

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Tesis para optar por el título de
Master en Virología

Título: Caracterización genética del gen *gag* de
las variantes virales cubanas de VIH-1

Autor: Lic. Juan Carlos de León González

Tutores: Lic. Lissette Pérez Santos, Dr. C.

Lic. Yudira Soto Brito, Dr. C.

Asesor: Dra. Vivian Kouri Cardellá, Dr. Cs.

La Habana, 2025.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Tesis para optar por el título de
Master en Virología

Título: Caracterización genética del gen *gag* de las
variantes virales cubanas de VIH-1

Autor: Lic. Juan Carlos de León González

Tutores: Lic. Lissette Pérez Santos, Dr. C.

Lic. Yudira Soto Brito, Dr. C.

Asesor: Dra. Vivian Kouri Cardellá, Dr. Cs.

La Habana, 2025.

RESUMEN

Introducción: En Cuba, la epidemia por VIH-1 se caracteriza por una elevada diversidad genética, con predominio de formas recombinantes. El gen *gag* codifica las proteínas estructurales del virus y las mutaciones en dicho gen se asocian con resistencia a los inhibidores de la proteasa viral (IP). **Objetivo:** Caracterizar genéticamente la región que codifica para la proteína Gag de las variantes virales cubanas del VIH-1 en pacientes con y sin resistencia a los IP. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio analítico retrospectivo entre 2017-2024 con 88 muestras de plasma de pacientes (38 tratados y 50 no tratados). Se extrajo ARN viral, se amplificó mediante RT-PCR y PCR anidada la región *gag*. Los virus amplificados se secuenciaron por el método de Sanger. Las secuencias se editaron manualmente, se subtiparon utilizando bases de datos especializadas y se realizaron análisis filogenéticos y estadísticos. **Resultados:** La población estudiada reflejó la epidemia cubana, con predominio de hombres que tienen sexo con hombres (87,8%) y un 75% clasificado como sida. Se identificó alta diversidad genética, con predominio de formas recombinantes (CRF_BG 31,8%, CRF19_cpx 25%, CRF18_cpx 3,4%) y un 12,4% de formas recombinantes únicas. La proteína p24 fue la más conservada. Se detectaron mutaciones en *gag* previamente asociadas a resistencia a IP, pero su frecuencia no mostró un patrón claramente asociado a la presión farmacológica. Los análisis de asociación (Coeficiente V de Cramer) revelaron correlaciones moderadas (0,1-0,3) entre mutaciones específicas en *gag* y mutaciones de resistencia en la proteasa viral. **Conclusiones:** Las mutaciones en el gen *gag* tienen implicaciones en el fracaso virológico a los IP, pero los cambios observados con mayor frecuencia en pacientes no tratados parecen estar más relacionados con la variabilidad natural y los polimorfismos de las formas recombinantes circulantes en el país, que con la presión selectiva directa de los fármacos.

Palabras clave: VIH-1, gen *gag*, inhibidores de la proteasa, mutaciones, variantes genéticas, Cuba.

Dedicatoria

A Osvaldito, por su apoyo incondicional

A mis profesores, por sus enseñanzas para la ciencia y para la vida

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARV: Antirretroviral

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

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

CV: Carga viral

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfatados

FRs: Formas recombinantes

Gag: Poliproteína precursora de las proteínas estructurales del VIH

gag: gen que codifica para las proteínas derivadas de Gap

HSH: Hombres que tienen sexo con otros hombres

IN: Integrasa

IIN: Inhibidores de la integrasa

IP: Inhibidores de la proteasa

ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversas no análogos de nucleósidos

IPK: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

LT: Linfocito T

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

MVC: Maraviroc

ORF: Marcos abiertos de lectura (del inglés, *open reading frames*)

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

pol: gen que codifica para las proteínas derivadas de Gap-Pol

PR: Proteasa viral

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

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 (del inglés, *chimpanzee Lentivirus simian immunodeficiency virus*)

TI: Transcriptasa inversa

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

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.2. OBJETIVOS.....	4
<i>I.2.1. Objetivo general</i>	4
<i>I.2.2. Objetivos específicos</i>	4
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
II.1. ORIGEN DEL VIH-1 Y EL VIH-2	5
II.2. HISTORIA	5
II.3. CLASIFICACIÓN	7
II.4. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN.....	8
II.5. ESTRUCTURA DEL GENOMA.....	9
II.6. CICLO REPLICATIVO DE VIH-1	10
II.7. HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD	12
II.8. VARIABILIDAD GENÉTICA DE VIH-1	13
<i>II.8.1. Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1</i>	15
<i>II.8.2. Epidemiología en Cuba</i>	15
II.9. TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL	16
II.10. RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES.....	17
<i>II.10.1. Resistencia a los inhibidores de la proteasa</i>	17
II.11. LA PROTEASA DEL VIH-1 Y SUS SUSTRATOS NATURALES	18
<i>II.11.1 Resistencia del VIH a los IP: mutaciones de la proteasa</i>	20
<i>II.11.2 Variación natural de los sitios de escisión de Gag</i>	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
III.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN, UNIVERSO Y MUESTRA.....	23
<i>III.1.1. Diseño de estudio</i>	23
<i>III.1.2. Universo de estudio</i>	23
<i>III.1.3. Muestras clínicas</i>	23
<i>III.1.4. Criterios de inclusión</i>	23
<i>III.1.5. Criterios de exclusión</i>	24
<i>III.1.6. Tamaño muestral</i>	24
III.2. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	24
III.3. OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN	25
III.4. ASPECTOS ÉTICOS	25
<i>III.4.1. Criterios para la retirada prematura de participantes en la investigación</i> . 26	

<i>III.4.2. Criterios para la suspensión o terminación de la investigación como un todo</i>	26
<i>III.4.3. Idoneidad del estudio</i>	26
<i>III.4.4. Consentimiento Informado</i>	26
<i>III.4.5. Almacenamiento de los datos</i>	27
III.5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	27
<i>III.5.1. Caracterización genética de los virus</i>	27
III.5.1.1. Extracción del ARN viral	27
III.5.1.2. Síntesis del ADN complementario (ADNc) y amplificación de la región <i>gag</i>	27
III.5.1.3. PCR anidada de la región <i>gag</i>	28
III.5.1.4. Análisis de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa anidada	29
III.5.1.5. Purificación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa anidada	30
III.5.1.6. Secuenciación de ácidos nucleicos por el método de Sanger	30
III.5.1.7. Edición de las secuencias	30
III.5.1.8. Clasificación por subtipos	31
III.5.1.9. Análisis filogenético	31
III.5.1.10. Análisis estadístico	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
IV.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS, CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	32
IV.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DEL VIH-1 EN EL GEN GAG PARA LOS GRUPOS DE ESTUDIO	36
IV.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES DEL VIH-1 PRESENTES EN EL GEN GAG RELACIONADAS CON RESISTENCIA A LOS IPR ENTRE LAS VARIANTES GENÉTICAS QUE CIRCULAN EN LA EPIDEMIA CUBANA	39
<i>IV.3.1. Mutaciones comunes significativas</i>	40
<i>IV.3.2. Mutaciones de resistencia por grupo de estudio</i>	44
<i>IV.3.3. Mapas de Calor</i>	51
V. CONCLUSIONES	57
VI. RECOMENDACIONES	58
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
VIII. ANEXOS	69

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Lentivirinae*, género *Lentivirus*. La enfermedad producida por este virus, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (sida), se describió por primera vez en Los Ángeles, EE. UU., en el año 1981 por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), aunque el VIH se identificó en 1983 como agente causal de esta enfermedad (1). Durante el 2023 ocurrieron 1,3 millones de nuevas infecciones y 630 000 personas fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el sida en todo el mundo (2).

Existen dos agentes virales productores del sida, el VIH tipo 1 (VIH-1), que tiene una distribución mundial y es el responsable de la mayor parte de los casos, y el VIH 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 (LT) CD4+, principal diana del virus (4).

El VIH-1 es altamente variable y se han identificado cuatro grupos: 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 (del inglés, *Pending*) (5). 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 genéticos (A al D; F al H; J y K) (6, 7) y en múltiples formas recombinantes (FRs) que a su vez se clasifican en FRs circulantes (CRFs del inglés, *circulating recombinant forms*) y FRs únicas (URFs del inglés *unique recombinant forms*) (8, 9), algunas de las cuales poseen una distribución geográfica específica (6, 7). Hasta el momento se describen al menos 180 CRFs y numerosas URFs para el grupo M del VIH-1, que representan casi el 20 % de todas las infecciones por VIH (10).

El altamente estructurado ácido ribonucleico (ARN) del VIH-1 posee nueve marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés *open-reading frames*). Los tres principales ORF, *gag*, *pol* y *env*, codifican para las poliproteínas precursoras de proteínas estructurales (matriz, cápside, nucleocápside y p6), enzimas (proteasa, reverso transcriptasa e

integrasa) y proteínas de la envoltura (glicoproteínas gp 120 y gp 41), respectivamente. Los remanentes seis ORF codifican proteínas virales regulatorias (proteína transactivadora de la transcripción (tat) y regulador de la expresión de proteínas virales (Rev)) o accesorias (factor negativo (Nef), proteína viral R (Vpr), proteína viral U (Vpu) y factor de infectividad del virión (Vif) (10).

El gen *pol* de VIH es el más conservado dentro del genoma viral y codifica para las proteínas virales con función enzimática [transcriptasa inversa (TI), proteasa (PR) e integrasa (IN)], las que constituyen el blanco de la mayoría de los medicamentos antirretrovirales (ARV) descritos hasta la fecha: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIAN) y no análogos (ITINAN), inhibidores de proteasas (IP) e inhibidores de integrasa (IIN) (11, 12).

Estos regímenes han demostrado ser muy eficaces, prolongando la esperanza de vida y frenando la propagación de la epidemia del sida. Los pacientes que reciben terapia antirretroviral combinada a menudo muestran poca o ninguna evidencia clínica de infección viral; sin embargo, el tratamiento no es cura. Aunque en la mayoría de los pacientes tratados el virus solo se puede detectar con métodos altamente sensibles, las cargas virales se recuperarán rápidamente si se interrumpe el tratamiento. Si el régimen de dosificación no se sigue diligentemente, la inhibición subóptima de la replicación puede conducir a la aparición de resistencia viral, comprometiendo la eficacia de la terapia. Incluso, cuando el régimen se sigue rigurosamente, los efectos secundarios de la terapia a largo plazo reducen la expectativa de vida de los pacientes infectados por VIH-1 en relación con individuos no infectados de la misma edad. En consecuencia, se mantiene la necesidad de nuevos medicamentos (por ejemplo, toxicidad reducida y regímenes de dosificación más convenientes) y nuevas dianas en el ciclo de replicación viral (13).

El potencial terapéutico de Gag (Poliproteína precursora de las proteínas estructurales) como diana antiviral se ilustra por la eficacia de los IP, que evitan que la proteasa viral (PR) escinda a la poliproteína Gag en sus productos maduros, bloqueando así la maduración del virión. La maduración es necesaria para la infectividad del VIH-1 y puede influir en la función de otros componentes virales. Por ejemplo, *env* es menos fusogénica en partículas inmaduras que en partículas maduras (13).

El gen *gag* codifica para la poliproteína Gag, de la que se derivan las principales proteínas estructurales del VIH-1 (p17: proteína de matriz, p24: proteína de la cápside, p9: proteína de la nucleocápside y p6: proteína que interactúa con proteínas virales y celulares) y constituye el 50 % de la masa de la partícula viral. Según lo reportado por Van Laethem y colaboradores en el 2014 (14), hay mutaciones asociadas con la resistencia a los inhibidores de la proteasa que están localizadas en los sitios de corte del gen *gag*, las que usualmente no se estudian (15, 16).

La proteasa del VIH-1 (PR) escinde las poliproteínas Gag y Gag-Pol durante la maduración del virus. Las mutaciones de *gag* que involucran sitios de escisión (CS), en particular p7/p1, p1/p6, se han asociado con la resistencia a fármacos o la recuperación de la capacidad replicativa, tanto en ausencia como en presencia de mutaciones asociadas con la resistencia a fármacos contra la PR. También se han documentado polimorfismos en estas posiciones, así como en el CS p24/p2 y p2/p7 en pacientes sin tratamiento previo con fármacos (17).

Los primeros casos de VIH, en Cuba, se diagnosticaron en el año 1986. Según datos de la Vice Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MINSAP), hasta el mes de enero de 2024 se han reportado 41 105 personas infectadas con VIH y 35 879 viviendo con VIH. El sexo masculino es el más afectado y representa el 80 % del total de casos de la epidemia. Los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) representan el 70 % del total de casos diagnosticados y el 87 % entre los del sexo masculino. El 80,6 % de las personas viviendo con VIH están en tratamiento. Las edades de mayor incidencia corresponden a grupos entre los 24 y 49 años, según datos del Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual VIH/sida del Ministerio de Salud Pública de Cuba (18).

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 del VIH-1, incluyendo un alto porcentaje de formas recombinantes, tanto circulantes como únicas (8).

Desde el año 2019 Cuba introdujo un nuevo grupo farmacológico en la terapia de primera línea, los inhibidores de la integrasa (IIN) y por ello el uso de los inhibidores de la proteasa se ha visto relegado a terapias de segunda línea o de rescate. Sin embargo,

antes de esta fecha el Laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) informó una disminución en el porcentaje de resistencia a los IP, desde un 44 % en el 2009 a un 4,9 % en el 2023. Tenido en cuenta que el laboratorio de ITS cuenta con muestras de pacientes con y sin resistencia demostrada a este grupo de fármacos y que en investigaciones precedentes en Cuba se ha estudiado la variabilidad genética de otras regiones del VIH-1, se hace necesario estudiar a profundidad las mutaciones en el gen *gag* que pudieran tener un importante papel en la patogenia, capacidad replicativa viral y progresión de la enfermedad.

Por lo tanto, el problema de investigación estará encaminado a responder la siguiente pregunta: ¿Existen cambios en la región que codifica para la proteína Gag relacionados con resistencia a los IP, y difieren estos entre las variantes genéticas que circulan en la epidemia cubana?

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

Caracterizar genéticamente la región que codifica para la proteína Gag de las variantes virales cubanas del VIH-1 en pacientes con y sin resistencia a los inhibidores de la proteasa.

I.2.2. Objetivos específicos

1. Describir las características virológicas, clínicas y epidemiológicas de la población de estudio.
2. Identificar las variantes del VIH-1 en el gen *gag* para los grupos de estudio.
3. Caracterizar las mutaciones del VIH-1 presentes en el gen *gag* relacionadas con resistencia a los IP entre las variantes genéticas que circulan en la epidemia cubana.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Origen del VIH-1 y el VIH-2

El VIH y el virus de inmunodeficiencia de los simios (VIS) son miembros del género *Lentivirus*. El VIS se ha aislado de más de veinte especies de primates africanos (19). El VIH-1 está más estrechamente relacionado con el virus de la inmunodeficiencia de los chimpancés (SIVcpz, del inglés, *chimpanzee Lentivirus simian immunodeficiency virus*), el cual infecta, fundamentalmente, algunas sub-especies de chimpancé (*Pan troglodytes troglodytes* y *Pan troglodytes schweinfurthii*) que habitan en África ecuatorial oeste y central, respectivamente) (19). El VIH-2 está más estrechamente relacionado con el virus de inmunodeficiencia de los simios mangabey tiznados (VISsmm) (19, 20), el cual se encuentra en una alta prevalencia en dichos monos (*Cercocebus atys*). 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 a los humanos, transformándose en VIH-1 (21, 22).

II.2. Historia

A finales de la década del 70 e inicios de los 80s, se reportaron en Estados Unidos y Europa, casos de individuos previamente saludables que mostraban síntomas de disfunción inmunológica. El nuevo e inusual síndrome fue caracterizado por linfadenopatía generalizada, infecciones oportunistas (típicamente neumonía por *Pneumocystis carinii*, retinitis asociada con citomegalovirus y meningitis criptocócica) y una variedad inusual de cánceres (linfoma no Hodgkin y sarcoma de Kaposi). Como hallazgo de laboratorio se observaba que todos estos individuos mostraban una marcada depleción del grupo de diferenciación celular de linfocitos TCD4⁺ (del inglés, *cell cluster of differentiation*) en sangre periférica (23). La comunidad médica fue la primera en prestarle atención a esta enfermedad en junio de 1981 cuando el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC, del inglés, *Centers for Diseases Control and Prevention*) reportó la existencia en California de cinco hombres con una inmunodeficiencia severa en el *Morbidity and Mortality Weekly Report* (23). Esta notificación fue seguida por numerosos reportes que describían a

homosexuales y usuarios de drogas intravenosas con afecciones del sistema inmune caracterizadas por la pobre respuesta de los linfocitos T ante la presencia de un antígeno o la estimulación con mitógenos en ensayos funcionales. Pocos meses después se observó que un síndrome de inmunodeficiencia similar estaba afectando también a otros grupos, incluyendo hemofílicos, receptores de transfusiones de sangre, inmigrantes haitianos con poco tiempo en el país y más significativamente parejas sexuales o niños, miembros de los diferentes grupos de riesgo (23).

El patrón epidemiológico que estaba emergiendo sugería que la nueva enfermedad era producida por un nuevo patógeno que se transmitía a través de la sangre o por contacto sexual con un individuo previamente infectado. Entre finales de 1981 y principios de 1983, se sugirió una variedad de microorganismos como posibles agentes causales del sida, como fue llamada posteriormente esta enfermedad (23). En la primavera de 1983, Montagnier y sus colegas del Instituto Pasteur en París, reportaron el aislamiento de un agente, aislado de los nódulos linfáticos de un individuo asintomático, el cual presentaba una linfadenopatía de origen desconocido. Durante la replicación en cultivos celulares, el virus asociado a linfadenopatía (LAV, del inglés, *lymphadenopathy associated virus*), se relacionó con altos títulos de progenie viral, que contenía actividad reverso transcriptasa dependiente de magnesio (Mg) y por microscopía electrónica se observaron características típicas de los retrovirus. Sin embargo, a diferencia de los retrovirus comúnmente estudiados, como el virus de la leucosis aviar (ALVs, del inglés, *avian leukosis virus*) y los virus de la leucemia murina y felina (MLVs y FeLVs, del inglés, *murine and feline leukemia viruses*), LAV fue altamente citopático en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), específicamente destruyendo linfocitos TCD4+ en cultivos celulares (23). Gallo y sus colegas del Instituto Nacional de Salud en Waterbury, Connecticut, en Estados Unidos, reportaron el aislamiento de un retrovirus, de un paciente sida, el cual fue denominado virus linfotrópico de las células T humanas tipo III (HTLV-III, del inglés, *human T-cell leukemia virus type III*) y se obtuvo la primera evidencia serológica que relacionaba al LAV con la inmunodeficiencia que mostraban los individuos de los grupos de riesgo (23). Se determinó que los virus identificados por ambos grupos de investigadores eran similares. El nuevo retrovirus, relacionado con el sida en los Estados Unidos, Europa y África Central y que exhibía características morfológicas y genéticas típicas del

género *Lentivirus*, fue nombrado VIH-1 (23). En 1986 un retrovirus relacionado, pero inmunológicamente diferente a VIH-1, fue recobrado de individuos que residían en varios países del oeste africano, como Senegal, Costa de Marfil y Guinea Bissau, dicho virus fue nombrado VIH-2 (23).

II.3. Clasificación

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae* que son un grupo extenso y diverso de virus encontrados en todos los vertebrados. Estos virus tienen la capacidad de replicarse a través de un extraordinario y único ciclo de vida que los diferencia de otros virus. Su genoma está compuesto por ARN de simple cadena. Los retrovirus fueron originalmente clasificados teniendo en cuenta la morfología de la cápside. Las partículas virales son esféricas y están rodeadas por una envoltura que consiste en una membrana lipídica, compuesta de proyecciones de glicoproteínas. La forma y la posición de la nucleocápside han sido históricamente usadas como mayor criterio de clasificación de los géneros. Los tipos de partículas son cuatro (A, B, C y D) (24) y se considera que el VIH se acerca más a las partículas del tipo C, que se caracterizan por ensamblar la cápside a nivel de la membrana citoplasmática, pero difieren de otros virus de este mismo tipo en el aspecto tubular de dicha cápside (25).

Esta vieja clasificación fue utilizada en definiciones parciales de varios géneros de la familia *Retroviridae*, pero el número de géneros ha sido nuevamente expandido sobre la base de nuevos criterios. Los géneros han recibido nuevos nombres y han sido formalizados por el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus, clasificándolos en retrovirus simples y complejos. Dentro de los retrovirus simples se encuentran, los alfaretrovirus, betaretrovirus y gammaretrovirus, que codifican solo para los productos de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, mientras que los deltaretrovirus, epsilonretrovirus, lentivirus y espumavirus son considerados complejos y codifican para los productos de estos mismos genes y para un pequeño grupo de genes regulatorios con un amplio rango de funciones (24).

El VIH pertenece a la subfamilia *Lentivirinae* que proviene del latín *lentus* que significa lento. Estos virus se mantienen latentes y continúan replicándose muchos años antes de aparecer signos de la enfermedad (26).

II.4. Estructura del virión

El VIH se caracteriza por poseer la enzima transcriptasa inversa, capaz de sintetizar ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir del ARN viral. Es un virión envuelto que posee una estructura esférica, con un diámetro aproximado entre 100 y 120 nanómetros (nm), dentro de la cual se pueden diferenciar tres capas:

Capa externa o envoltura: formada por una membrana lipídica, donde se insertan las glicoproteínas gp 120 (glicoproteína de superficie) y gp 41 (glicoproteína de transmembrana) y proteínas derivadas de la célula huésped, entre las que se encuentran la β -2 microglobulina y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MHC I y II, del inglés, *major histocompatibility complex*) (Figura 1).

