Sodroski J, Hendrickson WA. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 2000;74(4):1961-72.

200. Moulard M, Lortat-Jacob H, Mondor I, Roca G, Wyatt R, Sodroski J, et al. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Journal of Virology*. 2000;74(4):1948-60.

201. Coetzer M, Cilliers T, Ping LH, Swanstrom R, Morris L. Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology*. 2006;356(1-2):95-105.

202. Jensen MA, Coetzer M, van 't Wout AB, Morris L, Mullins JI. A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based

- on envelope V3 sequences. *Journal of Virology*. 2006;80(10):4698-704.
203. Raymond AD, Gekonge B, Giri MS, Hancock A, Pappasavvas E, Chehimi J, et al. Increased metallothionein gene expression, zinc, and zinc-dependent resistance to apoptosis in circulating monocytes during HIV viremia. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;88(3):589-96.
204. Zhang L, Ma L, Wang Z, Wang Y, Zhang J, Wang H, et al. Alterations in HIV-1 gp120 V3 region are necessary but not sufficient for coreceptor switching in CRF07_BC in China. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e93426.
205. Tomasini-Grotto RM, Montes B, Triglia D, Torres-Braconi C, Aliano-Block J, de AZPM, et al. Variability Of The Conserved V3 Loop Tip Motif In Hiv-1 Subtype B Isolates Collected From Brazilian And French Patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41(3):720-8.
206. HIV Databases Operated by Los Alamos National Security, LLC, for the U.S. Department of Energy's National Nuclear Security Administration
Copyright © 2005-2017 LANS, LLC All rights reserved | Disclaimer/Privacy [updated 01212016]. Available from: <https://www.hiv.lanl.gov>.
207. Casseb J, Hong MA, Gonzalez C, Brigido LF, Duarte AJ, Michael-Hendry R. Two variants of HIV-1 B serotype are transmitted heterosexually in Sao Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998;31(10):1243-6.
208. Santoro-Lopes G, Harrison LH, Tavares MD, Xexeo A, Dos Santos AC, Schechter M. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: is B different from B-Br? *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2000;16(10):953-8.
209. Seclen E, Gonzalez Mdel M, Lapaz M, Rodriguez C, del Romero J, Aguilera A, et al. Primary resistance to maraviroc in a large set of R5-V3 viral sequences from HIV-1-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(12):2502-4.
210. Araujo LA, Junqueira DM, de Medeiros RM, Matte MC, Almeida SE. Naturally occurring resistance mutations to HIV-1 entry inhibitors in subtypes B, C, and CRF31_BC. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;54(1):6-10.
211. Asin-Milan O, Chamberland A, Wei Y, Haidara A, Sylla M, Tremblay CL. Mutations in variable domains of the HIV-1 envelope gene can have a significant impact on maraviroc and vicriviroc resistance. *AIDS Research and*

Therapy. 2013;10(1):15.

212. Kuritzkes D, Walter B. HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. In: Knipe D, Howley P, editors. Fields Virology. II. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2188-2194.

213. Chalmet K, Dauwe K, Foquet L, Baatz F, Seguin-Devaux C, Van Der Gucht B, et al. Presence of CXCR4-using HIV-1 in patients with recently diagnosed infection: correlates and evidence for transmission. *The Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(2):174-84.

214. Polk BF, Fox R, Brookmeyer R, Kanchanaraks S, Kaslow R, Visscher B, et al. Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. *The New England journal of medicine*. 1987;316(2):61-6.

215. Ford N, Meintjes G, Pozniak A, Bygrave H, Hill A, Peter T, et al. The future role of CD4 cell count for monitoring antiretroviral therapy. *The Lancet infectious diseases*. 2015;15(2):241-7.

216. Casadella M, Cozzi-Lepri A, Phillips A, Noguera-Julian M, Bickel M, Sedlacek D, et al. Plasma HIV-1 Tropism and the Risk of Short-Term Clinical Progression to AIDS or Death. *PLoS ONE*. 2017;12(1):e0166613.

217. Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA. Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Research and Therapy*. 2007;4:11.

218. Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(8):461-71.

219. Dalmau J, Rotger M, Erkizia I, Rauch A, Reche P, Pino M, et al. Highly pathogenic adapted HIV-1 strains limit host immunity and dictate rapid disease progression. *AIDS (London, England)*. 2014;28(9):1261-72.

220. Casadella M, Manzardo C, Noguera-Julian M, Ferrer E, Domingo P, Perez-Alvarez S, et al. Clinical value of ultradeep HIV-1 genotyping and tropism testing in late presenters with advanced disease. *AIDS (London, England)*. 2015;29(12):1493-504.

