

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ  
CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS DE LA DEFENSA CIVIL

---

**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**

---

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

---

**Autor: Lic. Anamary Suárez Batista**

**La Habana  
2019**

---

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ  
CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS DE LA DEFENSA CIVIL

# **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**

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

**Autor:**

**Lic. Anamary Suárez Batista**

**Tutores:**

**Dra. Vivian Kourí Cardellá, MD, PhD, DrSc**

**Lic. Lissette Pérez Santos, DrC**

**Asesores:**

**Lic. Liuber Yans Machado Zaldívar, DrC**

**Lic. Enrique Noa Romero, DrC**

**La Habana**

**2019**

## RESUMEN

La envoltura del VIH-1 interactúa con los correceptores CCR5 y CXCR4 en un proceso dinámico. La habilidad de un virión para unirse a uno u otro receptor de quimiocina para entrar a la célula diana tiene significantes implicaciones en la patogenia de la enfermedad y afecta las opciones de tratamiento. En el presente estudio se incluyeron 96 muestras de plasma pertenecientes a pacientes seropositivos al VIH-1 (tratados y no tratados) del período 2017-2019. Se secuenciaron fragmentos de las regiones *env* y *pol* del virus. Se analizó el subtipo y la predicción del fenotipo viral, las mutaciones virales así como la relación del fenotipo y el subtipo con variables clínicas, epidemiológicas y virológicas. Se obtuvo la secuencia del gen *env* en 69 muestras (71,88 %). Los subtipos de VIH-1 detectados con mayor frecuencia fueron el subtipo B, el CRF19\_cpx y los CRF\_BG (20, 23, 24). Doce muestras (20,7 %), que presentaron un subtipo viral diferente entre ambos genes fueron consideradas como URFs. El virus CRF18\_cpx fue el más representado formando parte de las URFs (7/12, 58,3 %,  $p < 0,05$ , OR: 63, IC: 6,3-622). La URF más frecuente fue la combinación de CRF18\_cpx/CRF19\_cpx, todas observadas entre los pacientes no tratados (42,8 %). El subtipo C ( $p = 0,0318$ , OR: 9,680, IC: 1,43-52,34) y el recombinante CRF19\_cpx ( $p = 0,0234$ ; OR: 4,233; IC: 1,15-15,52), mostraron asociación significativa con virus que utilizan el correceptor X4 y R5X4/X4, respectivamente. El 78,26 %, presentaron al menos una mutación asociada a resistencia a maraviroc, a pesar de que los pacientes no habían recibido terapia previa con este fármaco. El elevado porcentaje de mutaciones y/o polimorfismos observado en las secuencias cubanas, tanto del lazo V2 como V3 advierten la necesidad de evaluar a profundidad, con estudios fenotípicos, la susceptibilidad del VIH frente a los inhibidores de los correceptores.

## Listado de abreviaturas

**A:** Alanina

**aa:** Aminoácidos

**Ac:** Anticuerpo

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ALVs:** Virus de la leucosis aviar (del inglés, avian leukosis virus)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ARV:** Antirretroviral

**BMGE:** Del inglés, block mapping and gathering with entropy

**CCR5:** C-C receptor de quimiocinas tipo 5

**CXCR4:** C-X-C receptor de quimiocinas tipo 4

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

**CDC:** Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta (del inglés, Centers for Disease Control and Prevention).

**CICDC:** Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil

**CMSP:** Células mononucleares de sangre periférica

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

**CV:** Carga viral

**D:** Ácido aspártico

**E:** Ácido glutámico

**EDTA:** Etilendiaminotetracético

**ETS:** Enfermedades de Trasmisión Sexual

**dNTP:** Desoxi-ribonucleótidos trifosfatados

**FeLVs:** Virus de la leucemia felina (del inglés, feline leukemia viruses)

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

**FRs:** Formas recombinantes

**FPR:** Probabilidad de identificar incorrectamente un virus R5 como X4 (del inglés, false positive rate)

**G:** Glicina

**G2P:** Geno2pheno

**GTR:** Tiempo reversible general (del inglés, general time reversible)

**H:** Histidina

**HTLV-III:** Virus Linfotrópico Humano de Células T tipo III (del inglés, human T-cell leukemia virus type III)

**HSH:** Hombres que tienen sexo con otros hombres

**I:** Isoleucina

**IC:** Intervalo de confianza

**IN:** Integrasa

**IS:** Inductoras de sincicios (del inglés, syncytium inducing)

**ITINAN:** Inhibidores de la transcriptasa inversas no análogos de nucleósidos

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

**K:** Lisina

**L:** Leucina

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

**LT:** Linfocito T

**LTR:** Terminaciones largas repetidas (del inglés, long terminal repeat)

**M:** Metionina

**MCP-2:** Del inglés, monocyte chemotactic protein two

**Mg:** Magnesio

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**MgSO<sub>4</sub>:** Sulfato de magnesio