Cápside icosaédrica: formada por la proteína p24.

Capa interna o nucleoide: Contiene las proteínas p24, p7 y p6 que empaquetan dos moléculas de ARN genómico, además de las enzimas (PR, p11), TI (p66 y p51) e integrasa (IN, p32).

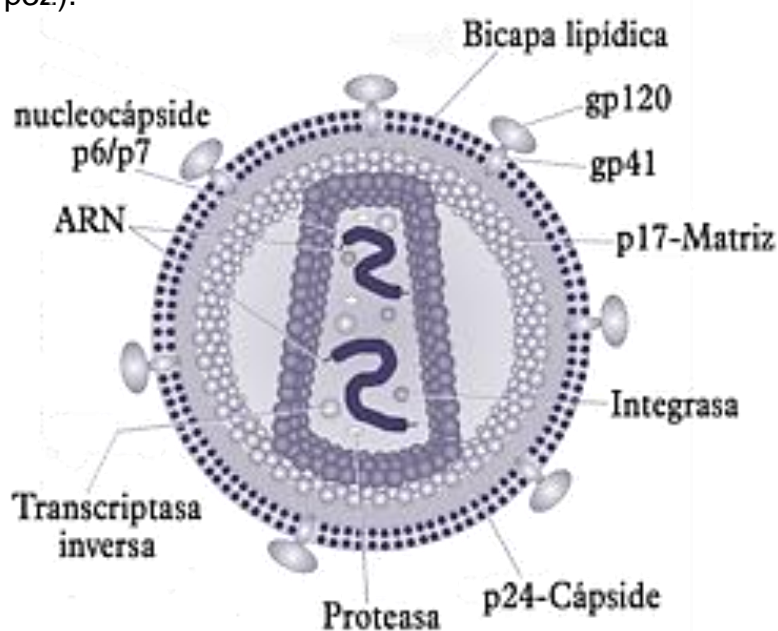


Figura 1. Estructura de la partícula del VIH-1. **Fuente:** (27).

II.5. Estructura del genoma

El genoma de VIH es de aproximadamente 9,2 kb de longitud y la organización básica de ácidos nucleicos en la misma tiene las características de todos los retrovirus conocidos (Figura 2).

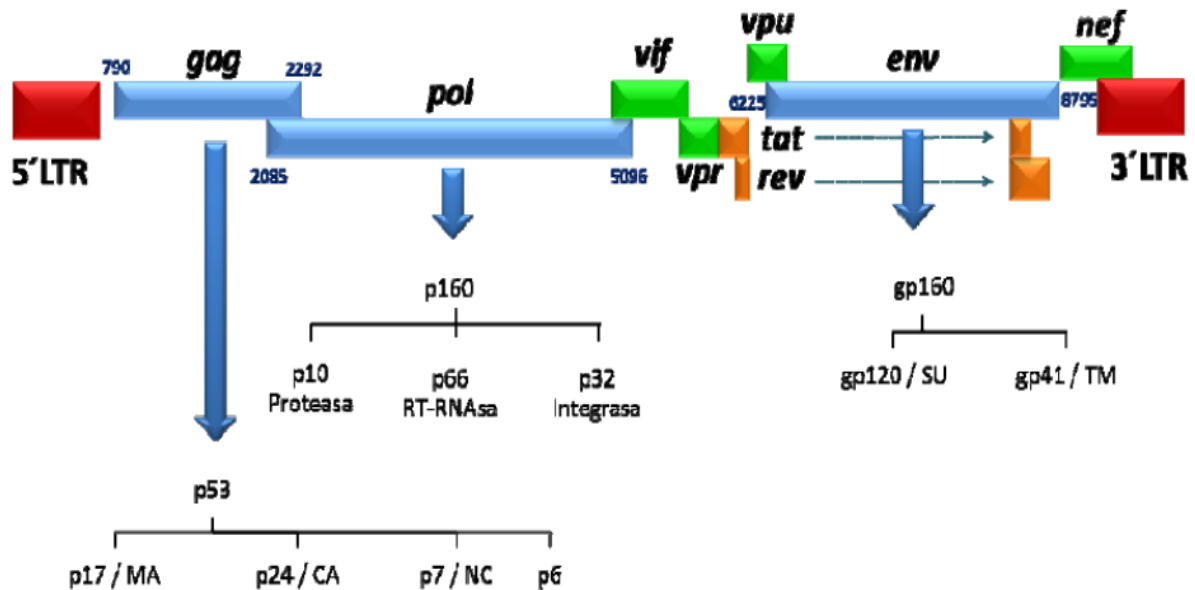


Figura 2. Organización del genoma de VIH-1. **Fuente:** (28)

El genoma viral codifica para nueve genes: estructurales (*gag*, *pol* y *env*), reguladores (*tat*, *rev*) y accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*), cuyos productos son encargados de la replicación viral y la evasión de la respuesta inmune del hospedero. El gen del antígeno específico de grupo (*gag*) codifica el precursor de la poliproteína Gag (Pr55Gag: Gag), mientras que el precursor de la poliproteína Gag-Pol se expresa mediante el cambio de marco ribosómico entre los genes *gag* y *pol*. Finalmente, el gen *env* codifica las glicoproteínas de la envoltura viral (Figura 2). Todas estas proteínas orquestan el ciclo celular viral del VIH-1, lo que provoca redundancia en las células huéspedes infectadas, principalmente en los linfocitos T CD4+.

Las secuencias terminales largas repetidas (terminal larga repetida: LTR, (del inglés, *long terminal repeat*) que se encuentran en los extremos 5' y 3', son las encargadas de regular la expresión de los genes virales, de la integración del genoma viral al genoma del hospedero y de la replicación viral. El gen *gag* codifica para las proteínas estructurales: nucleoproteína, proteína de la cápside y proteína de matriz. El gen *env* codifica para las glicoproteínas de la envoltura gp 120 y gp 41, las cuales están unidas

entre sí por un enlace no covalente. El gen *pol* codifica para las enzimas TI, PR, e IN, las cuales son necesarias para la replicación viral, (29).

II.6. Ciclo replicativo de VIH-1

Ciclo replicativo del VIH-1. Los viriones maduros se unen a la superficie de una célula diana mediante la interacción entre las subunidades gp 120 de los trímeros virales de Env y el CD4 y correceptor del huésped (CCR5 o CXCR4). Las subunidades gp 41 de Env desencadenan la fusión de las membranas viral y celular del huésped, y la cápside entra al citosol. La transcripción inversa se produce a medida que la cápside se desplaza hacia la envoltura nuclear, donde se importa al núcleo en un estado casi intacto. La transcripción inversa se completa en el núcleo, seguida de la desprotección de la cápside y la integración del ADN viral en el genoma del huésped. La transcripción del ADN proviral conduce a la expresión de las proteínas del VIH-1, incluyendo las poliproteínas Gag y Gag-Pol. Estas proteínas estructurales se dirigen a la lámina interna de la membrana plasmática, donde forman subunidades hexaméricas que se ensamblan en una red curva asociada a la membrana. Los dímeros de ARN genómico viral se reclutan en estos sitios de ensamblaje y los trímeros de Env se incorporan a las partículas en gemación. La escisión de la membrana y la liberación de partículas se facilitan mediante el reclutamiento de los complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte (ESCRT), mediado por el dominio Gag-p6. Simultáneamente con la liberación de partículas, la proteasa (PR), que se empaqueta en los viriones como parte de la poliproteína Gag-Pol, escinde las poliproteínas Gag y Gag-Pol en sus proteínas maduras individuales. Los monómeros CA recién liberados forman hexámeros y pentámeros que se ensamblan en la cápside madura, dando lugar a una partícula infecciosa madura. Se indica el sitio de acción de los fármacos antirretrovirales (ARV) aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés, *Food and Drug Administration*) (FDA). Se proporcionan detalles adicionales en el texto principal. Las proteínas virales no se muestran a escala (Figura 3) (30).

Luego de la transcripción, varios genes y proteínas virales son sintetizados en el citoplasma. La proteasa interviene en el procesamiento postransduccional de las poliproteínas Gag y Gag-Pol. Un complejo de nucleoproteínas que incluyen las proteínas de la cápside codificadas por el gen *gag* y las enzimas codificadas por el gen

pol, participan en el ensamblaje de la partícula viral, que comienza con el empaquetamiento del ARN transcrito a partir del ADN proviral. Este complejo de nucleoproteínas emerge de la membrana plasmática expresando el gen *env* y glicoproteínas del hospedero que forman parte de esta envoltura (29). La proteína TAT es necesaria para la expresión de los genes virales y actúa potenciando la producción de ARN mensajero. La proteína REV por su parte inicia el cambio de expresión de genes tempranos a tardíos, promoviendo la exportación del ARN fuera del núcleo (29). El virus abandona la célula por un mecanismo de gemación y se efectúa la maduración de la partícula viral fuera de la célula (31).

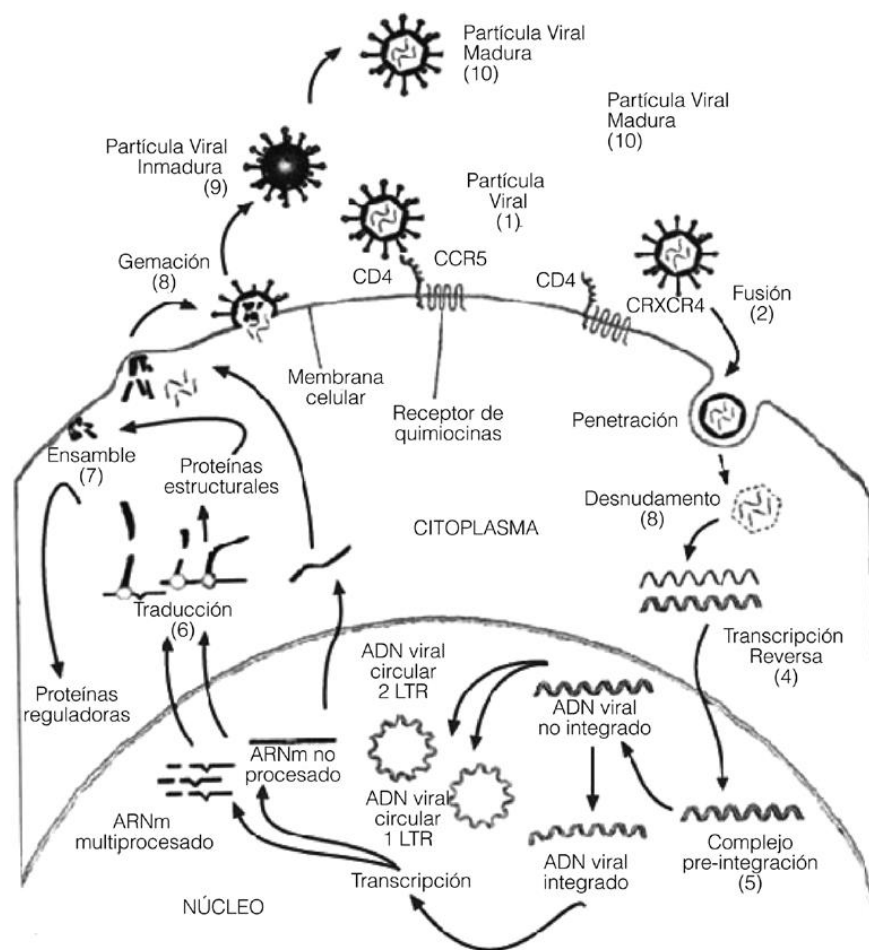


Figura 3. Ciclo replicativo de VIH-1. **Fuente:** Reyes-Chilpa, Ricardo (28, 32).

II.7. Historia natural de la enfermedad

La historia natural de la infección por el VIH-1 está constituida por fenómenos biológicos y clínicos que se producen desde el momento de la infección hasta el fallecimiento del paciente, sin que medie intervención terapéutica (31).

La infección por VIH-1 podemos dividirla en tres etapas sucesivas: (1) primoinfección, (2) infección persistente asintomática, (3) infección sintomática. La última se divide en dos fases: la fase precoz (complejo relacionado con el sida) y otra tardía (sida) (33).

La primoinfección se caracteriza por un cuadro febril autolimitado (síndrome retrovítico agudo) y alto nivel de replicación viral que disminuye al generarse la respuesta inmune, regresando el cuadro clínico (34). Esta sintomatología se observa en un 30-70 % de los individuos infectados; en el resto, cursa de manera asintomática. Esta fase dura entre dos y tres semanas a partir de las cuales el virus queda integrado en sus células hospederas iniciándose entonces la infección asintomática (35).

La actividad vigorosa del sistema inmune proporciona una amplia demanda de LTCD4⁺ para facilitar la replicación del VIH-1, aunque existen datos de estudios en animales y humanos que sugieren que la activación de células T no es un requerimiento absoluto para la infección (33). Cuando la viremia alcanza su valor más alto, el conteo de células TCD4⁺ disminuye notablemente. Existen hipótesis acerca de un balance en la producción y destrucción de viriones, con el regreso parcial del conteo de células TCD4⁺ a los límites normales, hecho que no es absoluto, ya que se ha demostrado la correlación inversa del mismo con el tiempo de progresión de la enfermedad (36).

En un término de semanas a meses (120 días en una cohorte), el hospedero logra una vigorosa respuesta inmune, que parcialmente consigue controlar la replicación viral, estableciéndose entonces la etapa asintomática (37). De manera general este período tiene una duración de entre ocho a 10 años (38).

De esta forma el hospedero entra en una larga fase asintomática en la que la viremia persiste y billones de virus son producidos y las células TCD4⁺ son destruidas a diario. Finalmente, ocurre la progresión de la enfermedad (etapa sida) que se caracteriza por un constante aumento de la viremia, la disminución del conteo de células TCD4⁺ y por último, una profunda inmunosupresión con la aparición de las infecciones oportunistas y neoplasias que lo caracterizan (36).

Las manifestaciones clínicas de la infección por el VIH-1 varían en dependencia del estado de la enfermedad. En 1993 el CDC, propuso un sistema de clasificación para los estadios de la enfermedad, teniendo en cuenta el conteo de linfocitos TCD4⁺ y categorías clínicas de la infección. La latencia clínica no se acompaña de una latencia virológica, existiendo una marcada interacción entre el VIH-1 y el sistema inmunológico del paciente durante este período (39).

Basado en estudios longitudinales de individuos infectados se han observado tres formas de progresión de la infección y que incluyen los progresores típicos (PT), los progresores rápidos (PRap) y los no progresores (NP) (36).

Aproximadamente, el 10 % de los pacientes infectados por el VIH progresan a sida en los dos o tres primeros años de la infección (progresores rápidos). Entre un 5 % y un 10 % permanecen asintomáticos entre los 10 y 15 años de la infección y mantienen una cifra de linfocitos TCD4⁺ por encima de 500 células/mL (no progresores a largo plazo). El resto de los pacientes (progresores normales) desarrollan sida alrededor de los 10 años de infectados (40).

En la patogenia de la infección/enfermedad influyen, factores dependientes del hospedero, del virus y del ambiente. Entre los primeros se destacan la respuesta inmune, la activación celular, el papel de las citoquinas, los receptores celulares, así como factores genéticos de los individuos (deleción del correceptor CCR5, tipos de HLA), etc. Dentro de las características del virus se destacan las características biológicas (tropismo o fenotipo viral), la capacidad replicativa, la variante o subtipo viral infectante, entre otras. Entre los factores dependientes del ambiente están la orientación sexual, número de parejas sexuales, uso de condón, hábitos alimenticios, hábitos tóxicos, entre otros. En cierta manera la progresión de la enfermedad supone el equilibrio entre los factores inductores/supresores y la forma en que se afecta la replicación del virus (41).

II.8. Variabilidad genética de VIH-1

El VIH-1 es altamente variable genéticamente, debido a tres factores fundamentales; carencia de actividad correctora de errores de la enzima reverso transcriptasa, tiempos cortos de replicación y recombinación genética (42). Está compuesto por cuatro grupos fundamentales; M (*Major*), O (*Outlier*), N (*non M, non O*) y último en identificarse, el

grupo P (*Pending*). Los virus pertenecientes al grupo M son los mayores responsables de la epidemia a nivel global, este grupo cuenta con nueve subtipos genéticos (A, B, C, D, F, G, H, J y K), más de 158 CRFs y numerosas URFs (43, 44).

Las formas recombinantes circulantes son el resultado de una infección con diferentes subtipos, donde el genoma de los mismos se combina. Para que estos recombinantes sean reconocidos como circulantes y clasificados como CRFs, deben transmitirse y propagarse dentro de una población. Estos virus deben ser aislados como mínimo de tres individuos que no estén vinculados, dos deben ser secuenciados completamente y otro parcialmente. La designación cpx (del inglés, *complex*), se usa cuando hay presente más de tres subtipos. Las URFs, consisten en la mezcla de subtipos, pero a diferencia de las CRFs, estas provienen de individuos relacionados epidemiológicamente, provienen de un único individuo o son virus recombinantes que no se han definido aún como CRF (44).

Desde el inicio de la epidemia, 88,4 millones de personas contrajeron la infección por el VIH y 42,3 millones de personas fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el sida. Las nuevas infecciones se han reducido en un 60 % desde el pico máximo en 1996 y un 39 % desde 2010. Según estimaciones de ONUSIDA, en 2023 aproximadamente 39,9 millones de personas vivían con VIH/sida en todo el mundo, de las cuales 2,3 millones residían en América Latina. A finales de diciembre de 2023, aproximadamente 30,7 millones de personas accedían al tratamiento antirretroviral, con respecto a los 7,7 millones que lo hacían en 2010, pero todavía por debajo del objetivo de 34 millones que se proponían lograr para 2025. Como resultado de lo anterior, desde el pico alcanzado en 2004, los casos de muertes relacionadas con el sida se han reducido en más de un 69 %, y en un 51 % desde 2010. La mortalidad por el sida ha disminuido un 56 % entre las mujeres y niñas y un 47 % entre hombres y niños desde 2010. En 2023, el 86 % de todas las personas que vivían con el VIH conocía su estado serológico. Entre las personas que conocían su estado serológico, el 89 % tenía acceso al tratamiento. Entre las personas que tenían acceso al tratamiento, el 93 % había logrado la supresión viral (2).

La 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 el P solo se han encontrado en Camerún (45).

II.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 formas recombinantes contribuye ampliamente a esta diversidad, la que se vislumbra en aumento con la diseminación de subtipos a nivel global (46).

A nivel mundial, las CRF/URF representaban el 29 % de las cepas de VIH-1, seguidas del subtipo C (23 %) y el subtipo A (17 %). Entre los estudios que informaron sobre el desglose por subtipos en poblaciones clave, se identifica el 62 % de las infecciones por VIH entre los HSH y el 38 % entre las personas que se inyectan drogas, y las infecciones fueron del tipo CRF/URF. América Latina y el Caribe mostró un aumento del 25 % en otras CRF (excluidos los CRF01_AE o CRF02_AG) entre los periodos 2010-2015 y 2016-2021 (47).

II.8.2. Epidemiología en Cuba

Para el año 2023 en Cuba estaban viviendo con VIH unas 32 758 personas, de las cuales 80,4 % eran hombres. Dentro de los masculinos predominaban los hombres que tienen sexo con otros hombres (89,9 %). La prevalencia estimada era de 0,38 % entre las personas de 15 a 49 para un total de 8 421 fallecidos. El MINSAP (registro informatizado VIH/sida), reportó que el 79,7 % de las personas viviendo con VIH conocían su diagnóstico; de ese grupo, el 97,5 % están recibiendo TARVAE y se alcanza la supresión virológica en el 88,9 %. En cuanto a la distribución geográfica por provincias, la prevalencia más alta se concentra en La Habana (0,79 %), Santiago de Cuba (0,43 %) y el municipio especial Isla de la Juventud (0,39 %), según el Informe anual vice dirección de Higiene y Epidemiología, MINSAP (comunicación personal del Dr. Manuel Romero, Jefe del programa para el control de las ITS/VIH/sida y Hepatitis virales).

Los diferentes estudios realizados de la epidemia cubana identifican que los subtipos B, CRF19_cpx, CRF_BG (20, 23, 24) y CRF18_cpx, siguen siendo los más

prevalentes, destacándose un incremento de los recombinantes únicos (URF), resultado de la circulación de diferentes subtipos en el país (48, 49).

II.9. Tratamiento antirretroviral

Desde la aparición del VIH y el sida a principios de la década de 1980, el desarrollo de terapias seguras y eficaces ha estado ligado a la comprensión de los procesos fundamentales que impulsan la biología del VIH. A medida que las investigaciones básicas permiten el desarrollo de nuevas terapias, los inhibidores del VIH se utilizan para investigar los mecanismos básicos de la replicación, transmisión y patogénesis del virus. Este ciclo de retroalimentación positiva lleva al desarrollo de una terapia antirretroviral combinada altamente efectiva, que ayuda a detener la progresión al sida, prolongar las vidas y reducir la transmisión del virus (17).

Tras el descubrimiento del primer fármaco anti-VIH-1, la zidovudina, en 1987, numerosos agentes que actúan como inhibidores de la transcriptasa inversa, la integrasa, la entrada (unión, fusión, post-unión), la proteasa y la cápside, así como los potenciadores farmacocinéticos han transformado el impacto del VIH-1/sida de un trastorno mortal devastador a una infección crónica manejable (28).