221. Vancoillie L, Hebberecht L, Dauwe K, Demecheleer E, Dinakis S, Vaneechoutte D, et al. Longitudinal sequencing of HIV-1 infected patients with low-level viremia for years while on ART shows no indications for genetic evolution of the virus. *Virology*. 2017;510:185-93.

222. Annunziato F, Galli G, Nappi F, Cosmi L, Manetti R, Maggi E, et al. Limited expression of R5-tropic HIV-1 in CCR5-positive type 1-polarized T cells explained by their ability to produce RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta. *Blood*. 2000;95(4):1167-74.
223. 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.

ANEXO I. Encuesta epidemiológica

Código de muestra asignado por LISIDA _____

Fecha de toma de la muestra _____

I- Datos generales y variables sociodemográficas:

1- Nombre y apellidos _____ 2- Caso Índice

3- Carné Identidad __/__/__ / __/__/__/__/__/__/__/__ 4- Fecha de diagnóstico
de VIH __/__/__

5- Provincia _____ 6- Municipio _____ 7- Nivel de escolaridad

8- Edad al diagnóstico _____ 9- Edad Actual _____ 10- Sexo ____ 11- Color de la
piel _____

II- Variables epidemiológicas:

12- Explique la forma de detección de la infección por VIH

13- Pruebas de detección de VIH anteriores a la primera positiva

14- Fecha probable de contagio _____

15- Forma de contagio: Sexual: _____ Parenteral: _____

16- Conducta sexual:

a) Orientación sexual _____

b) Número de parejas sexuales en el último año _____

c) Relaciones sexuales paralelas con una o más personas o encuentros casuales? Si___ No___

d) Practicas relaciones sexuales siempre con condón? Si___ No___

e) Mantienes relaciones sexuales con otras personas seropositivas después del diagnóstico de VIH? Si ___No ___

Usas condón Si ___No ___

III-VARIABLES CLÍNICAS Y DE LABORATORIO:

17- Conteo de linfocitos T CD4+ al diagnóstico de VIH: ___%___ cel/mm³,
Fecha _____

(Primer trimestre después del diagnóstico)

18- Valor de carga viral en el momento del diagnóstico de VIH:
_____ UI/ml

19- Antecedentes de manifestaciones clínicas del síndrome retroviral agudo.
Si___ No___

20- Causa definitoria de SIDA Si___ No___

Enfermedad oportunista. Cuales ? _____

Conteo de linfocitos TCD4+ < 200 ___ (_____%___ cel./mm³),
Fecha_____

21- Clasificación clínica CDC/OMS 1993 _____

Nombre y firma del especialista que realizó la encuesta:

Fecha de realizada la encuesta: _____

ANEXO II. Documento de consentimiento informado.

Por medio de la presente solicitamos su colaboración, absolutamente voluntaria, para ser incluido en este proyecto. El Sistema Nacional de Salud Cubano, cuenta con una amplia cobertura en la atención integral al paciente seropositivo al VIH (Institutos, Hospitales, Sanatorios, etc). Sin embargo, la aparición de resistencia a los medicamentos antirretrovirales (ARV) puede conducir al fracaso terapéutico, con los consiguientes efectos en la evolución desfavorable del paciente. Además se ha detectado en Cuba la asociación de una variante del VIH, con la rápida progresión a sida.

Para este estudio se necesitará una extracción de sangre, la que se realizará en presencia de monitoreo médico. La extracción de la sangre será realizada en el laboratorio clínico de nuestra Institución, por personal autorizado y con experiencia en ese menester, y cumpliendo todas las normas ética y de bioseguridad. La muestra de sangre obtenida para el estudio no será empleada para realizar ningún otro estudio ni prueba que no sea lo estrictamente estipulado en el presente proyecto.

Los resultados obtenidos serán estrictamente confidenciales, por lo que serán de dominio sólo de los autores del estudio y de los sujetos participantes.

Respetando los principios de voluntariedad, los participantes están en todo su derecho de decidir si desean o no colaborar con el estudio y una vez en él, puede solicitar su exclusión en cualquier etapa del mismo, si así lo deseara. Esa decisión será respetada y no conlleva a ninguna penalidad o pérdida de los beneficios, a los cuales tienen derecho. A cada uno de los participantes se le informará el resultado de sus estudios en las diferentes fases del proyecto hasta la conclusión final, y se les explicará el resultado si así lo desean. Los resultados de dichos estudios serán utilizados y publicados de forma anónima.

De acuerdo con lo planteado en este documento, yo _____ paciente_____, padre_____, madre_____, tutor_____, estando en pleno uso de mis facultades, accedo a colaborar con este proyecto.

Fecha: _____

Dado en el Hospital: _____

Provincia: _____

Firma de la persona que accede: _____

Nombre y Firma del médico de atención: _____