**MHC I y II:** Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (del inglés, major histocompatibility complex).

**MINSAP:** Ministerio de Salud Pública

**MIP-1 $\alpha$ :** Del inglés, macrophage inflammatory protein one alpha

**MIP-1  $\beta$** : Del inglés, macrophage inflammatory protein one beta

**MLVs**: Virus de la leucemia murina (del inglés, murine leukemia viruses)

**MVC**: Maraviroc

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

**nm**: Nanómetros

**NP**: No progresores

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

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

**P**: Prolina

**pb**: Pares de bases

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

**PR**: Proteasa viral

**PRap**: Progresores rápidos

**PT**: Progresores típicos

**Q**: Glutamina

**R**: Arginina

**RANTES**: Del inglés, regulated upon activation normal T-cell expressed an secreted

**RIC**: Rango intercuartil

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

**S**: Serina

**SDF-1**: Del inglés, stromal cell derived factor-1

**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

**SIVsmm**: Virus de inmunodeficiencia de los simios mangabey tiznados

**SVM**: Del inglés Support vector machine

**T**: Treonina

**TI**: Transcriptasa inversa

**TARVAE**: Terapia antirretroviral de alta eficacia

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

**V:** Valina

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**VIH-1:** Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

**VIH-2:** Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2

**W:** Triptófano

## **Tabla de contenido**

<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II OBJETIVOS</b> .....	4
<b>III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>3.1 Origen del VIH-1 y el VIH-2</b> .....	5
<b>3.2 Historia</b> .....	5
<b>3.3 Clasificación</b> .....	7
<b>3.4 Estructura del virión</b> .....	7
<b>3.5 Estructura del genoma</b> .....	9
<b>3.6 Ciclo replicativo de VIH-1</b> .....	10
<b>3.7 Tropismo viral y uso de correceptores</b> .....	13
<b>3.8 Historia natural de la enfermedad</b> .....	14
<b>3.9 Variabilidad genética de VIH-1</b> .....	16
<b>3.10 Epidemiología</b> .....	17
<b>3.10.1 Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1</b> .....	17
3.10.2 Epidemiología en Cuba.....	18
<b>3.11 Tratamiento antirretroviral</b> .....	18
3.11.1 Inhibidores de la entrada .....	19
3.11.2 Antagonistas de CCR5 .....	20
<b>3.12 Resistencia a los antirretrovirales</b> .....	20
3.12.1 Resistencia a los antagonistas de los correceptores.....	21
<b>3.13 Determinación del uso del correceptor</b> .....	21
3.13.1 Métodos fenotípicos .....	21
3.13.2 Métodos genotípicos .....	22
<b>IV MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
<b>4.1 Diseño del estudio y universo</b> .....	24
4.1.1 Universo de estudio .....	24
<b>4.2 Obtención de la información</b> .....	24
<b>4.3 Aspectos éticos</b> .....	26
<b>4.4 Procesamiento de las muestras</b> .....	26
4.4.1 Obtención y procesamiento de las muestras clínicas .....	26

4.4.2 Extracción del ARN viral.....	27
4.4.3 Síntesis y amplificación del ADN complementario (ADNc).....	27
4.4.4 Análisis de los productos de la PCR anidada de los genes <i>pol</i> y <i>env</i> .....	32
4.4.5 Purificación y secuenciación de los productos de la PCR anidada.....	32
4.4.6 Edición de las secuencias.....	35
4.4.7 Identificación de los subtipos virales.....	35
4.4.8 Análisis filogenético.....	35
4.4.9 Análisis estadístico.....	37
<b>V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Características generales de los pacientes estudiados.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2 Detección de subtipos de VIH-1 en las regiones <i>pol</i> y <i>env</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 Predicción del uso del correceptor viral y relación con el Subtipo de VIH-1.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4 Relación entre el fenotipo viral, variables clínico epidemiológicas, carga viral y el conteo de células TCD4<sup>+</sup>.....</b>	<b>56</b>
<b>5.5 Mutaciones en las regiones V2 y V3 de la proteína de envoltura gp 120, en las secuencias cubanas de VIH-1.....</b>	<b>65</b>
5.5.1 Mutaciones en el lazo V3.....	65
5.5.2 Mutaciones en el lazo V2 de la gp 120.....	69
5.5.3 Mutaciones en V2 y V3 asociadas a cambio de tropismo y resistencia a MVC.....	70
<b>5.6 Patrones de glicosilación en los lazos V3 y V2.....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