El uso combinado de estos agentes, denominado terapia antirretroviral combinada (cTAR, TAR, anteriormente terapia antirretroviral de gran actividad (TARVAE) o terapia cóctel), marcó un punto de inflexión para mejorar el pronóstico de la enfermedad. El régimen de tres fármacos con uno/dos inhibidor/s de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido/nucleósido (ITIAN) de doble cadena, un fármaco central compuesto por inhibidores de la transferencia de la cadena de la integrasa (IIN), inhibidores de la proteasa potenciados (IP/r), inhibidores de la unión, inhibidores de la fusión o inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINAN) se ha convertido en el pilar del tratamiento inicial del VIH-1. Además, la combinación de tres fármacos en dosis fija, una vez al día, en una sola tableta es uno de los hitos claves, ya que facilita la reducción de la cantidad de comprimidos y la frecuencia de dosificación, así como una mejor adherencia. Los principales obstáculos de la terapia actual son los reservorios latentes persistentes, los problemas de adherencia, la fármacorresistencia, las opciones limitadas de tratamiento para la resistencia multiclase, las interacciones farmacológicas, la disponibilidad limitada de fármacos en países pobres y el alto coste

del régimen de tratamiento de por vida. También preocupan los efectos adversos, como los eventos cardiovasculares, la resistencia a la insulina y la diabetes tipo II, la disfunción renal, la hepatotoxicidad, la lipodistrofia, las toxicidades gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarrea), la erupción cutánea, el dolor crónico y las toxicidades del sistema nervioso central (28).

II.10. Resistencia a los antirretrovirales

La principal causa del fracaso del tratamiento antirretroviral del VIH-1 es el desarrollo de resistencia a los fármacos. La rápida fijación de mutaciones de escape en respuesta al tratamiento, con una terapia de supresión incompleta o una terapia con una baja barrera genética de resistencia, son los ejemplos clásicos de selección natural. Sin embargo, los procesos evolutivos que aumentan la resistencia y seguidamente la adquisición de mutaciones de resistencia no son para nada simples. Aunque algunas mutaciones pueden reducir dramáticamente la capacidad replicativa de variantes resistentes, en comparación con el tipo salvaje cuando no hay tratamiento, muchas pueden tener efectos menores sobre la capacidad del virus para replicarse (50).

La potencia de los ARVs puede verse seriamente comprometida ante la presencia de resistencia. La terapia está diseñada para que se utilice una combinación de ARVs de diferentes clases. En el caso de los no análogos, es frecuente la resistencia cruzada, por lo que una mutación puede conferir resistencia a una droga o al resto de los medicamentos de la clase (50).

El acceso limitado a los ARVs en algunas partes del mundo, los niveles sub-óptimos de adherencia, resistencia y el fallo de terapia, son algunos de los problemas existentes a los que hay que prestarle atención en el manejo del paciente con VIH (50).

II.10.1. Resistencia a los inhibidores de la proteasa

El conocimiento estructural detallado de la PR del VIH y su sustrato condujo al desarrollo de los inhibidores específicos de la proteasa (IP). Todos los IP, con excepción del tipranavir, son inhibidores peptidomiméticos competitivos que imitan el sustrato natural de la proteasa viral. Los inhibidores peptidomiméticos contienen un núcleo de hidroxietileno que impide su escisión por la proteasa. En lugar de un núcleo de hidroxietileno, el tipranavir contiene un anillo de dihidropirona como andamiaje

central. En general, todos estos compuestos se han diseñado para unirse a la región de unión al sustrato del dímero de la proteasa madura con alta afinidad, pero tienden a ocupar más espacio que el sustrato natural. En el caso del tipranavir y el darunavir, se ha demostrado que presentan un doble mecanismo de inhibición, ya que también impiden la dimerización de la proteasa viral. Esto podría contribuir a su potencia antiviral y a su alta barrera genética frente a la resistencia, aunque aún no se ha dilucidado el impacto de la actividad antidimerizadora (51).

Los IP se encuentran entre los fármacos antirretrovirales más activos que se utilizan actualmente en el tratamiento de la infección por VIH. Estos compuestos, que imitan los sustratos naturales de Gag y Gag-Pol de la proteasa del VIH, inhiben la actividad proteolítica de la enzima y ejercen un potente efecto inhibitor sobre la replicación del VIH tanto *in vitro* como *in vivo*. En la mayoría de los pacientes tratados, las combinaciones de fármacos antirretrovirales que incluyen IP dan como resultado la supresión completa de la replicación activa del VIH y una notable recuperación de la inmunodeficiencia y reducción de la mortalidad relacionada con el sida. Sin embargo, al igual que con todos los demás fármacos antirretrovirales, el fracaso de los IP para suprimir completamente la replicación del VIH conduce al desarrollo de resistencia viral. Una característica única de la resistencia del VIH a los IP es el hecho de que las mutaciones de resistencia no solo surgen en la propia proteasa (el objetivo directo de los inhibidores), sino también en algunos de los sustratos naturales de la proteasa (los sitios de escisión de Gag).

II.11. La proteasa del VIH-1 y sus sustratos naturales

La proteasa del VIH es necesaria para escindir las poliproteínas Gag y Gag-Pol en sus productos proteicos funcionales finales, lo que da lugar al ensamblaje de una partícula viral completamente madura e infecciosa. La proteasa se codifica como parte de la propia poliproteína Gag-Pol y se activa tras un proceso de dimerización que solo es posible en sitios con alta concentración de poliproteínas Gag-Pol, esencialmente en el sitio de ensamblaje y gemación del virión. El dominio de la proteasa se escinde a sí mismo de la poliproteína Gag-Pol para constituir un homodímero ensamblado simétricamente, en el que el sitio de unión al sustrato es una cavidad central simétrica, igualmente definida por cada una de las dos subunidades del homodímero. La escisión

proteolítica de las poliproteínas Gag y Gag-Pol por la proteasa puede considerarse como un cambio en la configuración de las poliproteínas que favorece el ensamblaje y la gemación en la superficie celular a una configuración que promueve el reensamblaje de una estructura de cápside madura libre que puede liberarse al citoplasma de la célula diana, donde entregará la maquinaria replicativa completamente funcional del virus. El ensamblaje adecuado de esta estructura de la cápside madura requiere que la escisión de las poliproteínas Gag y Gag-Pol por la proteasa se produzca de forma ordenada y controlada (52-54) .

El primer evento de escisión separa la proteína de la nucleocápside (NC) de la proteína de la cápside (CA) de un péptido enlazador de 14 aminoácidos denominado SP1 (péptido espaciador 1, anteriormente denominado p2). A continuación, la proteína CA se separa de la proteína de la matriz (MA), que permanece asociada a la membrana del virión. Este evento es casi simultáneo a la liberación de la proteína Gag p6 C-terminal, de otro péptido enlazador ubicado entre NC y p6, denominado SP2 (péptido espaciador 2, anteriormente denominado p1). Finalmente, los dos péptidos enlazadores SP1 y SP2 se recortan de las proteínas CA y NC, respectivamente. El péptido espaciador SP1 parece desempeñar un papel importante en la maduración general de Gag(55, 56) y en la regulación adecuada de la escisión ordenada de Gag por la proteasa (54, 57), sin embargo, el papel de SP2 sigue sin estar claro. Un factor importante en la escisión ordenada de Gag por la proteasa es la secuencia de aminoácidos de los sustratos del sitio de escisión (58). Estos sustratos naturales están constituidos por siete aminoácidos, cuya posición relativa al enlace peptídico escindido se designa del extremo N al C: P4-P3-P2-P1/P1'-P2'-P3', y la escisión ocurre entre P1 y P1' (58). La secuencia de aminoácidos de los diferentes sustratos del sitio de escisión dentro de Gag difiere notablemente de un sitio a otro, algunos sitios (más frecuentemente el sitio SP1/NC) son incluso notablemente polimórficos entre cepas clínicas de VIH-1 (16, 59-61). La diferencia en la secuencia de aminoácidos de estos diferentes sustratos explica al menos en parte, su tasa diferencial de escisión por la proteasa (52, 58). Curiosamente, a pesar de su marcada diversidad de secuencia, existe una fuerte similitud en la estructura tridimensional de estos péptidos en Gag (62, 63), lo que explica por qué todos constituyen sustratos fuertes y específicos para esta enzima, aunque con diferentes eficiencias de tasa de escisión (Figura 4).

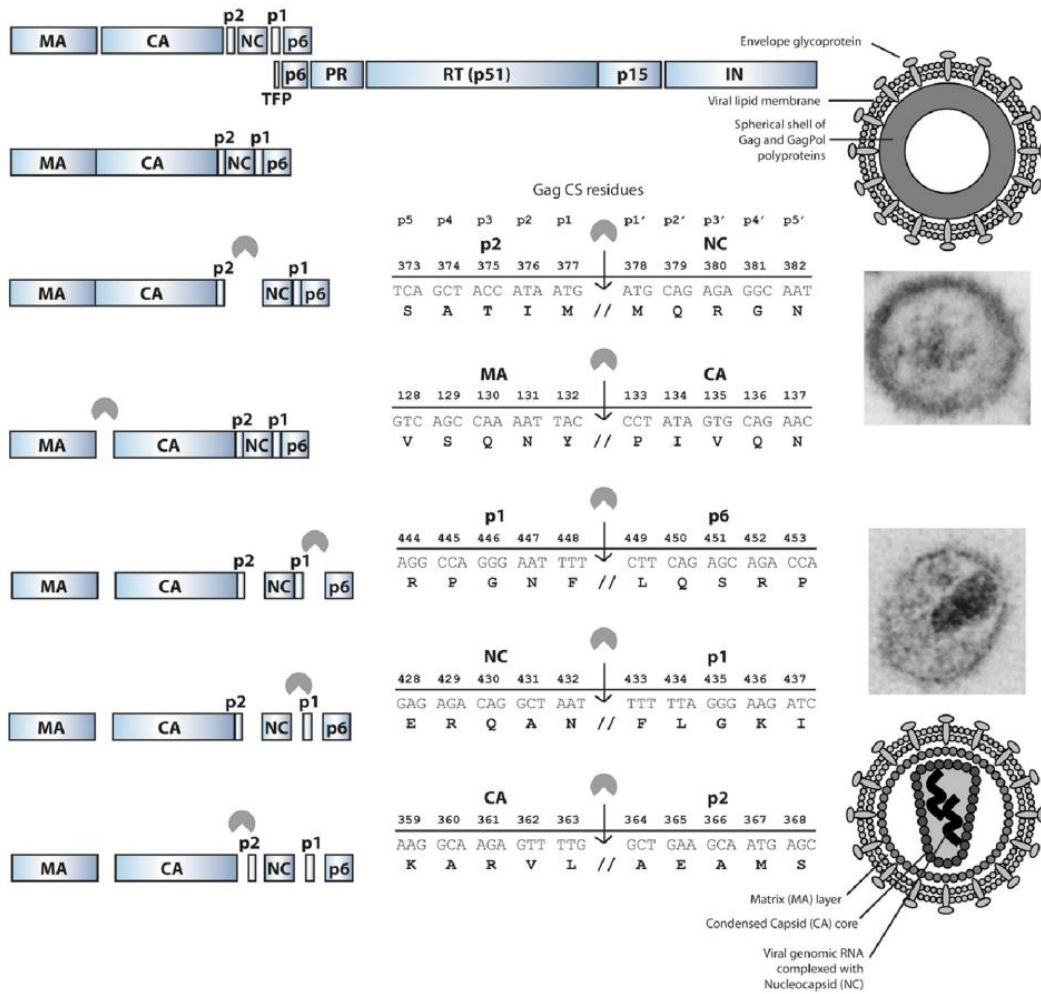


Figura 4. Representación esquemática de la maduración de partículas de VIH. En la parte superior, se muestra la poliproteína viral Gag-Pol. A la izquierda, se muestran los cinco pasos secuenciales del procesamiento proteolítico de Gag. En el centro, se ilustran los cinco sitios de escisión (SC) de Gag y sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes. Los números sobre los residuos corresponden a su posición en la poliproteína Gag. En la parte superior del panel central, se indica la ubicación de las posiciones p5-p5'. A la derecha, se exponen representaciones esquemáticas e imágenes de microscopía electrónica de una partícula de VIH. Arriba: la partícula inmadura, no infecciosa, con su núcleo granuloso. Abajo: el virión completamente maduro e infeccioso con su característico núcleo cónico denso en electrones. **Fuente:** (64).

II.11.1 Resistencia del VIH a los IP: mutaciones de la proteasa

La resistencia del VIH a los IP es consecuencia de la acumulación de sustituciones de aminoácidos en la proteasa. Durante el escape viral *in vitro* o *in vivo*, las mutaciones

se acumulan gradualmente, lo que lleva a un aumento progresivo del nivel de resistencia (65, 66). Algunas mutaciones afectan a aminoácidos que son parte integral del dominio de unión al sustrato de la enzima: estas mutaciones, a menudo denominadas mutaciones primarias, generalmente inician el proceso de evolución de la resistencia y pueden diferir de un IP a otro. Una de las mutaciones primarias más características es la sustitución de valina por alanina en la posición 82 de la enzima (V82A), que se observa en la mayoría de los virus que han desarrollado resistencia a varios IP. Es llamativo que esta mutación modifica un fuerte punto de contacto entre la enzima y los inhibidores, pero solo uno de los dos residuos de valina en la posición 82 en la proteasa homodímera es importante para el contacto con los sustratos naturales (67). Posteriormente, se seleccionan mutaciones secundarias, que involucran aminoácidos ubicados lejos de la cavidad de unión al sustrato. Estas mutaciones secundarias son menos específicas del fármaco que las mutaciones primarias, no obstante son críticas para alcanzar altos niveles de resistencia. Tanto las mutaciones primarias como las secundarias modifican la forma y el tamaño de la cavidad de unión del sustrato de la proteasa del VIH, reduciendo así la afinidad y el potencial inhibidor de los inhibidores (68-70).

En general, tanto las mutaciones de resistencia primaria como las secundarias parecen agrandar la cavidad de unión del sustrato de la proteasa (68). Este agrandamiento parece tener consecuencias más importantes en la unión de los inhibidores, la mayoría de los cuales dependen de una interacción fuerte y estrecha con el sitio activo de la enzima, que en la unión de los sustratos naturales de la proteasa en Gag y Gag-Pol. De hecho, los precursores de Gag y Pol interactúan menos estrechamente con la enzima (67, 70), una propiedad que es consistente con su escisión ordenada y regulada por la proteasa. Con unas pocas excepciones, los cambios fuertes y radicales en la afinidad del inhibidor no se pueden lograr mediante cambios únicos en la proteasa, y altos valores de resistencia requieren distorsiones sutiles del sitio de unión del sustrato que sean eficientes en términos de resistencia, y tolerables para la función enzimática.

II.11.2 Variación natural de los sitios de escisión de Gag

Hasta hace muy poco un número limitado de estudios había evaluado la variación natural dentro de Gag y sus sitios de escisión, y la mayoría de los datos provenían de

estudios centrados en el subtipo B del VIH. Los datos disponibles, sugieren que la variación en los subtipos no B es mayor que en el subtipo B. Todos estos estudios muestran que el grado de conservación difiere drásticamente entre las posiciones individuales de los aminoácidos, así como entre los diferentes CS en su conjunto. El sitio de escisión p2/NC es el más variable de los cinco sitios de escisión de Gag, seguido de P1/P6, NC/P1, CA/P2 y, finalmente, MA/CA, que es el CS más conservado en los aislados del subtipo B. Los aminoácidos en las posiciones 369 a 371 en P2 son importantes para la susceptibilidad a los inhibidores de la maduración que actúan en CA/P2 (71).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Tipo de investigación, universo y muestra

III.1.1. Diseño de estudio

Esta investigación forma parte de un proyecto de Ciencia y Técnica Asociado a Programas titulado: **Caracterización biológica y genética de cepas de VIH-1 de individuos cubanos (PS241LH005-015)** y fue aprobado por el Comité de Revisión de Ética Médica del IPK (CEI-IPK 02-18).

Se realizó un estudio analítico retrospectivo, de corte transversal para caracterizar genéticamente la región que codifica para la proteína Gag del VIH-1 en pacientes cubanos seropositivos con y sin resistencia demostrada a los IP. El estudio se desarrolló a partir de muestras de plasmas colectadas en el Laboratorio de Infecciones de Trasmisión Sexual (ITS) del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) en el período de enero del 2017 a enero de 2024.

III.1.2. Universo de estudio

El universo incluyó a todos los pacientes diagnosticados con VIH-1 que asistieron a la consulta de atención médica del IPK y que requirieron estudios de resistencia antirretroviral.

III.1.3. Muestras clínicas

Se empleó una selección de muestras de plasmas de pacientes infectados con VIH-1 a los que se le indicaron estudios de resistencia antirretroviral con y sin resistencia demostrada a los IP.

III.1.4. Criterios de inclusión

- Que los individuos tuvieran infección confirmada por VIH-1.
- Que los pacientes no hubieran recibido tratamiento al momento de la toma de la muestra y no tuvieran resistencia demostrada a los IP por ensayos de resistencia anterior.
- Que a los pacientes que hubieran recibido tratamiento se les identificara resistencia a los IP demostrada por ensayos de resistencia anterior.

- Que el laboratorio contara con el resultado de la secuencia del gen *pol* para el estudio de resistencia antirretroviral y el informe las variantes virales: B, C, CRFs_BG (20, 23, 24), CRF19_cpx y CRF18_cpx.

III.1.5. Criterios de exclusión

- Volumen de muestras insuficientes para realizar la prueba (menos de 1 mL de plasma).

III.1.6. Tamaño muestral

El tamaño muestral estuvo condicionado al número de muestras de pacientes que se recibieron en el período de estudio y que cumplieron con los criterios de inclusión.

III.2. Operacionalización de las variables

Tabla 1. Operacionalización de las variables epidemiológicas, clínicas y virológicas.

Variables	Tipo	Escala	Descripción
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	F M	Según sexo biológico.
Edad actual	Cuantitativa discreta por intervalos	<15 15-45 >45	Se tuvo en cuenta la edad cumplida en años al momento de la toma de muestra.
Edad al diagnóstico	Cuantitativa discreta por intervalos	<15 15-45 >45	Se tuvo en cuenta la edad cumplida en años al momento del diagnóstico de VIH.
Orientación sexual	Cualitativa nominal dicotómica	HSH HT	Disposición o conducta de mantener relaciones sexuales con personas de su propio sexo y/o del sexo opuesto.
Fecha de diagnóstico de VIH	Cualitativa nominal politómica	Mes y año	Mes y año de la fecha en que fue confirmado el diagnóstico
Fecha de la última prueba negativa a VIH	Cualitativa nominal politómica	Mes y año	Mes y año de la última prueba negativa a VIH
Carga viral de VIH-1	Cuantitativa discreta por intervalos	<1000 100-10000 >10000	Cantidad de partículas virales por mililitros de sangre (copias/mm ³) al diagnóstico de VIH y al momento de la toma de la muestra.
Conteo de células T CD4⁺	Cuantitativa discreta por intervalos	<200 200-350 >350	Conteo de linfocitos T CD4 ⁺ (células/mm ³) al diagnóstico de VIH y al momento de la toma de muestra.

Subtipo de VIH-1	Cualitativa nominal politómica	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, analizando los genes virales: genes <i>pol</i> y <i>gag</i>
Mutaciones en el gen gag	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Presencia de mutaciones que puedan estar relacionadas con el subtipo viral, la patogenicidad viral y la resistencia antirretroviral.
Terapia antirretroviral (TARVAE)	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Paciente con TARVAE, al momento de la toma de la muestra, con Inhibidores de la reverso transcriptasa análogos de nucleósidos, no análogos de nucleósidos y/o inhibidores de proteasas.
Mutaciones de Resistencia	Cualitativa Nominal dicotómica	Sí No	Presencia de mutaciones a ITIAN, ITINAN, IP, asociadas a resistencia a los ARV.

Abreviaturas: **VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana, **TARVAE:** terapia antirretroviral de alta eficacia, **ITIAN:** inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido, **ITINAN:** inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido, **IP:** inhibidor de la proteasa, **HSH:** hombres que tienen sexo con otros hombres, **HT:** heterosexual, **CRF:** forma recombinante circulante, **URF:** forma recombinante única.

III.3. Obtención de la información

La información clínica, epidemiológica, inmunológica y virológica de los pacientes en estudio se obtuvo de la orden clínica del momento de toma de la muestra, de la historia clínica del paciente y/o de la base de datos SIDATRAT (Base de datos de individuos seropositivos al VIH) (Tabla 1).

III.4. Aspectos éticos

Todos los procedimientos del estudio se desarrollaron según lo establecido por las guías de ética internacionales como la Declaración de Helsinki (72) y de las Normas del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (OMS-CIOMS) (73), y se sometieron a la evaluación y aprobación del Comité de Ética del IPK (CEI-IPK

03-25). Se cumplieron sus tres principios básicos: autonomía, beneficencia y justicia. Se garantizó el principio de confidencialidad del paciente.

La investigación forma parte del proyecto titulado “Caracterización biológica y genética de cepas de VIH-1 de individuos cubanos”, con código de inscripción 2105015 en la carpeta de proyectos del IPK.

III.4.1. Criterios para la retirada prematura de participantes en la investigación

No procede pues se emplearon solo las muestras clínicas colectadas como parte del seguimiento del paciente VIH-1 con sospecha de fallo terapéutico o con diagnóstico reciente, a los que se les indicó un ensayo genotípico de resistencia.

Relación riesgos/beneficios para los participantes en la investigación y para la comunidad involucrada: No procede ya que se emplearon solo las muestras clínicas como se indica en el párrafo anterior.

III.4.2. Criterios para la suspensión o terminación de la investigación como un todo

La investigación tuvo un periodo de duración de dos años y no se suspendió en ninguna de sus etapas pues el MINSAP garantizó los insumos para la vigilancia de esta entidad en el país.

III.4.3. Idoneidad del estudio

El Laboratorio de ITS fue el designado para realizar la investigación por las instancias de salud pública. El objetivo de esta investigación está plasmado en el Programa Estratégico Nacional (PEN) para el control de las ITS VIH/sida y las Hepatitis. Los resultados son de utilidad para el seguimiento del paciente tratado con fallo terapéutico. El laboratorio, cuenta con trabajos publicados en revistas de alto impacto y experiencia en este campo.

III.4.4. Consentimiento Informado

No procede ya que se emplearon solo las muestras clínicas colectadas como parte del seguimiento del paciente VIH-1 con sospecha de fallo terapéutico o con diagnóstico reciente, a los que se les indicó un ensayo genotípico de resistencia.

III.4.5. Almacenamiento de los datos

Todos los datos personales, clínicos, epidemiológicos y de laboratorio de cada paciente fueron almacenados en una base de datos con un único número de identificación.

Se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel versión 15.0, con todos los datos de la investigación a la que solo tuvo acceso el investigador implicado directamente en la investigación, y él personalmente completó el documento, garantizando la confidencialidad y seguridad de la información. Todas las bases de datos para los análisis finales de los resultados tuvieron solo códigos, nunca nombres.

III.5. Técnicas y procedimientos

III.5.1. Caracterización genética de los virus

III.5.1.1. Extracción del ARN viral

Se utilizó 1 mL de plasma por cada paciente y se centrifugó a 14 000 r.p.m durante 1 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 manual de ARN descrito por el fabricante, utilizando el estuche comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Alemania). El ARN extraído se conservó a -80 °C hasta su utilización en los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Controles: Como control positivo de las reacciones de PCR se emplearon muestras de plasma de pacientes positivos al VIH que previamente habían resultado positivas y se encontraban conservadas en el laboratorio de ITS, con cargas virales (CV) entre 1 000 y 10 000 copias/mL. Como control negativo se empleó agua de calidad para biología molecular.

III.5.1.2. Síntesis del ADN complementario (ADNc) y amplificación de la región *gag*

La síntesis del ADNc y la amplificación de un fragmento de 2 259 pb del gen *gag*, se realizó utilizando el estuche comercial *SuperScriptTM One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq High Fidelity* (InvitrogenTM, EE. UU.) con el empleo de las siguientes concentraciones:

- 25 µL de *Buffer 2X Reaction Mix*, (0,4 mM de cada dNTP y 2,4 mM de MgSO₄).

- 1 µL de cada cebador: KVL064 y KVL065 a 20 µM cada uno (Anexo 1).
- 8 µL de MgSO₄ a 5 mM.
- 1 µL de enzima *SuperScript™ III RT/Platinum® Taq High Fidelity* (Invitrogen™, EE. UU.).
- 0,25 µL de Protector de RNAsa (Roche, EE. UU.).

Finalmente, a esta mezcla se le agregaron 10 µL del ARN extraído para obtener un volumen final de reacción de 50 µL. La reacción de RT-PCR se realizó bajo las condiciones de ciclaje que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de ciclaje de la RT-PCR del gen *gag*.

Descripción	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	55°C	30 min
Desnaturalización inicial	94°C	2 min
10 ciclos		
Desnaturalización	95°C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	57°C	30 segundos
Extensión	68°C	2 min 30 segundos
40 ciclos		
Desnaturalización	95°C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	57°C	30 segundos
Extensión	68°C	2 min 30 segundos*
Fin de los ciclos		
Extensión final	72°C	1 min
Almacenamiento	4°C	12 h

* Incremento de 5s en cada etapa de extensión.

III.5.1.3. PCR anidada de la región *gag*

Para la PCR anidada se utilizó el estuche comercial *Expand High Fidelity PCR System* (Roche, EE. UU.), y se obtuvo un fragmento interno de 1 998 pb. A un primer tubo se le adicionó:

- 1 µL de cada dNTPs.
- 1,25 µL de cada cebador, KVL066 y KVL067 a una concentración de 20 µM cada uno (Anexo 1).

Se completó la primera mezcla con agua de calidad para PCR hasta un volumen de 23 µL.

La segunda mezcla se preparó con:

- 5 µL de *Expand Buffer* a 10X.
- 6 µL de MgCl₂ a 25 mM.
- 0,75 µL de *Expand HF Enzyme* (Roche, EE. UU.) a 3,5 U/µL.

Se completó la segunda mezcla con agua hasta completar un volumen de 25 µL.

Finalmente se adicionaron 2 μL del ADNc amplificado al tubo que contenía 23 μL de la mezcla uno. Luego se añadieron 25 μL de la segunda mezcla a cada tubo de reacción para obtener un volumen final de 50 μL .

Este protocolo, incluyendo la RT-PCR y la PCR anidada, fue descrito por Van Laethem y cols., en el año 2014 (14). Esta reacción se sometió al ciclaje descrito en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones en que se desarrollará la PCR anidada del gen *gag*.

Descripción	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	2 min
10 ciclos		
Desnaturalización	95°C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	58°C	30 segundos
Extensión	68°C	2 min 30 segundos
30 ciclos		
Desnaturalización	95°C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	58°C	30 segundos
Extensión	68°C	2 min 30 segundos *
Fin de los ciclos		
Extensión final	72°C	10 min
Almacenamiento	4°C	12 horas

III.5.1.4. Análisis de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa anidada

Para analizar el producto obtenido de la PCR anidada se tomaron 5 μL de la misma más 2 μL del indicador de corrida *Blue/Orange 6 X loading Dye* (Promega, EE. UU.) y se aplicaron en un gel de agarosa al 1 % teñido con *Gel Red™ Nucleic acid*, 10 000 X (BIOTIUM, EE.UU.). Este gel se sometió a una electroforesis horizontal en gel de agarosa con como tampón de corrida TBE 1X (0,4 M de Tris; 0,5 M de ácido bórico y 0,01 M de Ácido Etilén diamino tetracético (del inglés, *etilendiaminotetracetic acid*) (EDTA)). La corrida electroforética 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™* (Fisher, Reino Unido). 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, EE. UU.). Además, se utilizaron controles positivos (C+), constituidos por muestras de plasma que contenían VIH y que previamente fueron confirmadas, así como controles negativos (C-) constituidos por

agua de calidad para biología molecular, en vez de ADN. Ambos controles se incluyeron en cada ensayo desde el paso de la extracción del ARN con el objetivo de descartar posibles inhibiciones o contaminaciones en la PCR.

III.5.1.5. Purificación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa anidada

Los productos amplificados del gen *gag* se purificaron utilizando el estuche comercial *QIAquick® PCR Purification Kit* (Qiagen, Alemania), siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes.

III.5.1.6. Secuenciación de ácidos nucleicos por el método de Sanger

Para realizar la secuenciación nucleotídica del fragmento de 1 697 pb de gen *gag* se realizaron ocho reacciones de secuencia por cada producto de PCR anidada purificado, con el objetivo de solapar el mismo fragmento con varias secuencias.

El protocolo que se empleó es el diseñado por Van Laethem y colaboradores en el 2006 (14) y los cebadores utilizados se describen en el anexo 1. Para las reacciones de secuenciación se prepararon mezclas constituidas por 1 µL de cada uno de los cebadores de secuencia, 8 µL de la mezcla de reacción de secuencia *DTCS Quick Start Master Mix (Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit* (Beckman Coulter, EE. UU.), 5 µL de ADN purificado y 6 µL de agua con calidad para biología molecular, hasta completar 20 µL de reacción. Para esta reacción de secuencia se realizaron 50 ciclos: 96 °C por 30 segundos, 50 °C durante 20 segundos y 60 °C por 4 min.

La separación de los productos obtenidos en la reacción de secuencia se realizó en un secuenciador automático modelo CEQTM8800 (Beckman Coulter, EE. UU.), mediante el procedimiento de análisis de datos crudos para productos de PCR.

III.5.1.7. Edición de las secuencias

Las secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos del VIH secuenciados se ensamblaron y editaron utilizando el programa *Sequencher™ Version 4.9* (Genes Codes Corporation, EE. UU.), y se empleó como referencia la secuencia nucleotídica de la cepa de VIH-1 B.FR.83. HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455. Al final del proceso se

obtuvieron secuencias consenso de las regiones amplificadas del gen *gag* del VIH-1 de cada paciente analizado.

III.5.1.8. Clasificación por subtipos

Se empleó la base de datos de Los Álamos (<https://www.hiv.lanl.gov/>) para realizar la clasificación del subtipo de las secuencias virales.

III.5.1.9. Análisis filogenético

Dado que la epidemia cubana se caracteriza por un alto número de CRF y URFs, todas estas asignaciones se confirmaron con análisis filogenético de las secuencias obtenidas para cada gen analizado. Las secuencias se alinearon con la opción de alineamientos múltiples de *GENEIOUS (MUSCLE)* (Biomatters, Wellington, Nueva Zelanda) y se editaron mínimamente mediante el paquete bioinformático Mega 6. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud, basado en el mejor modelo seleccionado por el programa Mega 6. Los árboles consenso, inferidos a partir de 1 000 réplicas, se utilizaron para representar la historia evolutiva de las secuencias analizadas. Se emplearon secuencias de referencias de los subtipos incluidos en el análisis, para establecer los diferentes subtipos de VIH-1 que se compararon con las secuencias cubanas obtenidas en el presente estudio.

III.5.1.10. Análisis estadístico

Se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel, versión 15. La mediana y las frecuencias porcentuales (%) se utilizaron para describir las características de los pacientes. Las pruebas de χ^2 y de Fisher, así como la V de Cramer se utilizaron para comparar variables categóricas, se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión 5 del software *Graph pad Prism* (San Diego, CA, EE. UU.).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Descripción de las características virológicas, clínicas y epidemiológicas de la población de estudio

En el presente estudio se incluyeron 88 muestras de pacientes seropositivos al VIH-1, correspondientes a los años 2017-2023, de las que se logró obtener secuencias de calidad del gen *gag*. Las muestras examinadas pertenecían tanto a pacientes tratados (38) como no tratados (50), por lo que esta condición se relacionó con el resto de las variables analizadas (Tabla 4).

El 75,00 % de los pacientes fueron del sexo masculino, de los cuales el 87,80 % fueron HSH, lo que coincide con las características que ha presentado la epidemia cubana de VIH y cuyos datos, al cierre del año 2024, se publicaron por la Vicedirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública de Cuba (74). Este reporte muestra que la epidemia de VIH afecta mayoritariamente al sexo masculino, el que representa más del 80 %, de los cuales los HSH constituyen aproximadamente el 90 %. No se observaron diferencias significativas entre pacientes tratados y no tratados, para las variables epidemiológicas mencionadas. El 94,40 % de los pacientes tratados llevaba más de 10 años infectados, mientras que de los no tratados solo el 24 % se había infectado hacia menos de un año (Tabla 4).

En Cuba existe un adecuado seguimiento y manejo de los individuos infectados con VIH. Desde el año 2003, cuando se inició el uso de la TARVAE en el país, se les ofrece tratamiento libre de costo y de amplio acceso para todos los pacientes que lo necesitan (75). Aún más, a partir de la recomendación lanzada por la OMS, con vistas a alcanzar la estrategia 95-95-95 para el 2030, se decidió, por parte de las autoridades de salud cubanas, iniciar tratamiento a todos los pacientes, una vez que son diagnosticados (76), lo que ha posibilitado una mayor sobrevida. Por otro lado, la reciente decisión de tratar a todos los individuos, debe contribuir a controlar la diseminación de la epidemia, reduciendo la incidencia de casos a mediano o largo plazo. Ello justifica que la mayoría de los pacientes cubanos tratados tengan una sobrevida elevada, como se observa en el presente estudio, donde más del 94,00 % de los pacientes tienen más de 10 años de evolución.

El grupo de pacientes no tratados, estuvo compuesto por individuos con diagnóstico reciente de la infección por VIH, sin embargo, solo el 24,00 % tenía menos de un año de diagnóstico de la infección y el 22,00 % entre seis y 10 años de haberse infectado (77).

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

Características	Tratados n (%) 38 (43,18)	No tratados n (%) 50 (56,81)	Total N (%) 88 (100,00)
Edad Años	Mediana=52 IC 95% (46 - 57)	Mediana=32,5 IC 95% (27 - 42)	Mediana=43,5 IC 95% (38-49)
≤15	0 (0,00)	2 (4,00)	2 (2,27)
16-30	1 (2,63)	21 (42,00)	22 (25,00)
31-45	11 (28,95)	12 (24,00)	23 (26,14)
46-60	21 (55,26)	11 (22,00)	33 (36,36)
61 y más	5 (13,16)	4 (8,00)	9 (10,23)
Sexo biológico			
Femenino	7 (18,42)	15 (30)	22 (25,00)
Masculino	31 (81,58)	35(70)	66 (75,00)
Orientación sexual			
Heterosexual	9 (23,68)	21 (42,00)	30 (34,09)
HSH	29 (76,32)	29 (58,00)	58 (65,91)
Tiempo probable de infección con VIH previo al diagnóstico	Mediana=20,16 años IC 95% (14 - 22,66 años)	Mediana=2,08 años IC 95% (1,33 - 4 años)	Mediana=7,83 años IC 95% (6 - 11,66 años)
<1 año (Diagnóstico reciente)	0 (0,00)	12 (24,00)	12 (13,63)
1-5 años	0 (0,00)	17 (34,00)	17 (19,32)
6-10 años	2 (5,26)	11 (22,00)	13 (14,77)
>10 años	36 (94,74)	3 (6,00)	39 (44,33)
Desconocido	0 (0,00)	7 (14,00)	7 (7,95)
Evolución a SIDA a partir del diagnóstico	Mediana=1año IC 95% (5 meses - 3 años)	Mediana=1mes IC 95% (1mes - 1mes)	Mediana=1mes IC 95% (1mes - 1año)
<1 año	13 (34,21)	26 (52,00)	39 (44,32)
1-5 años	20 (52,64)	5 (10,00)	25 (28,41)
6-10 años	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
>10	2 (5,26)	0 (0,00)	2 (2,27)
No Dato	3(7,89)	2 (4,00)	5 (5,68)
No SIDA	0 (0,00)	17 (34,00)	17 (19,32)
Carga viral copias/mL	Mediana=9 700 IC 95% (598 - 56 000)	Mediana=675 IC 95% (123 - 9 470)	Mediana=5 252 IC 95% (286 - 19 000)
<1 000	13 (34,21)	25 (50,00)	38 (43,18)
1 000-10 000	6 (15,79)	7 (14,00)	13 (14,77)
>10 000-100 000	8 (21,05)	6 (12,00)	14 (15,91)
>100 000	8 (21,05)	11 (22,00)	19 (21,59)
Desconocido	3 (7,89)	1 (2,00)	4 (4,55)
Conteo de CD4 células/mL	Mediana=254 IC 95% (119 - 342)	Mediana=236,5 IC 95% (175 - 399)	Mediana=238,5 IC 95% (178 - 323)
<200	18 (47,37)	21 (42,00)	39 (44,31)
200-350	8 (21,05)	11 (22,00)	19 (21,59)
350-500	4 (10,53)	7 (14,00)	11 (12,50)
>500	8 (21,05)	11 (22,00)	19 (21,59)

IC: Intervalo de confianza.

El 75,00 % de los pacientes fueron clasificados como sida, de ellos solo el 44,32 % habían desarrollado sida en el primer año del diagnóstico, lo que más frecuente en los pacientes no tratados (52,0 %) con respecto a los tratados.

En Cuba se han diagnosticado 43 135 personas viviendo con VIH y el 16,5 % ha fallecido por enfermedades relacionadas con el sida. Desde hace algunos años se observa en la epidemia cubana una cifra mantenida de pacientes que llegan al diagnóstico tardíamente, lo que justifica que entre los pacientes no tratados y con diagnóstico reciente, el 52 % haya desarrollado sida en menos de un año. Otro elemento a tener en cuenta en este grupo son los hallazgos del estudio publicado Kourí y cols., donde se describen pacientes que progresaron a sida en menos de tres años desde la fecha de infección. Estos pacientes estaban infectados con la variante viral CRF19_cpx, la que se relacionó con progresión rápida a sida, entre otros factores (7).

La mediana de la CV del VIH en los pacientes estudiados no fue elevada (5 252 copias/mL), la mayoría de los pacientes tenían valores por debajo de las 1 000 copias/mL. La carga viral plasmática, junto al conteo de linfocitos TCD4⁺, es uno de los marcadores de progresión a sida que se emplea en el seguimiento de los pacientes. Se ha reconocido que valores altos de carga viral de VIH al diagnóstico, se asocian con rápida progresión a sida, y lo opuesto con progresión lenta de la enfermedad (36). Al analizar la carga viral de los pacientes no tratados en el presente estudio se encontraron dos grupos, uno con carga viral por debajo de las 1 000 copias/mL (25 pacientes) y otro grupo con carga viral por encima de las 10 000 copias/mL (17 pacientes). Las cifras del primer grupo pudieran no corresponderse con el tiempo en que la muestra fue tomada para el ensayo de resistencia, si tenemos en cuenta el 52, 00 % de los pacientes progresaron a sida en menos de un año; mientras que los altos valores de carga viral pudieran estar relacionados con el diagnóstico tardío o con una infección reciente por VIH-1. La infección reciente es un período que se caracteriza por altas tasas de replicación viral, antes del desencadenamiento de la respuesta inmune que conduce al establecimiento de la infección crónica (26). El diagnóstico tardío se define cuando se produce un recuento de CD4 inferior a 350 células/mm³ o si de forma simultánea al diagnóstico se detecta una enfermedad definitoria de sida (78). También habría que explorar la relación de los altos valores de carga viral, con la variante viral que está infectando al paciente, la que podría ser más virulenta y con mayor capacidad replicativa (7). Según Croxford y cols., en 2022,

países como Bélgica, Suiza e Inglaterra reportaron valores de diagnóstico tardío del 33,00 %, 52,00 % y 49, 00%, respectivamente (78).

Los altos valores de carga viral en los pacientes tratados, se debieron a que en su mayoría se correspondían con pacientes que se encontraban en fallo terapéutico, razón por la que se les indicó una prueba de resistencia. La CV plasmática es el principal parámetro para el seguimiento de la terapia ARV. Se considera 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 dos y cuatro semanas (36).

Los altos valores de carga viral de los pacientes tratados de este estudio, indican un fallo a la terapia ARV mantenida en el tiempo ya que los fallos iniciales se caracterizan por la presencia de mutantes virales con baja capacidad replicativa. Solo después de un tiempo de fallo a la terapia aparecen las mutaciones compensatorias, que equilibran la eficiencia replicativa del virus y se acompañan de un incremento en la carga viral (79), lo que coincide con lo observado en los pacientes tratados del presente estudio, ya que 22 de los pacientes tuvieron cargas virales por encima de las 1 000 copias/mL.

El conteo de células TCD4⁺ fue similar entre pacientes tratados y no tratados. El 42 % de los pacientes tratados y no tratados tenían < 200 células/mL. En los pacientes, particularmente en aquellos que se encuentran en la etapa sida, es de esperar que muestren valores de CD4 inferiores a 200 células. Los CD4 son glicoproteínas que se encuentran en la superficie de las células T y cuyo conteo se utiliza para determinar el estadio en que se encuentran los pacientes infectados por VIH. Durante la infección por viral se produce una reducción progresiva en el número de células T que expresan CD4 y un conteo de la misma, con valores inferiores a las 200 células/mL, es uno de los marcadores de sida. Realizar la medición del conteo de CD4 antes de comenzar la terapia, puede dar información sobre la función inmunológica del paciente (80). Resulta justificado encontrar un alto número de pacientes tratados, en el presente estudio, exhibiendo bajos conteos de linfocitos TCD4⁺, como resultado del fallo terapéutico de larga evolución. Además, como se describió anteriormente, más del 80,00 % eran pacientes con más de 10 años de diagnóstico con VIH, que habían recibido múltiples

esquemas de terapia ARV y el 100,00 % ya estaba en estadio sida, lo que implica bajos conteos de CD4 (36).

IV.2. Identificación de las variantes del VIH-1 en el gen gag para los grupos de estudio

En la presente investigación se identificaron los subtipos en el gen *gag* y *pol* de los 88 virus amplificados, los que se muestran en la figura 5.