## I INTRODUCCIÓN

En 1981, se reportaron en Estados Unidos y Europa los primeros casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), representando el inicio de una de las pandemias más grandes en la historia de la humanidad. En 1983 se descubre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), perteneciente a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, reconocido como agente etiológico de la enfermedad (1). Desde el comienzo de la epidemia 77,3 millones [59,9–100 millones] de personas contrajeron la infección por el VIH y 36,9 millones [31,1–43,9 millones] de personas se encuentran actualmente viviendo con VIH a nivel global, 25,7 de ellas en África. Durante el 2017 ocurrieron 1,8 millones de nuevas infecciones y 940 000 muertes relacionadas con el sida (2).

El sida es una pandemia global causada por dos lentivirus el VIH-1 y VIH-2, que muestran similares morfología, tropismo y modos de transmisión; pero son genética y antigénicamente divergentes. El VIH-1 causa alrededor del 95 % de todas las infecciones, mientras que el VIH-2 está limitado principalmente a países de África (3).

El VIH-1 es altamente variable genéticamente, debido a tres factores fundamentales; carencia de actividad correctora de errores de la reverso transcriptasa, tiempos cortos de replicación y recombinación genética (4). El VIH-1 se clasifica en cuatro grupos distintos: M (main), O (outlier), N (no-M, no-O) y P que fue identificado más recientemente. Los virus pertenecientes al grupo M son los mayores responsables de la infección global y cuenta con nueve subtipos puros (A, B, C, D, F, G, H, J y K), presenta además 98 formas recombinantes circulantes (CRFs, del inglés circulating recombinant forms) y numerosas formas únicas recombinantes (URFs, del inglés unique recombinant forms) (5, 6).

El altamente estructurado ARN viral 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 (matrix, 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 transactivador 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)) (7).

El gen *pol* de VIH es uno de los más conservados 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 el presente (7).

El gen *env* juega un papel importante en la infección y el reconocimiento antigénico y su variabilidad ha sido el principal obstáculo para el desarrollo de nuevos candidatos vacunales y nuevas estrategias terapéuticas. El lazo V3, presente en el gen *env*, es un componente de la región de unión al receptor de quimiocinas y es el mayor determinante del uso del correceptor. La importancia funcional de V3 está en el hecho de que una delección en V3 puede cambiar completamente la infectividad del virus. En contraste V2 no es esencial para la infectividad, sin embargo participa en varias funciones de *env*, los cambios en la longitud y en los patrones de glicosilación permiten al virus escapar de la neutralización mediada por anticuerpos específicos para V3 (8).

Las variantes virales que utilizan el C-C receptor de quimiocinas tipo 5 (CCR5) se caracterizan en cultivos celulares por ser no inductoras de sincicios (NIS), tener baja tasa de replicación, tropismo por macrófagos y predominan en las primeras etapas de la infección, catalogándose como virus con fenotipo R5. Aquellos virus que emplean el C-X-C receptor de quimiocinas tipo 4 (CXCR4) para la entrada a la célula, infectan principalmente células T y se destacan por su habilidad para la inducción de sincicios (IS), tienen alta tasa de replicación y predominan en la fase tardía de la enfermedad, clasificándose como virus con fenotipo X4. Existe a la vez un grupo de virus que se clasifican con fenotipo dual (R5X4) por su capacidad para unirse tanto al correceptor CCR5 como al CXCR4. Se considera que esta es una fase transitoria en la evolución del virus R5 a X4, aunque fenotípicamente se comportan como virus X4 (9). El VIH ha demostrado su capacidad para cambiar el tropismo durante el curso de la enfermedad, proceso que el virus utiliza adaptativamente para propagarse en presencia de antivirales (10).

El acceso limitado a los ARV en algunas partes del mundo, los niveles subóptimos 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 VIH (11).