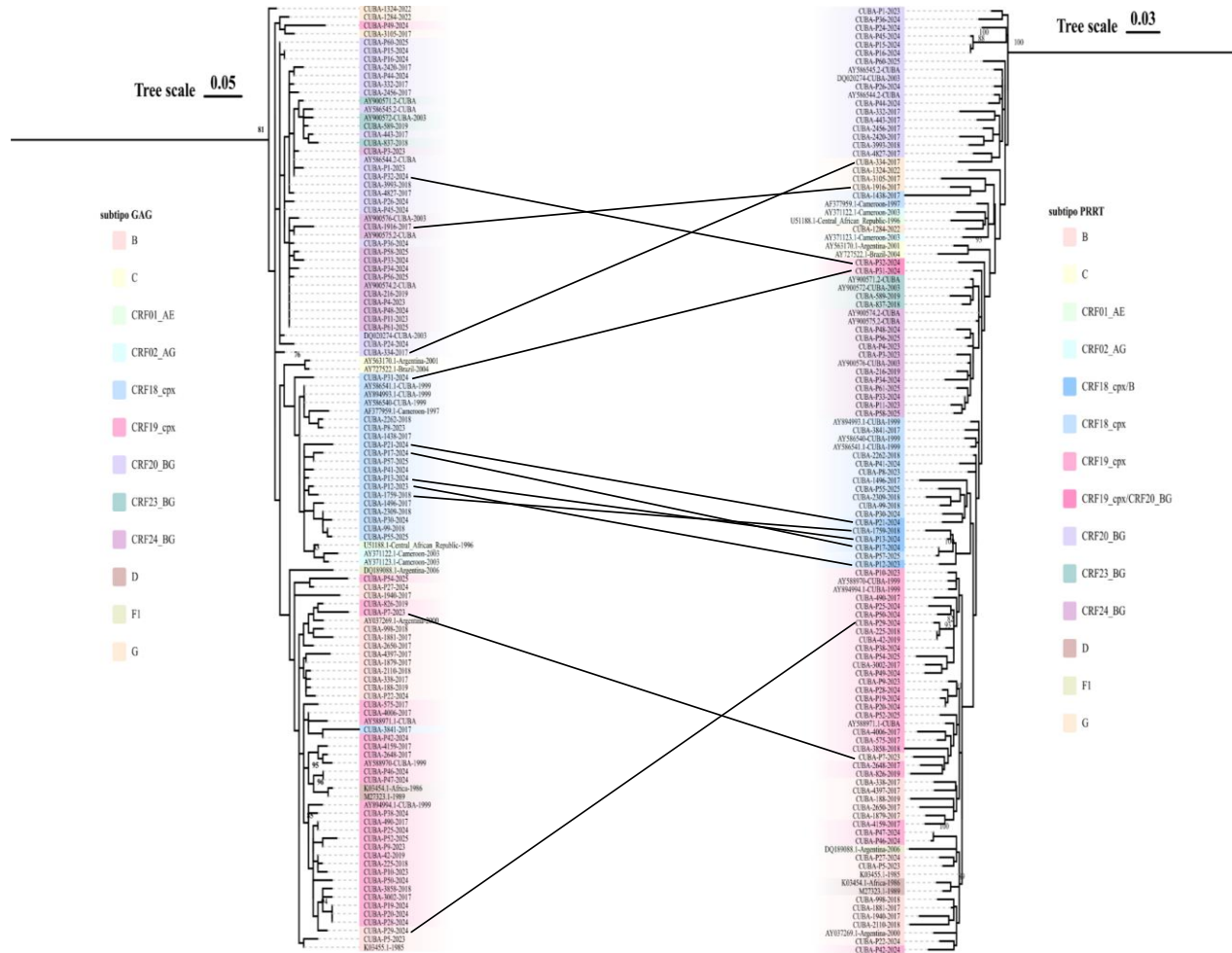


Figura 5. Análisis filogenético de las regiones codificantes de los genes *gag* (izquierda) y *pol* (derecha) (99 aminoácidos (aa) de PR + 335 aa de RT) de acuerdo a los subtipos del VIH-1 identificados en los grupos de pacientes estudiados. La historia evolutiva del árbol que muestra el análisis del gen *gag* se infirió mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo *Hasegawa-Kishino-Yano* (81) y para árbol que muestra el análisis de las secuencias de proteasa y reverso transcriptasa se empleó el modelo *General Time Reversible*. Los análisis involucraron 122 secuencias nucleotídicas

de los diferentes subtipos de VIH-1 y se realizaron en MEGA6 (82). Las líneas negras se emplearon para unir las secuencias cuyos subtipos virales no coincidieron en *pol* y *gag* y fueron consideradas *URF*.

En el gen *gag* se detectaron los mismos subtipos detectados en el fragmento del gen *pol*, que se habían amplificado y secuenciado con anterioridad en el laboratorio de ITS, entre los que se encuentran: subtipo B, CRF_BG, CRF19_cpx, CRF18_cpx y subtipo G. Estos coinciden con los que hasta ahora se han descrito en la epidemia cubana (83).

Los estudios epidemiológicos moleculares globales demuestran que la diversidad genética del VIH-1 es extremadamente compleja y está en constante cambio (84, 85). La propagación y evolución global del VIH-1 ha causado distribuciones diferenciales de subtipos, CRFs y URFs, lo que lleva a una gran variación regional en números, tipos y proporciones de variantes genéticas virales. Por lo tanto, la epidemia mundial del VIH-1 se está diversificando y los recombinantes desempeñan papeles particularmente importantes en África, Asia y Sudamérica (84, 85). Los diversos patrones de distribución de las variantes del VIH-1 están determinados por factores complejos, incluyendo las redes de transmisión social, la urbanización, las redes de transporte, la migración, los efectos fundadores y el crecimiento poblacional. También es posible que las diferentes variantes del VIH-1 tengan una ventaja evolutiva en términos de transmisión y patogénesis (86, 87).

En la tabla 5 se pueden observar las frecuencias de los subtipos virales en ambos genes, así como el subtipo global, en el que se tienen en cuenta los subtipos obtenidos en el gen *pol* y en el gen *gag*. Las frecuencias de los subtipos coincidieron en ambas regiones para la mayoría de las variantes genéticas, detectándose solo un 12,40 % de URFs globalmente. En un estudio de Pérez y cols., en 2006 se describe una disminución de subtipo B a expensas de un incremento de los recombinantes BG y un incremento de las URFs (88). Este fenómeno se sigue observando en la epidemia cubana y se corrobora en la presente investigación (89, 90).

Tabla 5. Total de subtipos virales detectados en los genes *gag* y *pol* en pacientes tratados y no tratados.

Subtipo	Tratados n=38		No Tratados n=50		Global N (%) 88 (100,00)
	<i>Pol^a</i> n (%)	<i>Gag</i> n (%)	<i>Pol^a</i> n (%)	<i>Gag</i> n (%)	
B	9 (23,70)	9 (23,70)	4 (8,00)	4 (8,00)	12 (13,60)
CRF_BG	9 (23,70)	11 (28,90)	18 (36,00)	19 (38,00)	27 (30,70)
CRF18_cpx	6 (15,80)	7 (18,40)	4 (8,00)	10 (20,0)	11 (12,50)
CRF19_cpx	10 (26,30)	10 (26,30)	15 (30,00)	15 (30,00)	24 (27,30)
G	3 (7,90)	1 (2,60)	2 (4,00)	2 (4,00)	3 (3,40)
URF	1 (2,60)	0 (0,00)	7 (14,00)	0 (0,00)	11 (12,50)

a (99 aa de la PR y 335 de la RT)

gag: gen que codifica para las proteínas derivadas de *gag*.

pol: fragmento del gen *pol* que codifica para la proteasa y la reverso transcriptasa viral.

Según un metanálisis de los años 2010 al 2020 publicado por William y cols., en 2023 (47) las formas recombinantes circulantes y las formas recombinantes únicas representaron el 29 % de las cepas del VIH-1, seguidas del subtipo C (23 %) y el subtipo A (17 %). Entre los estudios, analizados en este artículo, que reportan la distribución de subtipos en poblaciones clave, el 62 % de las infecciones por VIH-1 entre los HSH y el 38 % entre usuarios de drogas intravenosas, fueron CRF/URF. América Latina y el Caribe mostraron un aumento del 25 % en la prevalencia de otras CRF (excluyendo CRF01_AE o CRF02_AG) entre 2010-2015 y 2016-2021. La epidemia cubana no está exenta de estos cambios que se aprecian a nivel mundial y con el paso de los años las CRFs han ganado en prevalencia y las URFs han incrementado su proporción (77, 91).

Cuba se describe como un punto caliente en la Caribe (83) debido a la circulación y presencia de numerosas variantes virales, en contraste con el resto de los países del área, con epidemias caracterizadas por la presencia del subtipo B (84). Los primeros pacientes cubanos detectados en Cuba se infectaron en el continente africano, donde circulan todos los subtipos del VIH-1 descritos y algunas formas recombinantes. Este

hecho, así como la generación de nuevas formas recombinantes en la isla, debido a la circulación de numerosas variantes en una misma área geográfica, facilitó esta calificación (42). Sin embargo, a lo largo de los años algunos de estos subtipos han ido desapareciendo o su circulación se ha quedado restringida a algunas provincias como sucedió en el primer caso con el subtipo A y en el segundo caso con el H (49, 88). El primero ya no se encuentra y el segundo se detecta en pacientes infectados hace muchos años y que viven en la zona oriental del país. Otros subtipos que han disminuido en su proporción son C, G, J y las formas recombinantes 01 y 02 (49).

IV.3. Caracterización de las mutaciones del VIH-1 presentes en el gen gag relacionadas con resistencia a los IPR entre las variantes genéticas que circulan en la epidemia cubana

La introducción de los inhibidores de proteasa (IP) como parte de la TARVAE llevó a una reducción drástica de las tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes con infección por VIH-1. Los IP poseen una alta actividad antiviral intrínseca y se encuentran entre los fármacos antirretrovirales más potentes disponibles en la práctica clínica hasta la fecha. De hecho, solo las estrategias de simplificación con IP potenciados han demostrado ser tan eficaces como la terapia triple para mantener la supresión virológica continua. Estas drogas se dirigen al sitio activo de la proteasa del VIH-1, cuya actividad es esencial para la generación de partículas virales infecciosas completas mediante la escisión de las poliproteínas Gag y Gag-Pol. A pesar de la alta barrera genética de estos compuestos, la aparición de mutaciones en el sitio activo de la proteasa conduce a la resistencia a los fármacos. Las mutaciones virales que causan resistencia a los IP reducen la afinidad del fármaco por el sitio activo y ellas son generalmente seguidas por una acumulación gradual de mutaciones adicionales en la enzima, que conduce a la recuperación parcial de su actividad. Además, se ha demostrado que las mutaciones en la poliproteína Gag, en los sitios de escisión de la proteasa, generalmente contribuyen a la resistencia a los IP al restaurar la interacción con los sitios de escisión y compensar los defectos en la capacidad replicativa viral. Sin embargo, las vías de resistencia a los IP "tradicionales", mencionadas anteriormente, han sido cuestionadas por estudios que evidencian el fracaso virológico de los pacientes tratados con IP en ausencia de mutaciones de

resistencia a ellos. Varios estudios demuestran la contribución directa de las mutaciones de Gag a la susceptibilidad a los fármacos (92).

En la figura 6 se muestra el promedio de cambios aminoacídicos según el tamaño de las proteínas codificadas por el gen *gag*, en la que se aprecia que la proteína P24 es la menos variable, mientras que la proteína P6 fue la más variable. Un análisis similar realizaron Cordoñes y cols., en el 2017. Sin embargo, en dicho estudio, sus frecuencias de variabilidad fueron mucho menores, quizás porque su casuística fue mucho menor y porque ellos realizaron un análisis comparativo de la evolución de la secuencia de Gag del mismo paciente antes y después de la introducción del IP (92).

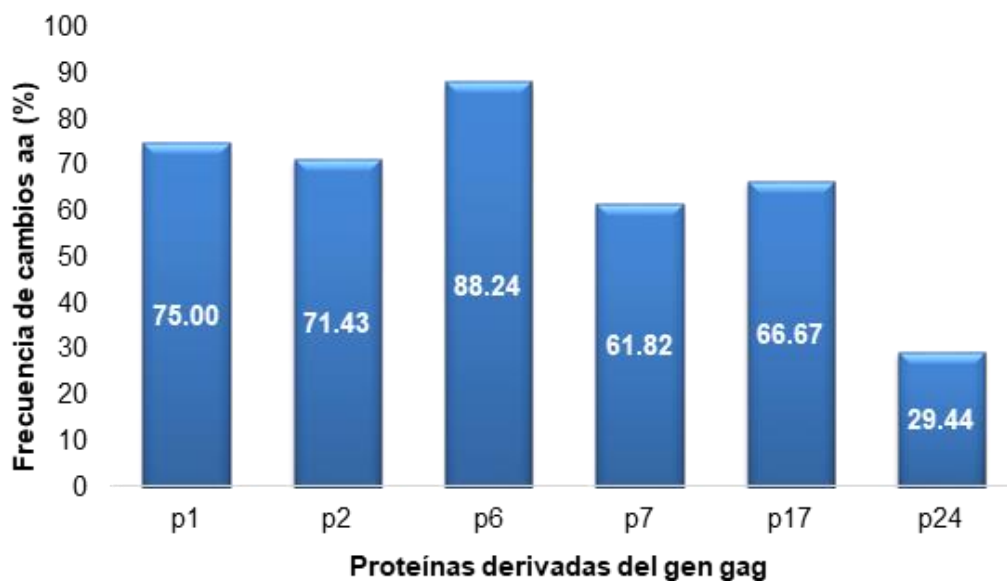


Figura 6. Promedio de cambios aminoacídicos según el tamaño de la proteína.

Otros estudios refieren que la cápside es extremadamente intolerante a las sustituciones no sinónimas, lo que produce virus defectuosos o con infectividad reducida (93, 94). Esta alta conservación, y el hecho de que sea la proteína viral más abundante, hacen de p24 una región muy interesante para el diseño de pruebas diagnósticas serológicas y moleculares para la detección temprana del VIH (95), así como el blanco de nuevos biosensores y nanotecnologías en desarrollo (96-98).

IV.3.1. Mutaciones comunes significativas

Las mutaciones comunes que resultaron significativas entre los grupos estudiados se muestran en la figura 7. Se resaltan aquellos cambios que fueron más frecuentes en los pacientes tratados, ya que la mayoría de los cambios se aprecian en paciente no tratados.

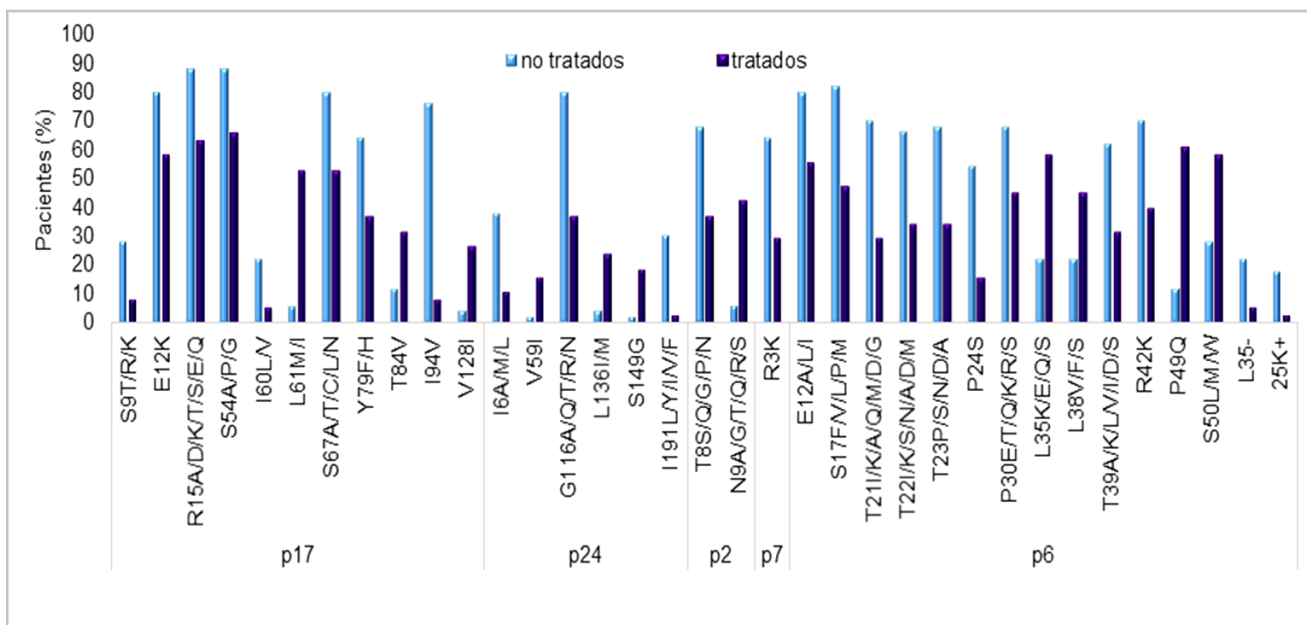


Figura 7. Porcentaje de pacientes que presentan mutaciones con diferencias significativas ($p < 0,05$) en ambos grupos de estudio.

Como se discutirá *a posteriori* a lo largo del desarrollo de esta investigación, los resultados de la presente investigación diferían con lo descrito en la literatura, lo que llevó a realizar otros análisis para arribar a nuevas conclusiones. Sin embargo, algunas de las mutaciones detectadas con diferencias significativas y su repercusión para la proteína se han descrito por diversos autores, como se comentará más adelante. Según Fun y cols., las sustituciones en el codón 128 de p17 (V128T/A/del) se asociaron con la exposición a IP *in vivo* (FPV/ATV/r). El cambio de V por L en esta posición se observó con mayor frecuencia en virus del subtipo G de pacientes tratados previamente con IP, en comparación con pacientes sin IP. La mutación V128I también se asoció con un rebote virológico en pacientes con un régimen de refuerzo que contenía darunavir y se correlacionó positivamente con la presencia de la mutación en la proteasa V32I (32). Recientemente, Verheyen y cols., (99) exploraron la prevalencia de polimorfismos y mutaciones asociadas al tratamiento en los sitios de escisión NC/SP2/P6 (431V, 436R, 437V, 449F/H/V, 451T, 452S, 453A/L) entre un gran conjunto de pacientes sin tratamiento previo, cuyos virus no portaban mutaciones de resistencia primaria ($n=1\ 846$). Si bien los polimorfismos fueron relativamente frecuentes, en particular en la posición 449 y 451, los residuos involucrados fueron claramente distintos a los mutados, cuyos cambios aminoacídicos estuvieron asociados al tratamiento. Solo se encontraron tres mutaciones

asociadas al tratamiento (436R, 453L y 437V) en más del 1 % de estos pacientes (8,5 %, 5,7 % y 1,7 %, respectivamente). En marcado contraste, en un grupo de pacientes sin tratamiento previo que portaban mutaciones de resistencia primaria a IP la mutación 431V se encontró con una alta frecuencia (22 %), sugiriendo transmisión de un virus resistente, mientras que esta mutación no excedió el 0,5 % en los pacientes del primer grupo (99). Como en otros estudios, la mayoría de las muestras eran de pacientes infectados por VIH-1 de subtipo B. Se observaron diferencias en la prevalencia de mutaciones y polimorfismos entre virus de subtipo B y no B, aunque el número limitado de muestras de cada subtipo no permitió una asociación específica (99).

La frecuencia y la cinética de la aparición de mutaciones del sitio de escisión de Gag durante el curso de la evolución de la resistencia del VIH a los IP no se han evaluado completamente. Varios estudios comparan pacientes sin tratamiento previo y pacientes con tratamiento previo, y encuentran una mayor frecuencia de mutaciones en el segundo grupo. Sin embargo, para cuantificar la diferencia, se deben considerar cohortes relativamente grandes y la definición del grupo debe indicarse claramente. Verheyen y cols., (100) comentaron que aproximadamente el 10 % de los pacientes sin tratamiento previo y sin mutaciones de resistencia primaria (n=275) albergaban mutación(es) asociada(s) al tratamiento en los sitios de escisión NC/SP2/P6. En el mismo estudio, el 60 % de los pacientes con tratamiento previo que portaban al menos una mutación de resistencia primaria (n=225) tenían una o más mutaciones del sitio de escisión (100). La frecuencia parece aumentar con la duración de la exposición a los IP, ya que los virus altamente evolucionados de pacientes que han fracasado en múltiples líneas de terapia antirretroviral basada en IP, que portan múltiples mutaciones de resistencia en la proteasa y expresan altos niveles de resistencia, casi siempre portan mutaciones en los sitios de escisión de Gag (101). Vale la pena enfatizar que los virus del subtipo B fueron ampliamente prevalentes en estos estudios. La aparición de mutaciones de Gag específicas del subtipo y su implicación en el desarrollo de la resistencia merecen una vigilancia, ya que se pueden observar diferentes cambios aminoacídicos asociados a la resistencia en virus genéticamente distintos. Como ejemplo, un estudio reciente en pacientes infectados con el subtipo G (n = 21) sugiere que el polimorfismo frecuente 453T favoreció la selección de 453I en lugar del cambio 453L asociado al tratamiento observado en los virus del subtipo B (102).

Debido a que hasta hace poco las mutaciones en Gag se consideraban esencialmente cambios compensatorios en lugar de verdaderas mutaciones de resistencia, la mayoría de los ensayos genotípicos de resistencia no tienen en cuenta estas mutaciones en sus algoritmos de interpretación. Estos algoritmos se basan principalmente en correlaciones entre la respuesta al tratamiento con IP y el genotipo. Además, si las mutaciones en el sitio de escisión de Gag emergen en el contexto de secuencias de proteasa muy mutadas, es probable que su impacto estadístico individual en la respuesta clínica se vea confundido por el genotipo general de la proteasa. Sin embargo, existen algunos indicios de que la presencia de mutaciones en el sitio de escisión de Gag puede correlacionarse con el resultado virológico en pacientes en los que la terapia de primera línea con IP ha fracasado y en los que la terapia de rescate implica otro compuesto de la misma clase. Esto sugiere además que estas mutaciones no solo afectan la aptitud viral, sino que también podrían actuar como mutaciones de resistencia auténticas (103, 104).

Codoñer y cols., describieron también la presencia de mutaciones en el sitio de escisión de Gag en las posiciones A431V, K436E e I437V/T, las que confirieron resistencia a los IP en ausencia de mutaciones de resistencia a los fármacos en el sitio activo de la proteasa. Otros cambios descritos por estos autores se dieron en los residuos centrales de la matriz de Gag (R76K, Y79F y T81A), lo que asociaron directamente con una menor susceptibilidad a los IP y una mayor capacidad replicativa viral. Este hecho, también llamado vías de resistencia a los IP "alternativas", incluye mutaciones en la cola citoplasmática de gp41, las que pueden alterar las interacciones entre gp41 y Gag, afectando así la entrada viral (92). Otros estudios previos evidencian la importancia de Gag en los mecanismos de susceptibilidad a los IP y respaldan la asociación de Gag y la proteasa como una unidad funcional. Además, estos estudios demuestran que, a pesar de los muchos años transcurridos desde la introducción de los IP, los determinantes del fracaso virológico no se han caracterizado por completo (92). En la presente investigación, de las mutaciones descritas anteriormente, solo se detectó el cambio Y79F en P17 con una diferencia estadística en el grupo de pacientes no tratados, lo que hace pensar en si estamos en presencia de una resistencia natural o un polimorfismo de alguna de las variantes genéticas cubanas.

Los resultados del presente trabajo coinciden con los hallazgos de Li y cols., quienes encontraron las posiciones 12, 15, 54 y 67 de p17, la 6 y la 116 de p24, la 8 de p2, la 12,

17 y 21, 22, 30 y 39 de p6 altamente polimórficas en un estudio publicado en el 2014 (14).

IV.3.2. Mutaciones de resistencia por grupo de estudio

Entre las motivaciones fundamentales del presente estudio estaba conocer si se encontraban las mutaciones relacionadas con resistencia a los IP d escritas en *gag* y si estas se podían asociar a las que estaban presentes en los virus con resistencia demostrada a IP en el grupo de pacientes tratados.

Primeramente se realizó el cálculo de la frecuencia de mutaciones en *gag* descritas en la literatura asociadas a resistencia a los IP en ambos grupos (Figura 8).

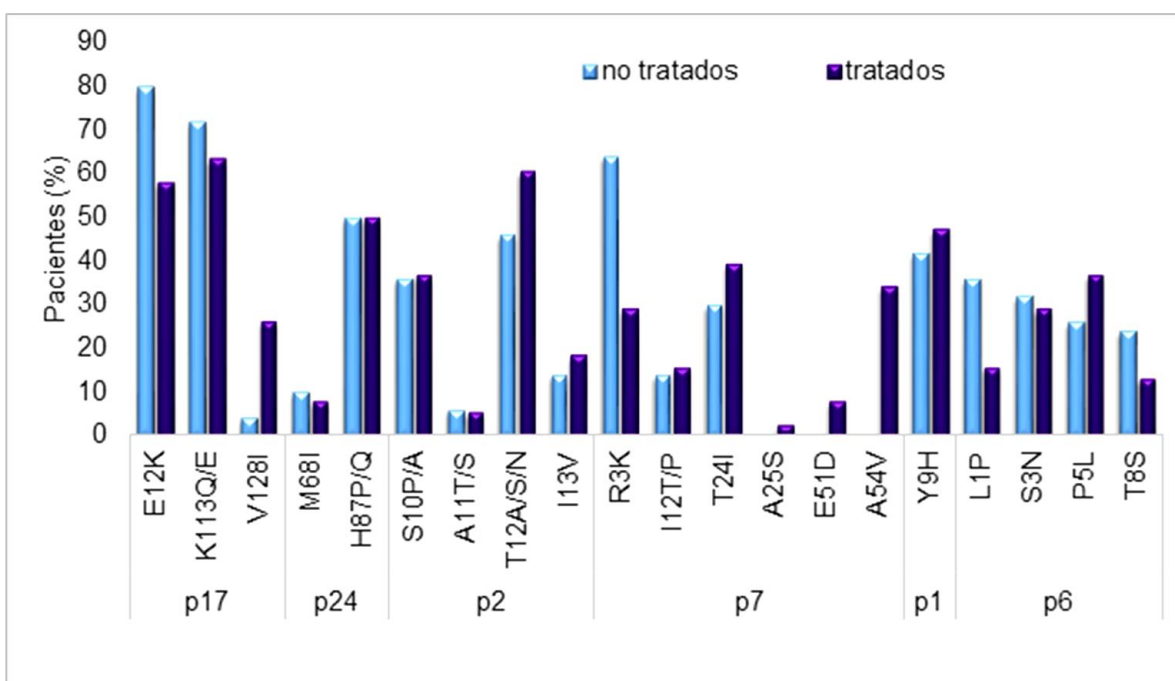


Figura 8. Porcentaje de pacientes que presentan mutaciones asociadas a resistencia en *gag* en ambos grupos de estudio.

Solo resultaron significativos los cambios en P7 en la posición 3 y en P17 en la posición 12, mutaciones que contradictoriamente fueron más frecuentes en los pacientes no tratados, mientras que el cambio en la posición 128 de P17 fue significativamente más frecuente en el grupo de los pacientes tratados. Como se puede apreciar en la figura 8 algunos cambios en p7 solo se encontraron entre los pacientes tratados (posiciones 25, 51 y 54). De las 20 posiciones exploradas, relacionadas con resistencia en *gag*, 12 fueron más frecuentes en el grupo de pacientes tratados (12/20, 60 %).

Fun y cols., 2012 encontraron en el sitio de corte p1/p6 la sustitución en el codón 453 (P5L) que se observa con frecuencia durante el tratamiento con IP. Las mutaciones en la posición 453 se han asociado con la exposición *in vivo* a todos los IP descritos (64). Las mutaciones en dicha posición a menudo se observan junto a otras mutaciones en la proteasa, como la D30N, I50V, I84V, N88D y L90M. En el presente estudio se encontró con mayor frecuencia en los pacientes tratados.

En ese mismo trabajo de Fun y cols., se describe que la selección de S373P (S10P) (p2/NC) coincide con la introducción de LPV/r en el tratamiento de un paciente (64). Este evento se describe en el presente estudio con una ligera diferencia a favor del grupo de pacientes tratados.

Fun y cols., también detectan la presencia del cambio S373P (S10P) (p2/NC) antes de la selección de A431V (A54) (NC/p1) y V82F en la proteasa después de la introducción del indinavir (64). La presencia de S373P antes de la introducción del inhibidor mencionado podría estar asociada con la naturaleza polimórfica de este residuo en individuos sin tratamiento previo, como igualmente se aprecia en el presente estudio. Por lo tanto, S373P podría seleccionarse en ausencia de IP, confiriendo así una ventaja transitoria para la selección de mutaciones de resistencia a la proteasa.

Dado que el trabajo publicado por Fun y cols., mostró el seguimiento de un grupo de pacientes antes y después de la introducción de los inhibidores de la proteasa en el tratamiento de los mismos, les permitió observar la aparición y/o acumulación de algunas mutaciones y estudiar su efecto sobre las mutaciones en *gag*. Esto les facilitó describir que la suma gradual de I376V (I13V) (p2/NC), V128I (p17/p24) y P453A (P5) (p1/p6), respalda la aparición de patrones mutacionales complejos en la proteasa, incluidos I54A, V82F, I84V y L90M (64). Todas estas mutaciones descritas por ellos fueron encontradas en el presente trabajo con mayor frecuencia en el grupo de los pacientes tratados.

En la figura 9, se observa la cuantificación de la resistencia a los IP (en todos los casos se trata de pacientes tratados con inhibidores de la proteasa con resistencia entre intermedia y alta), según las mutaciones detectadas en la proteasa viral y las encontradas en el gen *gag*.

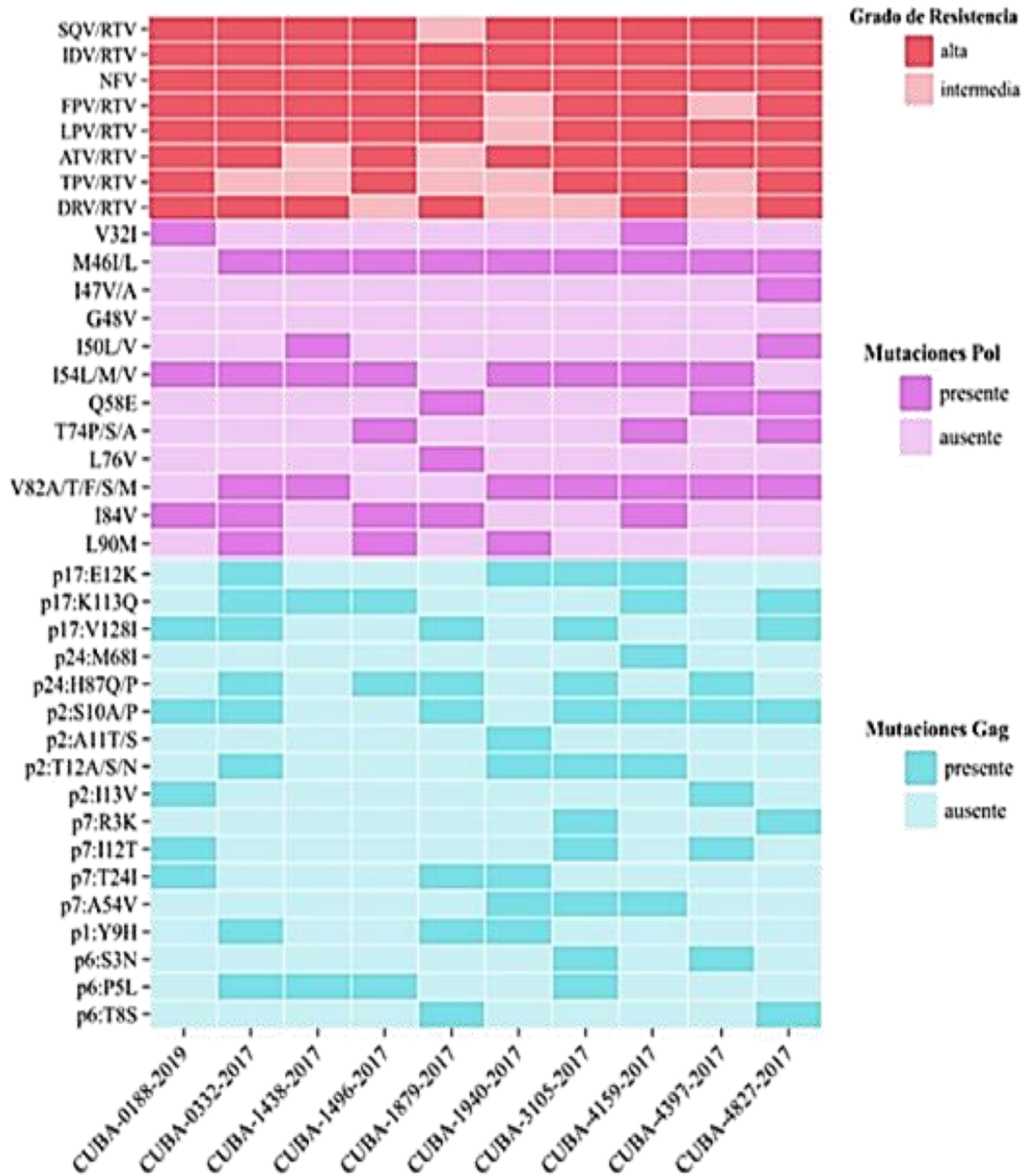


Figura 9. Mapa de calor en el que se muestra un grupo de pacientes con virus resistentes a los IP (resistencia alta e intermedia), las mutaciones asociadas a resistencia en la proteasa viral y las mutaciones asociadas a resistencia en *gag*. **Leyenda:** **SQV:** saquinavir, **IDV:** indinavir, **NFV:** nelfinavir, **FPV:** fosamprenavir, **LPV:** lopinavir, **ATV:** atazanavir, **TPV:** tipranavir, **DRV:** darunavir, **RTV:** ritonavir.

Los primeros hallazgos de mutaciones en los sitios de escisión de Gag durante la detección de resistencia a los IP fueron realizados por Doyon y cols., en virus sometidos a selección *in vitro* por inhibidores experimentales BILA 1906 BS y BILA 2185 BS. Las mutaciones se localizaron dentro de los dos sitios de escisión que definen el péptido SP2 entre NC y Gag p6. En un experimento con BILA 1906 BS, se observó una sustitución de L a F en la posición P1 del sitio de escisión SP2/p6, designada como L449F cuando se numeró de acuerdo con la secuencia completa de aa de la poliproteína Gag. Se encontró que esta mutación emergía poco después de la selección de tres mutaciones en la proteasa, incluida la mutación I84V. En un segundo experimento con BILA 2185 BS, se seleccionó nuevamente la mutación L449F, pero poco después aparecieron las mutaciones duales Q430R y A431V en las posiciones P3 y P2, respectivamente, del sitio NC/SP2. Curiosamente, la presencia de estas mutaciones tuvo un claro efecto en la cinética de replicación del virus, pero no se observaron cambios en la CI50 (105).

También se encontraron mutaciones en el sitio de escisión de Gag en virus de pacientes tratados. En una serie de muestras de sujetos tratados con indinavir en quienes el tratamiento no logró controlar la replicación del VIH, Zhang y cols., observaron la aparición temprana de la mutación A431V en el sitio de escisión de NC/SP2 en tres pacientes, mientras que la sustitución L449F en SP2/p6 se observó en un momento posterior en un paciente (106).

En otro estudio que incluyó a 16 pacientes en los que fracasó el tratamiento con ritonavir o saquinavir, Mammano y cols., observaron la presencia de la mutación A431V en NC/SP2 en dos casos y la mutación de L449F en SP2/p6 se observó en uno. Un estudio adicional sobre la capacidad replicativa de clones provirales recombinantes que portaban proteasa-Gag o proteasa sola reveló que las secuencias de Gag mutadas pudieron compensar, al menos parcialmente, la pérdida de la aptitud replicativa conferida por las proteasas mutadas clonadas. El rescate de la capacidad replicativa del virus se asoció, y supuestamente se debió, a una mejor escisión en el sitio mutado por las proteasas resistentes. Por lo tanto, se aceptó que el papel de las mutaciones en el sitio de escisión de Gag estaba esencialmente relacionado con la capacidad replicativa o la eficacia biológica del virus (107).

Varios estudios señalan la importancia de las mutaciones del sitio de escisión de Gag en la evolución de la resistencia del VIH-1 a los IP (103, 108, 109). Se observaron nuevas mutaciones, algunas de las cuales se encuentran muy cerca de los sitios de escisión, en particular la mutación I437V del sitio NC/SP2, y la mutación P453L del sitio SP2/p6 (110, 111). Se identificaron fuertes asociaciones entre algunas de estas mutaciones en Gag y mutaciones específicas de resistencia a la proteasa. De hecho, mientras que las mutaciones de Gag A431V e I437V se asocian casi constantemente con genotipos de resistencia a los IP que incluyen la mutación V82A, la mutación L449F en Gag se observa con mayor frecuencia en asociación con I84V en la proteasa (16, 103). Incluso se ha sugerido, pero no se ha demostrado claramente, que la aparición de la mutación I84V podría en realidad ser favorecida por la mutación preexistente L449F en Gag (16).

La P453L, que se puede ver en algunas secuencias primarias de VIH-1 de pacientes sin tratamiento previo, puede no obstante, surgir en asociación con la mutación I84V o con la mutación específica de amprenavir I50V (111). Estas asociaciones se validaron y ampliaron en una encuesta relativamente grande (500 pacientes) que comparó las secuencias del sitio de escisión de Gag de pacientes sin tratamiento previo y con tratamiento previo (100). Las mutaciones más frecuentes en el sitio de escisión NC/SP2 (A431V e I437V) asociadas a la terapia se observaron en asociación con mutaciones en la proteasa en las posiciones 82 y 54, mientras que las mutaciones principales en el sitio de escisión SP2/P6 (L449F y P453L) se encontraron en el contexto de las mutaciones de proteasa D30N o I84V. No se deben esperar asociaciones más estrechas, debido a los múltiples parámetros que rigen la aparición de mutaciones en PR y Gag, como el inhibidor específico utilizado, el orden de exposición a diferentes inhibidores, la duración del tratamiento y los polimorfismos de Gag preexistentes (100). Finalmente, no existe un conflicto de mecanismo ni evolutivo aparente entre las mutaciones que afectan a los sitios NC/SP2 o SP2/p6. No obstante, algunos datos sugieren que las mutaciones A431V e I437V, ambas favorecidas en el contexto de la mutación de la proteasa V82A, no se observan en los mismos genomas y podrían ser incompatibles entre sí (101).

Además del efecto bien documentado de las mutaciones del sitio de escisión de Gag en la pérdida de la aptitud viral asociada a la resistencia, se ha acumulado evidencia de que estas mutaciones también podrían afectar directamente la susceptibilidad del VIH-1 a los IP de una manera que es independiente de su efecto en la aptitud. En su estudio de 1997

realizado por Zhang y cols., los autores observaron que la presencia de la mutación A431V en NC/SP2 podría mejorar la cinética de la replicación viral no solo en ausencia de indinavir, sino también en presencia de concentraciones moderadas de ese fármaco (106). De igual forma, Carron de la Carrière y cols., observaron que la presencia de la misma mutación A431V mejoró fuertemente el perfil de ventaja selectiva de algunos mutantes de proteasa en presencia de ritonavir, un parámetro que refleja la capacidad de las variantes virales para superar al virus de tipo salvaje de acuerdo con la concentración del fármaco en el cultivo (112). En línea con estos hallazgos anteriores, Maguire y cols., al estudiar el efecto de la mutación Gag P453L en virus que portan la mutación de la proteasa I50V, específica de amprenavir, observaron nuevamente que más allá de simplemente corregir la aptitud viral, la mutación en Gag también podría aumentar significativamente la CI 50 de amprenavir en estos mutantes (111). Finalmente, Prado y cols., informaron que la mutación L449F en Gag, en el contexto de las mutaciones seleccionadas por amprenavir, L10F/I84V, aumentó la resistencia fenotípica a todos los IP probados (113). Sin embargo, en estos cuatro estudios no se determinó claramente hasta qué punto el aumento de la resistencia dependía o era independiente del efecto de las mutaciones en Gag sobre la aptitud viral. Este punto fue resuelto por dos estudios recientes (114, 115), que demostraron claramente que las mutaciones del sitio de escisión de Gag, independientemente de su papel en la aptitud viral, deben considerarse mutaciones auténticas de resistencia a IP.

En la figura 10 se muestra un esquema confeccionado a partir de los resultados obtenidos a partir del cálculo del coeficiente V de Cramer. Con el coeficiente de Cramer se buscó si existía asociación entre las mutaciones presentes en la proteasa viral de los pacientes tratados y aquellas encontradas en las proteínas derivadas del gen *gag* en el mismo grupo de pacientes. Esta prueba establece la fuerza de asociación entre dos variables. Solo se muestran las asociaciones entre aquellas mutaciones conocidas/descritas por la literatura relacionadas con resistencia o con los sitios de unión al fármaco. Las asociaciones encontradas fueron de moderadas (valores de 0,1 - 0,3) a pequeñas (valores de 0,0 - 0,1), debido a que se buscaron asociaciones individuales.

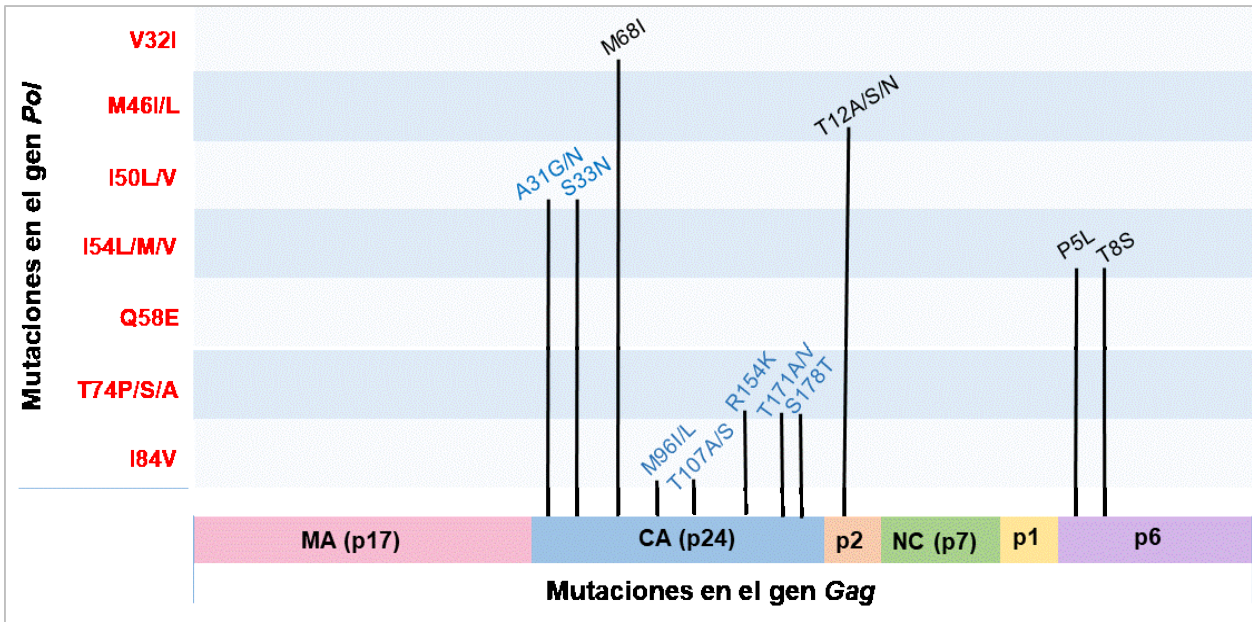


Figura 10. Mutaciones en el gen *gag* que se asociaron ($p < 0,05$) con mutaciones de resistencia en el gen *pol* en pacientes tratados. **Leyenda:** **Letra azul:** asociadas a sitios de unión al fármaco, **Letra negra:** asociadas a resistencia en *gag*.

Li y cols., describieron desde el 2014 la presencia de cambios en *gag* que podían modificar la respuesta a los inhibidores de la proteasa, asociados con la aparición de mutaciones de resistencia a los IP (14).

Fun y cols., encuentran que las mutaciones en la posición 453 se han asociado con la exposición a IP *in vivo* para amprenavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, indinavir y saquinavir. Se observa con frecuencia junto con las mutaciones en la proteasa viral: D30N, I50V, I84V, N88D y L90M. P453L no confiere resistencia por sí sola, pero potencia la resistencia a los IP en combinación con las mutaciones en la proteasa I50V e I84V a NFV, APV y SQV, y a todos los IP en combinación con L90M (64).