El Maraviroc (MVC) es la única droga del grupo de los antagonistas de los correceptores, aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, del inglés Food and Drugs Administration) de

Estados Unidos, para el tratamiento de la infección con variantes R5 de VIH-1. Es el primer ARV que tiene como diana una proteína del hospedero en vez de una proteína viral. Su mecanismo de acción consiste en una inhibición alostérica de la unión de la glicoproteína gp 120 al correceptor CCR5 impidiendo la entrada del virus a la célula (12). A pesar de que esta droga comenzó a utilizarse en el 2007 ya se ha informado la existencia de variantes genéticas de VIH-1 resistentes a MVC. Aunque los mecanismos por los cuales esto ocurre no están claros aún, se conoce que un grupo de mutaciones en el lazo V3 de la glicoproteína gp 120 están asociadas a la resistencia.

En Cuba, los primeros casos de VIH se diagnosticaron en el año 1986. Según datos de la Vice dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MINSAP), hasta el mes de diciembre del 2018 se han reportado 31 264 personas infectadas con VIH y viviendo con VIH, 25 494 (82 %). El sexo masculino es el más afectado y representa el 80,5 % (25 161/31 264) del total de casos de la epidemia. Los HSH representan el 60,02 % del total de casos diagnosticados (18 767/31 264) y el 74,59 % (19 921/22 880) entre los del sexo masculino. El 86 % de las personas viviendo con VIH están en tratamiento y la meta es llegar al 90 % al cierre del año 2020 (13).

Se conoce que la epidemia de VIH-1 en Cuba es atípica comparada con el resto de las regiones de América y el Caribe donde predomina el subtipo B. Esta se caracteriza por una elevada diversidad de variantes genéticas de VIH-1 incluyendo una alta tasa de CRFs. En la última década se ha observado la progresión a sida, en pacientes con menos de tres años de diagnóstico, en los cuales se ha detectado la variante viral CRF19\_cpx, la misma se ha asociado con rápida progresión a sida, altos valores de carga viral, fenotipo viral X4 y mayores niveles de RANTES (14).

El presente estudio se enmarca en la caracterización genética de muestras de pacientes seropositivos a VIH-1 y su relación con el subtipo viral, el tropismo y la resistencia a MVC en pacientes que no han recibido tratamiento con esta droga.

## II OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la relación entre el tropismo de las variantes de VIH-1 que circulan en Cuba, en pacientes tratados y no tratados, con variables epidemiológicas, virales y clínicas y las implicaciones para el uso de inhibidores de los correceptores.

### Objetivos específicos

1. Determinar las variantes genéticas de VIH-1 en los genes *pol* y *env* de pacientes cubanos tratados y no tratados.
2. Predecir el fenotipo viral a partir de la secuencia genética del lazo V3 de la molécula gp 120 de VIH-1.
3. Determinar la relación del fenotipo y subtipo viral con las variables virales, epidemiológicas y clínicas de los pacientes tratados y no tratados.
4. Identificar las mutaciones presentes en las regiones V2 y V3 de la glicoproteína gp 120 del VIH-1 y su relación con la variante viral, el tropismo y la resistencia al Maraviroc.

### III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 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 (15). 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) (15). El VIH-2 está más estrechamente relacionado con el virus de inmunodeficiencia de los simios mangabey tiznados (VIS smm) (15, 16), 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 (17, 18).

#### 3.2 Historia

A finales de la década del 70 e inicios de los 80, 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<sup>+</sup> (del inglés cluster of differentiation) en sangre periférica (7). La comunidad médica fue la primera en prestarle atención a esta enfermedad en junio de 1981 cuando el Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta (CDC, del inglés Centers for Disease Control and Prevention) reportó la existencia en California de cinco hombres con una inmunodeficiencia severa en el Morbidity and Mortality Weekly Report (7). 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 (7).

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 sugirieron una variedad de microorganismos como posibles agentes causales del sida, como fue llamada posteriormente esta enfermedad (7). En la primavera de 1983, Montagnier y sus colegas del Instituto Pasteur reportaron el aislamiento de un agente, 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<sup>+</sup> en cultivos celulares (7). Gallo y sus colegas del Instituto Nacional de Salud, 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 relacionaban a LAV con la inmunodeficiencia que mostraban los individuos de los grupos de riesgo (7). 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 (7). 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 (7).