La asociación observada entre la exposición a IP y las mutaciones en los CS de Gag indica la estrecha relación entre la PR viral y los sitios de escisión en la proteína Gag, y su contribución para escapar de la presión de los IP. El efecto de las mutaciones en estas posiciones sobre la susceptibilidad a los IP se ha estudiado en detalle. Los análisis estructurales y funcionales de la eficiencia de procesamiento de los sustratos mostraron un mejor procesamiento y/o mayores afinidades de unión previstas para los sustratos

mutantes. Se cree que un procesamiento mejorado de Gag altera el equilibrio entre el inhibidor de la proteasa y Gag (116).

IV.3.3. Mapas de Calor

El VIH es uno de los patógenos con mayor diversidad genética debido a sus altas tasas de mutación y recombinación, su gran tamaño poblacional y su rápida tasa de replicación (84, 117). El VIH-1 es responsable de la mayoría de las infecciones a nivel mundial y se ha dividido en cuatro grupos (M, N, P y O), siendo M el relacionado con la actual pandemia (84). Este grupo se ha subdividido en 10 subtipos (A-D, F-H, J-L), 8 subtipos (A1, A2, A3, A4, A5, A6, F1, F2) (118) y al menos 150 formas recombinantes circulantes (CRF) (*Los Álamos Nacional DB*, <https://www.hiv.lanl.gov/>) e innumerables formas recombinantes únicas (URF). Las CRF son virus recombinantes intersubtipo detectados en tres o más individuos no vinculados epidemiológicamente y las URF son genomas recombinantes intersubtipo complejos encontrados solo en un sujeto infectado por el VIH. La aparición de nuevas variantes del VIH (principalmente CRF y URF) y la propagación de subtipos no B y recombinantes del VIH-1 en esta pandemia plantean un desafío para la precisión y la eficiencia de las herramientas de diagnóstico y tratamiento (119).

En la epidemia cubana se han descrito cinco CRF, dos generadas en África (CRF18_cpx y 19_cpx) y tres originadas en la isla (CRF_BGs) (120-122). A pesar de que se han descrito múltiples URF (83, 88, 91), el hecho de no contar con secuenciación completa del genoma, ha impedido el hallazgo y la descripción de nuevas formas recombinantes.

La CRF19_cpx es una forma recombinante de los subtipos D, A1 y G del VIH-1. Se detectó por primera vez en Cuba en 1999 cuando se muestrearon cuatro individuos epidemiológicamente no relacionados (diagnosticados en 1997). Casado y cols., propusieron el origen africano de este recombinante, dada su homología con un recombinante intersubtipo AG de Camerún y un virus subtipo D de Gabón (120). Sin embargo, mientras que la CRF19 ha mantenido una prevalencia muy baja en el continente africano a través de todos estos años, el virus se ha propagado con éxito en Cuba, colocándolo entre los subtipos circulantes más prevalentes (49, 89). En un estudio anterior por Kouri y cols., (7) se encontró, además, que la CRF19 causa una progresión particularmente rápida a sida (<3 años después de la seroconversión, *versus* 5 a 10 años

para otros subtipos y CRF) y está asociado con resistencia a los medicamentos en numerosos pacientes recién infectados (123).

Como ya se ha explicado, en el presente estudio se encontró un mayor número de cambios aminoacídicos y mutaciones asociadas a resistencia en el gen *gag* entre los pacientes no tratados, por ello se confeccionaron mapas de calor en los que se graficaron los cambios aminoacídicos contra el subtipo viral (general y por grupos), que se muestran en las figuras 11 (para las proteínas P1, P2 y P7), 12 (para la proteína P6), 13 (para la proteína P17) y 14 (para la proteína P24).

Se destaca en los mapas algunos de los cambios detectados con mayor frecuencia en el grupo de pacientes no tratados (encontrados). Como se aprecia muchos de los cambios se dan en los recombinantes (BG, 18 y 19), los que se encuentran numéricamente en mayoría en este grupo mencionado con anterioridad.

Troyano-Hernández y cols., en el 2022, encontraron marcadores específicos únicos en nueve variantes del grupo M: CRFs_24_BG, 42_BF, 63_02A, 65_cpx, 83_cpx y 90_BF1, subtipos A3 y A6, y subtipo F. Estos marcadores se conservaron en más del 75 % de las secuencias de la variante correspondiente y eran únicos para esa variante (119). Dado que la evolución viral es el resultado de presiones selectivas para la adaptación sobre la alta diversidad del VIH, ellos consideraron que esos marcadores se fijaron durante la evolución del VIH debido a diferentes presiones selectivas cuando se originaron estas variantes.

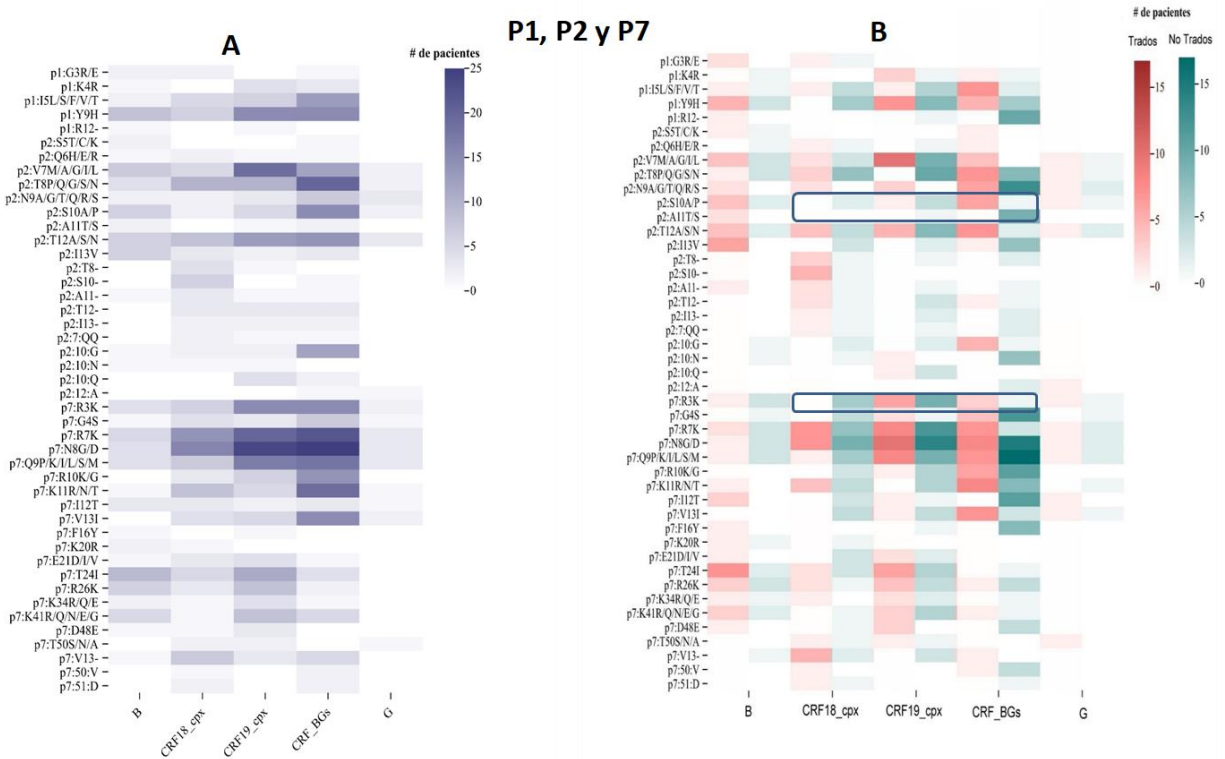


Figura 11. Número de pacientes por mutaciones en las proteínas P1, P2 y P7 del VIH-1, según los subtipos identificados. **A)** Total de pacientes. **B)** Tratados y no tratados.

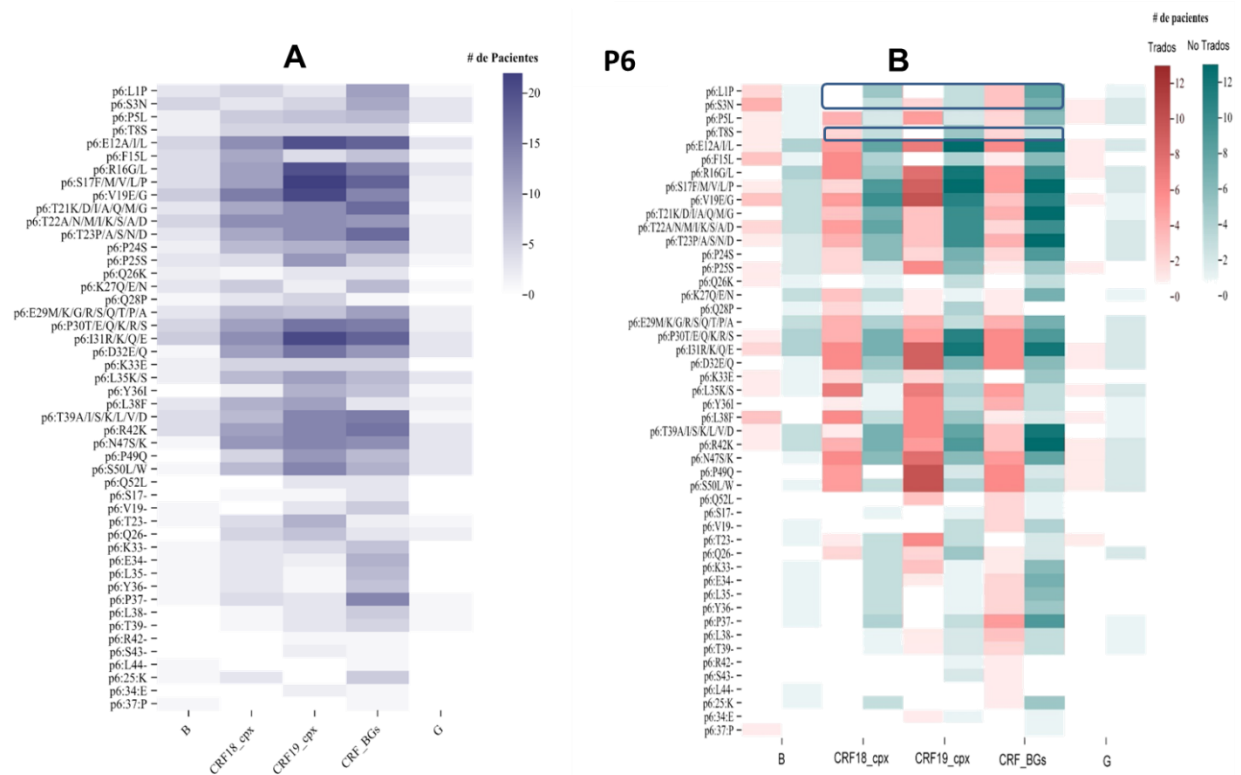


Figura 12. Número de pacientes por mutaciones en la proteína P6 del VIH-1, según los subtipos identificados. **A)** Total de pacientes. **B)** Tratados y no tratados.

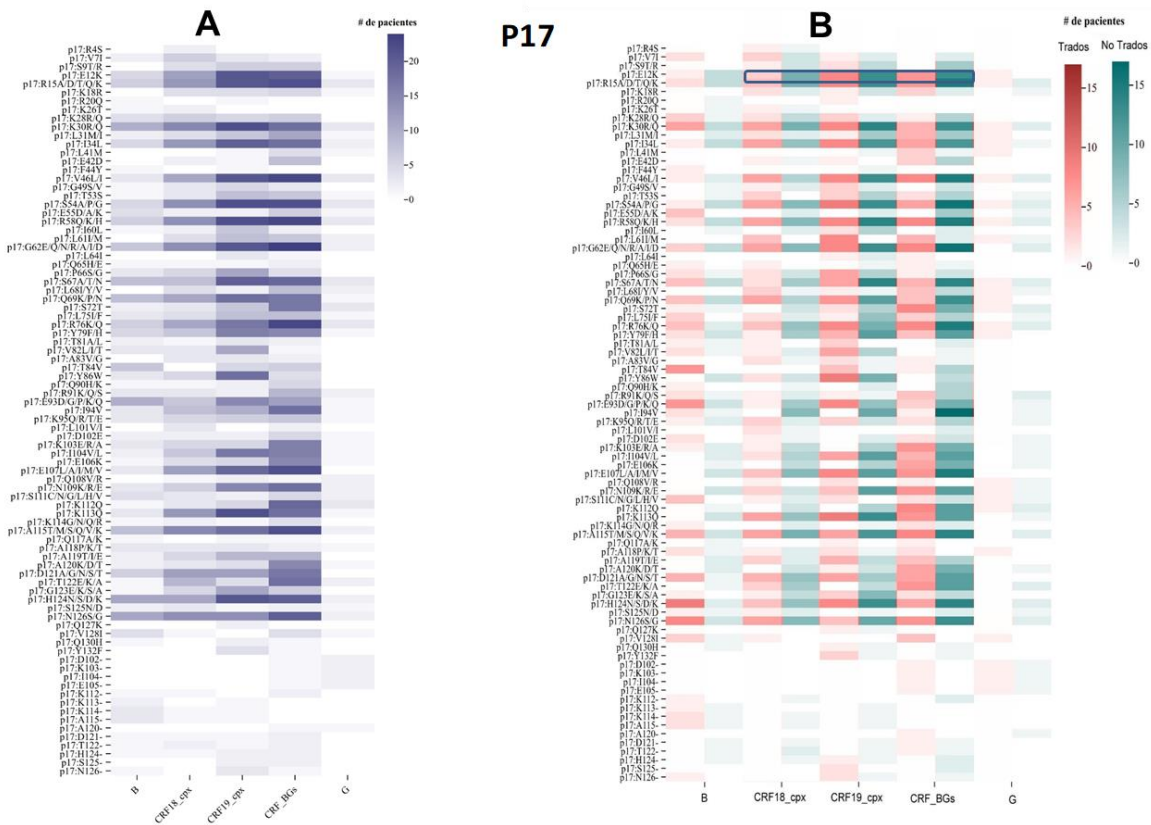


Figura 13. Número de pacientes por mutaciones en la proteína P17 del VIH-1, según los subtipos identificados. **A)** Total de pacientes. **B)** Tratados y no tratados.

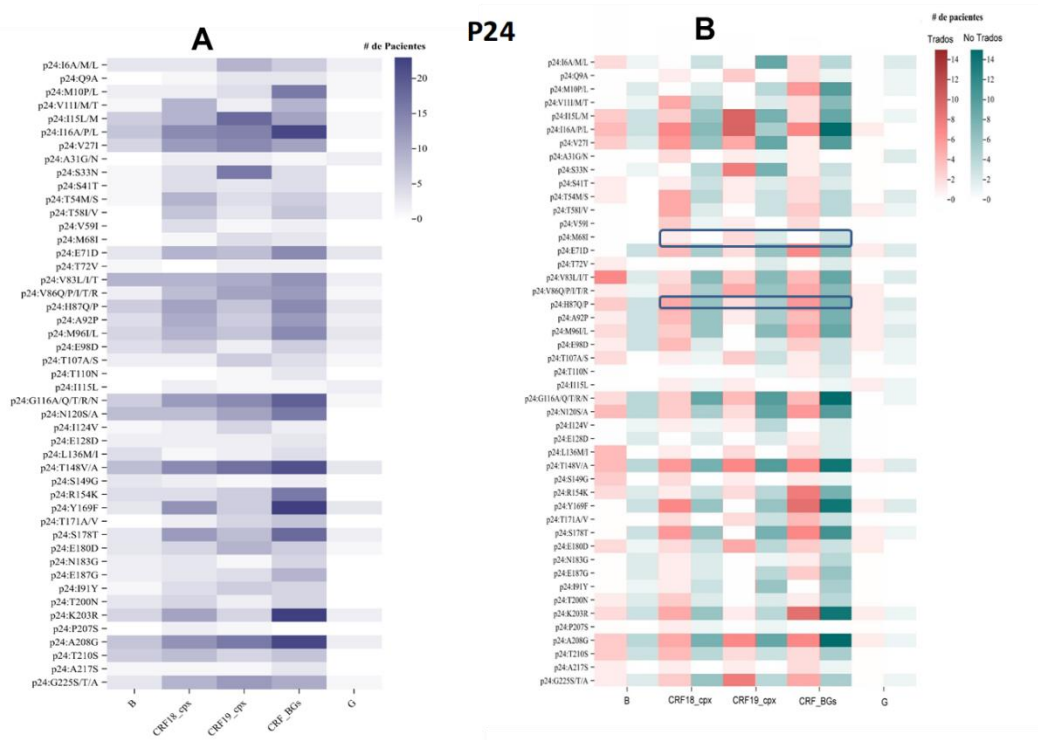


Figura 14. Número de pacientes por mutaciones en la proteína P24 del VIH-1, según los subtipos identificados. **A)** Total de pacientes. **B)** Tratados y no tratados.

Finalmente, y para demostrar en la presente investigación que la mayoría de los pacientes en el grupo de no tratados eran formas recombinantes, se muestra la figura 15 que representa la frecuencia de pacientes por subtipos virales identificados en pacientes tratados y no tratados.

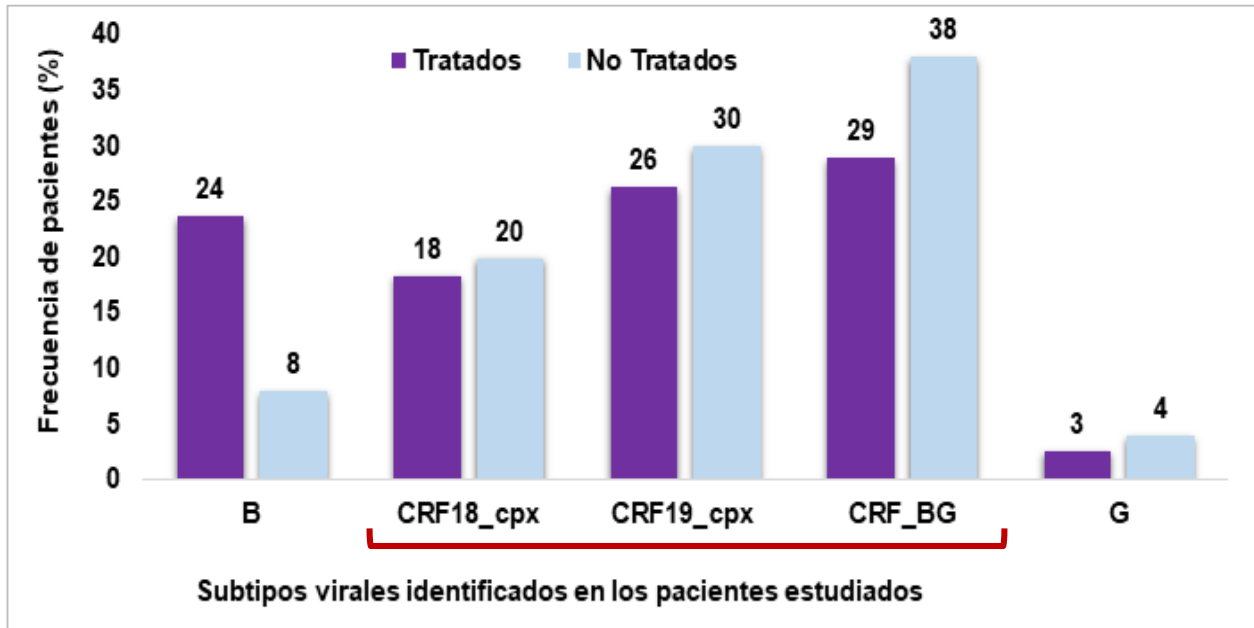


Figura 15. Frecuencia de pacientes por subtipos virales identificados en pacientes tratados y no tratados.

Un estudio llevado a cabo por la Lic. Dianne Díaz entre 2014-2015, titulado “Caracterización genética de la región V3 de la molécula gp120 del VIH-1 y predicción del fenotipo viral”, en el que se incluyeron 100 plasmas de pacientes infectados, comentó también la elevada frecuencia de mutaciones en la región V3 que confieren cambio de tropismo y/o resistencia a Maraviroc, relacionada con diferentes variantes genéticas de VIH-1. El estudio concluyó que este hallazgo podría proveer una vía genética diferente para el desarrollo de resistencia y cambio de tropismo. Años más tarde, la Lic. Anamary Batista realiza un estudio titulado “Predicción del Tropismo en variantes virales de VIH-1 que circulan en Cuba. 2017-2019. Implicaciones para la patogenia de la infección y la respuesta al Maraviroc”, en el que se estudiaron 96 plasmas, encontrando nuevamente una elevada frecuencia de polimorfismos y mutaciones que confieren resistencia a Maraviroc en las regiones V2 y V3 del VIH-1 de las formas recombinantes cubanas. El trabajo concluyó que ello podría estar relacionado con la existencia de una resistencia natural a este antirretroviral. Debido a la amplia variabilidad presente en la epidemia

cubana y los hallazgos de los estudios previos sería importante profundizar en las implicaciones que esta diversidad tiene sobre los cambios encontrados en los diversos genes estudiados y su relación con la resistencia a los ARVs en uso.