### 3.3 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 ácido ribonucleico (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) (19) 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 (20).

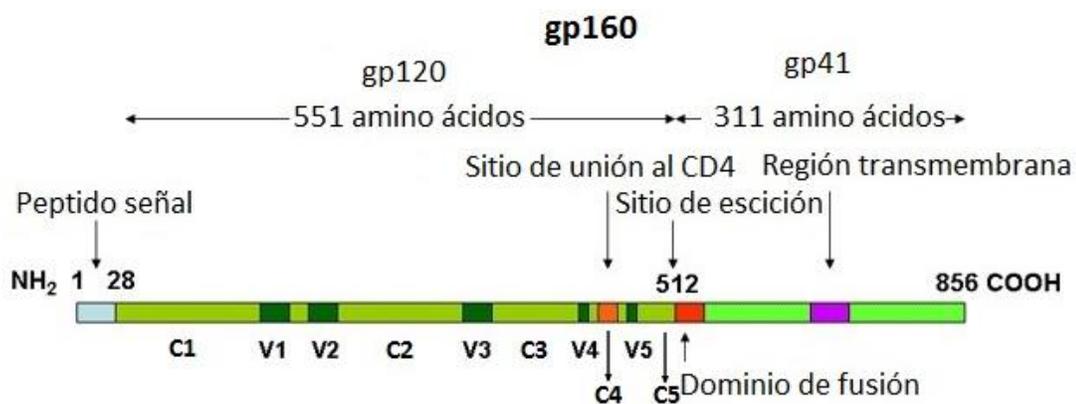
Esta vieja clasificación fue utilizada en definiciones parciales de varios géneros de la familia *Retroviridae*, pero el número de géneros ha sido nuevamente expandido sobre la base de nuevos criterios. Los géneros han recibido nuevos nombres y han sido formalizados por el Comité Internacional de Taxonomía 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 (19).

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 (21).

### 3.4 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  $\beta$ -2 microglobulina y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MHC I y II, del inglés major histocompatibility complex). Debajo de la membrana lipídica, se encuentra la proteína matriz p17 que se une a la gp 41. La gp 120 y gp 41 son producidas a partir de la escisión de la gp 160. El complejo envoltura –glicoproteínas está compuesta por tres pares de gp 120/gp 41 y es el encargado de mediar los múltiples pasos del proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula diana (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estructura lineal de la gp 120

Fuente: Cellular and Molecular Immunology (8th edition, 2015)

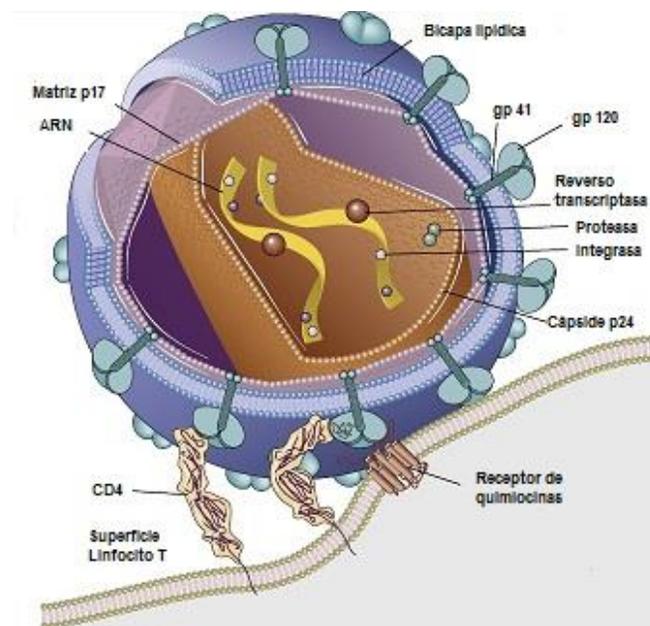
La gp 120 está compuesta por dominios conservados (C1-C5) y variables (V1-V5), ubicados de forma alterna, que proporcionan una integridad estructural y funcional, que incluye el sitio de unión al correceptor. Los residuos de cisteína presentes en la gp 120 son altamente conservados y forman enlaces disulfuro (19). La región de unión de gp 120 al receptor de quimiocinas está compuesta por las cadenas  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 20 y  $\beta$ 21, el lazo V3 y el doble lazo V1/V2 (8).

El lazo V3 es un componente de la región de unión al receptor de quimiocinas y es el mayor determinante del uso del correceptor. La longitud de V3 es esencialmente constante de 34-35 aminoácidos. Aunque esta secuencia de aminoácidos es altamente variable excepto en los virus del subtipo C, donde esta secuencia es bastante conservada, la variación de las secuencias está limitada al 20 % de las posiciones de aminoácidos y se localiza primeramente en dos de las cadenas  $\beta$  en la corona de V3. La importancia funcional de V3 está en el hecho de que una delección en V3 puede cambiar completamente la infectividad del virus (8).

En contraste con V3, V2 no es esencial para la infectividad, sin embargo participa en varias funciones de Env, proporciona los motivos que sirven para la unión a la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , contribuye a la formación de trímeros y participa como parte de los receptores de quimiocinas de la superficie, también juega un papel crucial enmascarando los epítopes de gp 120, los cambios en la longitud y en los patrones de glicosilación permiten al virus escapar de la neutralización mediada por anticuerpos específicos para V3 (8).

**Cápsida 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).



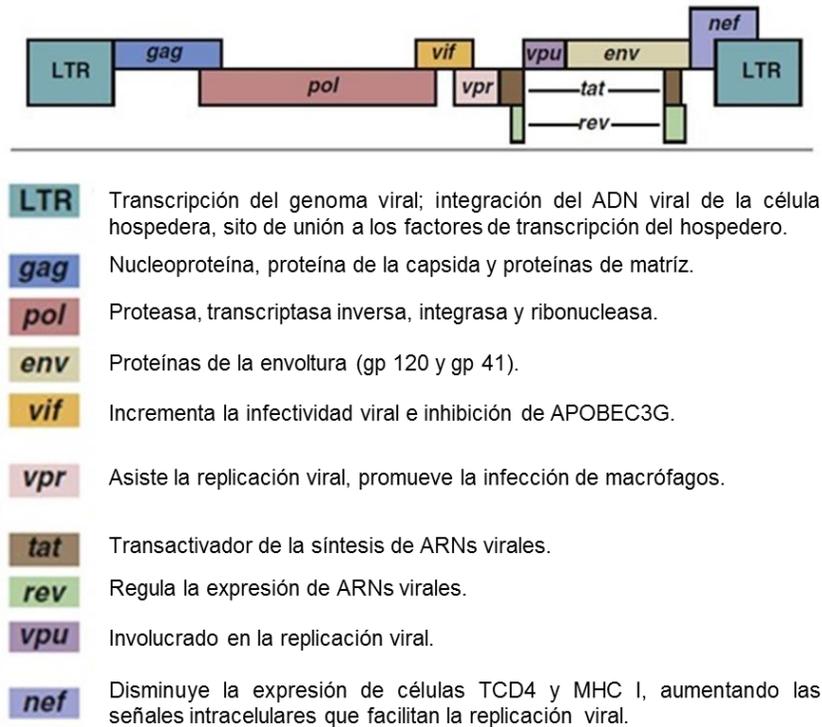
**Figura 2.** Estructura de la partícula viral de VIH-1.

Fuente: Cellular and Molecular Immunology (8th edition, 2015)

### 3.5 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 3). Las secuencias terminales largas repetidas (TLR, del inglés long terminal repeats) 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 cápsida 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. Como es típico de los retrovirus el genoma de VIH-1 contiene seis genes adicionales que también son regulatorios llamados *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr*, y *vpu*, cuyos productos son encargados de la replicación viral y la evasión de la respuesta inmune del hospedero (22).