Como se puede observar en los resultados del presente trabajo un gran número de pacientes no tratados estaban infectados con formas recombinantes, lo que pudiera justificar algunos de los resultados aquí presentados. Sin embargo, el papel real de esta diversidad conlleva a análisis más profundos donde se homogenicen los grupos a estudiar, el tipo de infección de cada paciente y la implicación de las mutaciones no solo genotípica sino también fenotípicamente, entre otras variables a considerar.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- El grupo de individuos estudiados refleja las características de la epidemia cubana de VIH-1, con predominio del sexo masculino y preferencia sexual HSH.
- El grupo de estudio muestra una inmunosupresión severa en menos de cinco años.
- Las variantes virales identificadas en el gen gag evidencian la elevada diversidad genética, con superioridad de las formas recombinantes.
- Se demuestra el mantenimiento en el tiempo de las formas recombinantes únicas, a expensas de la alta variabilidad genética de la epidemia de VIH-1 en Cuba.
- Los hallazgos confirman la elevada conservación de la proteína p24 del VIH-1, sugiriendo su papel como posible blanco terapéutico para el nuevo antiviral Lenacapavir.
- Se evidencia que las mutaciones en el gen gag tienen implicaciones en el fracaso virológico a los IP.
- Las mutaciones de resistencia identificadas no demostraron un patrón relacionado con la presión del fármaco, por lo que los cambios observados en los virus de pacientes no tratados pudieran estar relacionados con una alta variabilidad natural de las formas recombinantes cubanas y no con la presión farmacológica.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

VI. RECOMENDACIONES

- Incrementar el número de individuos para homogenizar los subtipos del VIH-1 en los grupos de pacientes tratados y no tratados.
- Realizar análisis filogenético del genoma completo del VIH-1 en las muestras de pacientes cubanos, para definir nuevas formas recombinantes con implicación en las técnicas de diagnóstico molecular y para pruebas de resistencia.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. ONUSIDA. Estadísticas mundiales sobre el VIH 2023 [cited 2025 03/03].
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. 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.
6. 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.
7. 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.
8. . !!! INVALID CITATION !!!
9. Thomson MM, Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev*. 2005;7(4):210-24.
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. Haseltine WA. Replication and pathogenesis of the AIDS virus. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 1988;1(3):217-40.
12. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardländer B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;29(2):184-90.
13. Tedbury PR, Freed EO. HIV-1 gag: an emerging target for antiretroviral therapy. *Current topics in microbiology and immunology*. 2015;389:171-201.
14. Li G, Verheyen J, Theys K, Piampongsant S, Van Laethem K, Vandamme AM. HIV-1 Gag C-terminal amino acid substitutions emerging under selective pressure of protease inhibitors in patient populations infected with different HIV-1 subtypes. *Retrovirology*. 2014;11:79.
15. Robinson LH, Myers RE, Snowden BW, Tisdale M, Blair ED. HIV type 1 protease cleavage site mutations and viral fitness: implications for drug susceptibility phenotyping assays. *AIDS research and human retroviruses*. 2000;16(12):1149-56.
16. Bally F, Martinez R, Peters S, Sudre P, Telenti A. Polymorphism of HIV type 1 gag p7/p1 and p1/p6 cleavage sites: clinical significance and implications for resistance to protease inhibitors. *AIDS research and human retroviruses*. 2000;16(13):1209-13.

17. Gupta RK, Kohli A, McCormick AL, Towers GJ, Pillay D, Parry CM. Full-length HIV-1 Gag determines protease inhibitor susceptibility within in vitro assays. *AIDS (London, England)*. 2010;24(11):1651-5.
18. Pública MRNVdMdS. Estadística de VIH en Cuba. 2023.
19. Peeters M, D'Arc M, Delaporte E. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev*. 2014;16(1):23-34.
20. Gao F YL, White AT, et al. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in West Africa. *Nature*. 1992;358:495–9.
21. 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.
22. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 2000;287(5453):607-14.
23. Straus ES. Human Immunodeficiency Viruses: Replication. In: Freed OE, Martin AM, editors. *Fields Virology 6th edition*. 2. Philadelphia2013.
24. Retroviridae. In: Goff SP, editor. *Fields Virology 6th edition*. 2. Philadelphia, PA 19103 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business; 2013.
25. Harrison M, Stewart S, Tomlinson D. What's new in AIDS related malignancies? A report from the XI International Conference on AIDS, Vancouver, 7-12 July 1996. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1996;8(5):336-7.
26. Balasubramaniam M, Pandhare J, Dash C. Immune Control of HIV. *J Life Sci (Westlake Village)*. 2019;1(1):4-37.
27. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. . *Lancet* 2014;384(9939):258-71.
28. Sever B, Otsuka M, Fujita M, Ciftci H. A review of FDA-approved anti-HIV-1 drugs, anti-gag compounds, and potential strategies for HIV-1 eradication. *International journal of molecular sciences*. 2024;25(7):3659.
29. Abbas AK. Congenital and Acquired Immunodeficiencies. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Cellular and Molecular Immunology 8th edition*. Philadelphia, PA 19103-28992015.
30. Rosenkranz A. Inhibition of HIV-1 Matrix Functions by Novel Inhibitor, MTI-14: Drexel University; 2018.
31. 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.
32. Reyes-Chilpa R, Reyes M. Compuestos naturales de plantas de la familia Clusiaceae: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, ISSN 0378-1844, Vol 34, N° 6, 2009, pags 385-392. 2009;34.
33. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 2010;46(1):5-14.

34. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *The New England journal of medicine*. 1991;324(14):954-60.
35. Freed EO, Ross SR. Retroviruses 2004: review of the 2004 Cold Spring Harbor Retroviruses Conference. *Retrovirology*. 2004;1:25.
36. Sabin CA, Lundgren JD. The natural history of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013;8(4):311-7.
37. Weber J. The pathogenesis of HIV-1 infection. *British medical bulletin*. 2001;58:61-72.
38. Coffin JM. HIV viral dynamics. *AIDS (London, England)*. 1996;10 Suppl 3:S75-84.
39. 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.
40. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of virology*. 1994;68(7):4650-5.
41. Fauci AS, Stanley S, et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV reproduction. *Ann Intern Med* 1996;124:654.
42. 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.
43. Kitawi CR, Hunja WC, Aman R, Ogutu RB, Muigai WTA, Kokwaro OG, et al. Partial HIV C2V3 envelope sequence analysis reveals association of coreceptor tropism, envelope glycosylation and viral genotypic variability among Kenyan patients on HAART. *Virology Journal*. 2017;14(29):11.
44. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwang D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS*. 2019;14(3):153–60.
45. Staszewski S, Loveday C, Picazo JJ, Dellarmonica 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*. 1996;276(2):111-7.
46. 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.
47. Williams A, Menon S, Crowe M, Agarwal N, Bicler J, Bbosa N, et al. Geographic and Population Distributions of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 and HIV-2 Circulating Subtypes: A Systematic Literature Review and Meta-analysis (2010-2021). *J Infect Dis*. 2023;228(11):1583-91.
48. Machado LY, Blanco M, López LS, Díaz HM, Dubed M, Valdés N, et al. National survey of pre-treatment HIV drug resistance in Cuban patients. *PloS one*. 2019;14(9):e0221879.
49. Kourí V, Pérez L, Alemán Y, Pérez J, C. F, Pintos Y, et al. Molecular epidemiology of clinical HIV-1 sequences isolated between 2008 -2018 in Cuba. *IAS 2019*2019.

50. Nka AD, Teto G, Santoro MM, Ngum Ndze V, Takou D, Dambaya B, et al. HIV-1 Gag gene mutations, treatment response and drug resistance to protease inhibitors: A systematic review and meta-analysis protocol. *PLoS one*. 2021;16(7):e0253587.
51. Moltó J, Gutiérrez F, Mora A, del Mar Masiá M, Escolano C, González E, et al. Factores asociados a la resistencia a los inhibidores de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana. *Medicina clínica*. 2002;118(19):721-4.
52. Pettit SC, Clemente JC, Jeung JA, Dunn BM, Kaplan AH. Ordered processing of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor is influenced by the context of the embedded viral protease. *Journal of virology*. 2005;79(16):10601-7.
53. Pettit SC, Lindquist JN, Kaplan AH, Swanstrom R. Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. *Retrovirology*. 2005;2:66.
54. Pettit SC, Moody MD, Wehbie RS, Kaplan AH, Nantermet PV, Klein CA, et al. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *Journal of virology*. 1994;68(12):8017-27.
55. Gross I, Hohenberg H, Wilk T, Wieggers K, Grättinger M, Müller B, et al. A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *The EMBO journal*. 2000;19(1):103-13.
56. Kräusslich HG, Fäcke M, Heuser AM, Konvalinka J, Zentgraf H. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *Journal of virology*. 1995;69(6):3407-19.
57. Shehu-Xhilaga M, Kraeusslich HG, Pettit S, Swanstrom R, Lee JY, Marshall JA, et al. Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *Journal of virology*. 2001;75(19):9156-64.
58. Pettit SC, Henderson GJ, Schiffer CA, Swanstrom R. Replacement of the P1 amino acid of human immunodeficiency virus type 1 Gag processing sites can inhibit or enhance the rate of cleavage by the viral protease. *Journal of virology*. 2002;76(20):10226-33.
59. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WW, Wynhoven B, Mo T, Hogg RS, et al. Prevalence and clinical implications of insertions in the HIV-1 p6Gag N-terminal region in drug-naive individuals initiating antiretroviral therapy. *Antiviral therapy*. 2003;8(2):91-6.
60. de Oliveira T, Engelbrecht S, Janse van Rensburg E, Gordon M, Bishop K, zur Megede J, et al. Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness? *Journal of virology*. 2003;77(17):9422-30.
61. Gallego O, de Mendoza C, Corral A, Soriano V. Changes in the human immunodeficiency virus p7-p1-p6 gag gene in drug-naive and pretreated patients. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):1245-7.
62. Bandaranayake RM, Prabu-Jeyabalan M, Kakizawa J, Sugiura W, Schiffer CA. Structural analysis of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE protease in complex with the substrate p1-p6. *Journal of virology*. 2008;82(13):6762-6.
63. Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika E, Schiffer CA. Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes. *Structure (London, England : 1993)*. 2002;10(3):369-81.

64. Fun A, Wensing AM, Verheyen J, Nijhuis M. Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology*. 2012;9:63.
65. Condra JH, Holder DJ, Schleif WA, Blahy OM, Danovich RM, Gabryelski LJ, et al. Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Journal of virology*. 1996;70(12):8270-6.
66. Molla A, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, Mo HM, et al. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nature medicine*. 1996;2(7):760-6.
67. Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika EA, King NM, Schiffer CA. Structural basis for coevolution of a human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid-p1 cleavage site with a V82A drug-resistant mutation in viral protease. *Journal of virology*. 2004;78(22):12446-54.
68. Logsdon BC, Vickrey JF, Martin P, Proteasa G, Koepke JI, Terlecky SR, et al. Crystal structures of a multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease reveal an expanded active-site cavity. *Journal of virology*. 2004;78(6):3123-32.
69. Prabu-Jeyabalan M, King NM, Nalivaika EA, Heilek-Snyder G, Cammack N, Schiffer CA. Substrate envelope and drug resistance: crystal structure of RO1 in complex with wild-type human immunodeficiency virus type 1 protease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(4):1518-21.
70. Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika EA, Romano K, Schiffer CA. Mechanism of substrate recognition by drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease variants revealed by a novel structural intermediate. *Journal of virology*. 2006;80(7):3607-16.
71. Sánchez León AT, SANCHEZ LEON AT. Evolución asociada al antígeno leucocitario humano del gen gag del virus de inmunodeficiencia humana circulante en Centroamérica. 2016.
72. World-Medical-Association. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects 2008 [Available from: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/7c.pdf>].
73. Hansen J, Waibel J, Timme S, Gitsch G, Bossart M, Oehler MK, et al. Validity Parameters of the Human Papillomavirus Detection Test Hybrid Capture 2 With and Without Cytology After Laser Destruction and Large Loop Excision of the Transformation Zone Treatment of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Lesions. *J Low Genit Tract Dis*. 2017;21(4):289-93.
74. Dirección Nacional de Epidemiología M. Base de datos nacional de la infección por VIH. 2018.
75. Perez J, Perez D, Gonzalez I, Diaz Jidy M, Orta M, Aragonés C, et al. Approaches to the management of HIV-AIDS in Cuba. 2004.
76. MINSAP. Plan estratégico nacional para la prevención y el control de las ITS y el VIH/SIDA. 2014-2018. 2013.
77. Machado LY, Blanco M, Lopez LS, Diaz HM, Dubed M, Valdes N, et al. National survey of pre-treatment HIV drug resistance in Cuban patients. *PloS one*. 2019;14(9):e0221879.
78. Croxford S, Stengaard AR, Brännström J, Combs L, Dedes N, Girardi E, et al. Late diagnosis of HIV: An updated consensus definition. *HIV Med*. 2022;23(11):1202-8.

79. Colomer M, Ruiz A, Moris A, Prado JG. Restriction factors: From intrinsic viral restriction to shaping cellular immunity against HIV-1. *Front Immunol.* 2018;9(2876).
80. Dean L. Maraviroc Therapy and CCR5 Genotype. In: Pratt V, McLeod H, Rubinstein W, Dean L, Kattman B, Malheiro A, editors. *Medical Genetics Summaries.* Bethesda MD2012.
81. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution.* 1985;22(2):160-74.
82. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-9.
83. Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Díaz H, Delgado E, Parga EV, et al. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS (London, England).* 2002;16(12):1643-53.
84. Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S, et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *The Lancet Infectious diseases.* 2019;19(2):143-55.
85. Hemelaar J, Loganathan S, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Kirtley S. Country Level Diversity of the HIV-1 Pandemic between 1990 and 2015. *Journal of virology.* 2020;95(2).
86. Ariën KK, Vanham G, Arts EJ. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nature Reviews Microbiology.* 2007;5(2):141-51.
87. 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.
88. Pérez L, Thomson MM, Bleda MJ, Aragonés C, González Z, Pérez 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.
89. Pérez L, Kourí V, Alemán Y, Abrahantes Y, Correa C, Aragonés C, et al. Antiretroviral drug resistance in HIV-1 therapy-naive patients in Cuba. *Infect Genet Evol.* 2013;16:144-50.
90. Machado LY, Blanco M, Dubed M, Diaz HM, Ruiz NM, Valdes N, et al. HIV type 1 genetic diversity in newly diagnosed Cuban patients. *AIDS research and human retroviruses.* 2012;28(8):956-60.
91. Machado LY, Y. P, M. DH, Pérez L, Blanco M, Kourí V, et al. Increase of recombinant forms CRF 20_23_24_BG and several URF of HIV-1 among newly diagnosed Cuban patients: 2013-2014. *ARC J of AIDS.* 2017;2(1):24-31.
92. Codoñer FM, Peña R, Blanch-Lombarte O, Jimenez-Moyano E, Pino M, Vollbrecht T, et al. Gag-protease coevolution analyses define novel structural surfaces in the HIV-1 matrix and capsid involved in resistance to Protease Inhibitors. *Scientific reports.* 2017;7(1):3717.
93. Rihn SJ, Wilson SJ, Loman NJ, Alim M, Bakker SE, Bhella D, et al. Extreme genetic fragility of the HIV-1 capsid. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003461.
94. Perilla JR, Gronenborn AM. Molecular Architecture of the Retroviral Capsid. *Trends in biochemical sciences.* 2016;41(5):410-20.

95. Parekh BS, Ou CY, Fonjungo PN, Kalou MB, Rottinghaus E, Puren A, et al. Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(1).
96. Kosaka PM, Pini V, Calleja M, Tamayo J. Ultrasensitive detection of HIV-1 p24 antigen by a hybrid nanomechanical-optoplasmonic platform with potential for detecting HIV-1 at first week after infection. *PLoS one*. 2017;12(2):e0171899.
97. Farzin L, Shamsipur M, Samandari L, Sheibani S. HIV biosensors for early diagnosis of infection: The intertwine of nanotechnology with sensing strategies. *Talanta*. 2020;206:120201.
98. Gray ER, Turbé V, Lawson VE, Page RH, Cook ZC, Ferns RB, et al. Ultra-rapid, sensitive and specific digital diagnosis of HIV with a dual-channel SAW biosensor in a pilot clinical study. *NPJ digital medicine*. 2018;1:35.
99. Verheyen J, Knops E, Kupfer B, Hamouda O, Somogyi S, Schuldenzucker U, et al. Prevalence of C-terminal gag cleavage site mutations in HIV from therapy-naïve patients. *The Journal of infection*. 2009;58(1):61-7.
100. Verheyen J, Litau E, Sing T, Däumer M, Balduin M, Oette M, et al. Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients. *Antiviral therapy*. 2006;11(7):879-87.
101. Launay O, Duval X, Dalban C, Descamps D, Peytavin G, Certain A, et al. Lamivudine and indinavir/ritonavir maintenance therapy in highly pretreated HIV-infected patients (Vista ANRS 109). *Antiviral therapy*. 2006;11(7):889-99.
102. Knops E, Däumer M, Awerkiew S, Kartashev V, Schülter E, Kutsev S, et al. Evolution of protease inhibitor resistance in the gag and pol genes of HIV subtype G isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(7):1472-6.
103. Malet I, Roquebert B, Dalban C, Wirden M, Amellal B, Agher R, et al. Association of Gag cleavage sites to protease mutations and to virological response in HIV-1 treated patients. *The Journal of infection*. 2007;54(4):367-74.
104. Lambert-Niclot S, Flandre P, Malet I, Canestri A, Soulié C, Tubiana R, et al. Impact of gag mutations on selection of darunavir resistance mutations in HIV-1 protease. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(5):905-8.
105. Doyon L, Croteau G, Thibeault D, Poulin F, Pilote L, Lamarre D. Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *Journal of virology*. 1996;70(6):3763-9.
106. Zhang YM, Imamichi H, Imamichi T, Lane HC, Falloon J, Vasudevachari MB, et al. Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *Journal of virology*. 1997;71(9):6662-70.
107. Mammano F, Petit C, Clavel F. Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *Journal of virology*. 1998;72(9):7632-7.
108. Banke S, Lillemark MR, Gerstoft J, Obel N, Jørgensen LB. Positive selection pressure introduces secondary mutations at Gag cleavage sites in human immunodeficiency virus type 1 harboring major protease resistance mutations. *Journal of virology*. 2009;83(17):8916-24.

109. Brann TW, Dewar RL, Jiang MK, Shah A, Nagashima K, Metcalf JA, et al. Functional correlation between a novel amino acid insertion at codon 19 in the protease of human immunodeficiency virus type 1 and polymorphism in the p1/p6 Gag cleavage site in drug resistance and replication fitness. *Journal of virology*. 2006;80(12):6136-45.
110. Côté HC, Brumme ZL, Harrigan PR. Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir. *Journal of virology*. 2001;75(2):589-94.
111. Maguire MF, Guinea R, Griffin P, Macmanus S, Elston RC, Wolfram J, et al. Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449 and P453 are linked to I50V protease mutants in vivo and cause reduction of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness in vitro. *Journal of virology*. 2002;76(15):7398-406.
112. de la Carrière LC, Paulous S, Clavel F, Mammano F. Effects of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors on reverse transcriptase processing, activity, and drug sensitivity. *Journal of virology*. 1999;73(4):3455-9.
113. Prado JG, Wrin T, Beauchaine J, Ruiz L, Petropoulos CJ, Frost SD, et al. Amprenavir-resistant HIV-1 exhibits lopinavir cross-resistance and reduced replication capacity. *AIDS (London, England)*. 2002;16(7):1009-17.
114. Dam E, Quercia R, Glass B, Descamps D, Launay O, Duval X, et al. Gag mutations strongly contribute to HIV-1 resistance to protease inhibitors in highly drug-experienced patients besides compensating for fitness loss. *PLoS Pathog*. 2009;5(3):e1000345.
115. Nijhuis M, van Maarseveen NM, Lastere S, Schipper P, Coakley E, Glass B, et al. A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS medicine*. 2007;4(1):e36.
116. van Maarseveen NM, Andersson D, Lepšík M, Fun A, Schipper PJ, de Jong D, et al. Modulation of HIV-1 Gag NC/p1 cleavage efficiency affects protease inhibitor resistance and viral replicative capacity. *Retrovirology*. 2012;9:29.
117. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(3):182-92.
118. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*. 2000;288(5463):55-6.
119. Troyano-Hernández P, Reinoso R, Holguín Á. HIV Capsid Protein Genetic Diversity Across HIV-1 Variants and Impact on New Capsid-Inhibitor Lenacapavir. *Frontiers in microbiology*. 2022;13:854974.
120. Casado G, Thomson MM, Sierra M, Nájera R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40(5):532-7.
121. Sierra M, Thomson MM, Posada D, Pérez L, Aragonés C, González Z, et al. Identification of 3 phylogenetically related HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant forms in Cuba. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;45(2):151-60.

122. Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Nájera 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.

123. Zhukova A, Voznica J, Dávila Felipe M, To TH, Pérez L, Martínez Y, et al. Cuban history of CRF19 recombinant subtype of HIV-1. *PLoS Pathog.* 2021;17(8):e1009786.

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Secuencias de los cebadores empleados en el estudio.

Amplicón	Código de cebadores	Secuencia 5'- 3'
Gag-Pol RT-PCR	KVL064	GTT GTG TGA CTC TGG TAA CTA GAG ATC CCT CAG A
	KVL065	TCC TAA TTG AAC YTC CCA RAA RTC YTG AGT TC
PCR anidada	KVL066	TCT CTA GCA GTG GCG CCC GAA CAG
	KVL067	GGC CAT TGT TTA ACY TTT GGD CCA TCC
Secuencia	GA1	GAC GCA GGA CTC GGC TTG CT
	AV103	GCC ATA TCA CCT AGA ACT TT
	AV159	GGG GTT AAA TAA AAT AGT AAG
	G110	AGG CTA ATT TTT TAG GGA
	KVL078	CAT TCC TGG CTT TAA TTT TAC TG
	KVL079	GTG TCC TTC CTT YCC ACA TTT CC
	KVL080	CCC ATT CTG CAG CTT CCT CAT TG
	KVL081	AAT CKT TCY AGC TCC CTG CTT GC