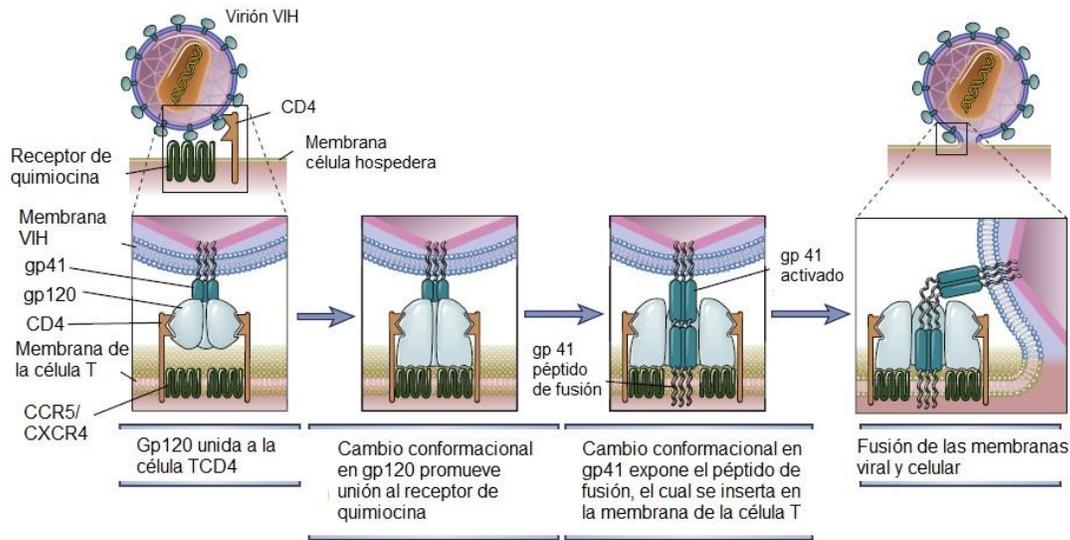


**Figura 3.** Organización del genoma de VIH-1.

Fuente: Cellular and Molecular Immunology (8th edition, 2015)

### 3.6 Ciclo replicativo de VIH-1

El VIH infecta *in vivo* las células que expresan las moléculas CD4<sup>+</sup>, los linfocitos T, células del linaje de los monocitos, los macrófagos, entre otras. El primer paso en el ciclo de replicación, es la adhesión de la subunidades de gp 120 a la molécula de CD4<sup>+</sup>, lo cual induce un cambio conformacional que promueve una adhesión secundaria de gp 120 a un correceptor de quimiocinas. La unión al correceptor induce un cambio conformacional en gp 41 que expone una región hidrofóbica, llamada péptido de fusión, el cual se inserta en la membrana celular y permite la fusión de la envoltura viral con la membrana celular de la célula diana (**Figura 4**) (22) y la subsiguiente entrada de la cápside al citoplasma celular (23).



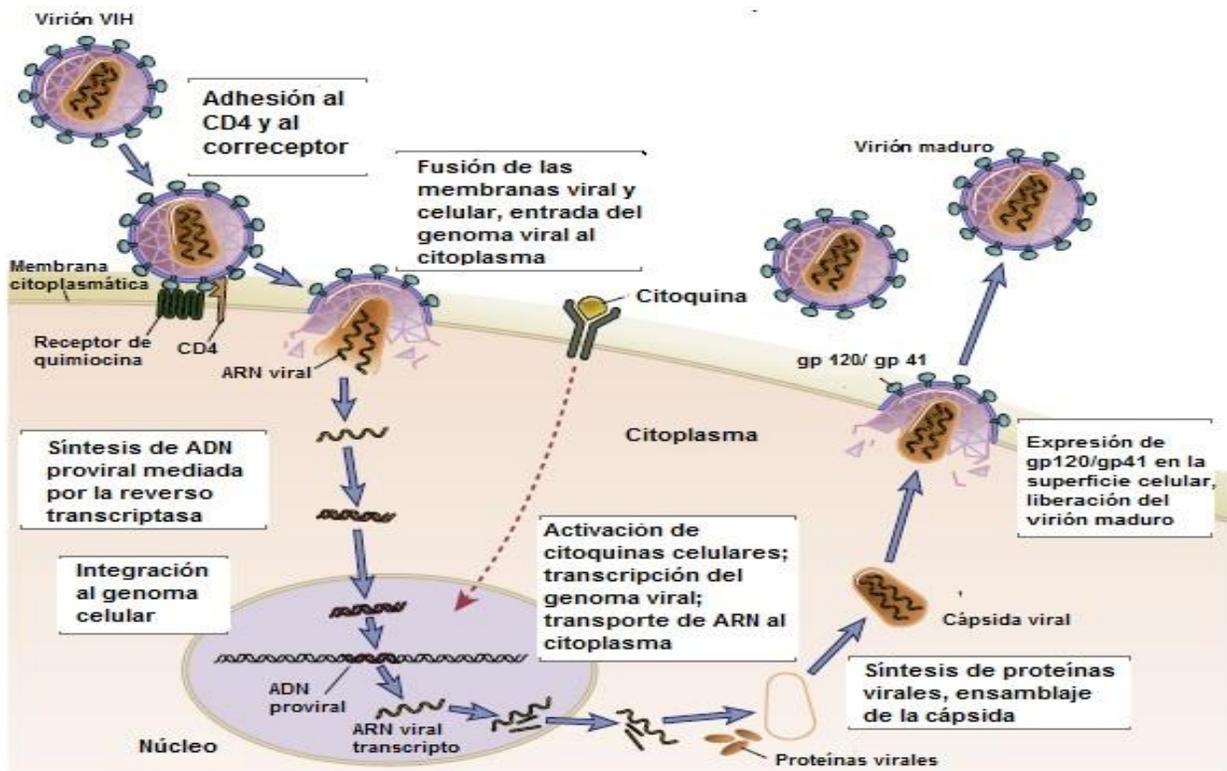
**Figura 4.** Mecanismo de entrada del VIH-1 a la célula hospedera.

Fuente: Cellular and Molecular Immunology (8th edition, 2015)

Después de la fusión, en el citoplasma ocurre el desnudamiento viral dependiente de pH, se eliminan la cápside y la nucleocápside quedando libre el genoma viral listo para ser procesado (24). Posteriormente el ARN es transcrito por la TI a ADN complementario, que luego se convierte en ADN de doble cadena y es transportado al núcleo por el complejo de pre-integración (22). En la **Figura 5** se resumen de forma esquemática, los eventos relacionados con el ciclo replicativo del VIH-1.

La integrasa viral forma parte del complejo de pre-integración y transporta al ADN viral desde el citoplasma hacia el núcleo de la célula hospedera, este ADN integrado es llamado ADN proviral y cuando la célula se activa, comienza la transcripción dando lugar a la progenie viral, para lo cual el ARN mensajero (25) sufre una elongación en el citoplasma. El proceso de transcripción y traducción se realiza utilizando la maquinaria celular, resultando en la síntesis de las proteínas estructurales (21). La transcripción del provirus por la ARN polimerasa II, celular, tiene como resultado un transcrito primario con dos funciones principales, por una parte, servir de precursor para la formación de los ARNm y por otra parte, actuar como ARN genómico que se incorpora a la cápside nuevamente ensambladas (26-29). El ADN proviral puede permanecer transcripcionalmente inactivo por meses o años, con poca o ninguna producción de nuevas proteínas virales o viriones y a esta forma de infección de una célula individual se le denomina latente (22).

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 *gag* y las enzimas codificadas por *pol*, participan en el ensamblaje de la partícula viral, que comienza con el empaquetamiento del ARN transcripto a partir del ADN proviral. Este complejo de nucleoproteínas emerge de la membrana plasmática expresando *env* y glicoproteínas del hospedero que forman parte de esta envoltura.(22). La proteína *tat* es necesaria para la expresión de los genes virales y actúa potenciando la producción de ARNm. La proteína *rev* por su parte inicia el cambio de expresión de genes tempranos a tardíos, promoviendo la exportación del ARN fuera del núcleo (22). El virus abandona la célula por un mecanismo de gemación y se efectúa la maduración de la partícula viral fuera de la célula (30).



**Figura 5.** Ciclo replicativo de VIH-1.

Fuente: Cellular and Molecular Immunology (8th edition, 2015)

### 3.7 Tropismo viral y uso de correceptores

La primera quimiocina fue descubierta en 1977 y desde entonces una larga superfamilia ha sido identificada. Las quimiocinas son pequeñas proteínas con numerosas funciones, que incluyen la inmunovigilancia y el reclutamiento de células inmunes. Se clasifican como C, CC, CXC y CX3C, dependiendo del número de residuos de cisteína presentes en la estructura. La adición de una R indica que estamos en presencia de un receptor. Los receptores de quimiocinas consisten en siete dominios transmembrana con un amino y un carboxilo terminal (31).

Durante la unión de la gp 120 con la célula TCD4<sup>+</sup> es necesario que ocurran una serie de modificaciones conformacionales, que dependen de la interacción adicional de la glicoproteína con alguno de los dos correceptores, CCR5 y CXCR4 (32). Ambos correceptores pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G, determinando el tropismo celular (32).

Los virus que utilizan preferencialmente CCR5 (cepas R5 o M-trópicas), son responsables de la infección primaria. El correceptor CCR5 es expresado principalmente en macrófagos una vez activados. De manera minoritaria se utilizan CCR2 y CCR3 (32).

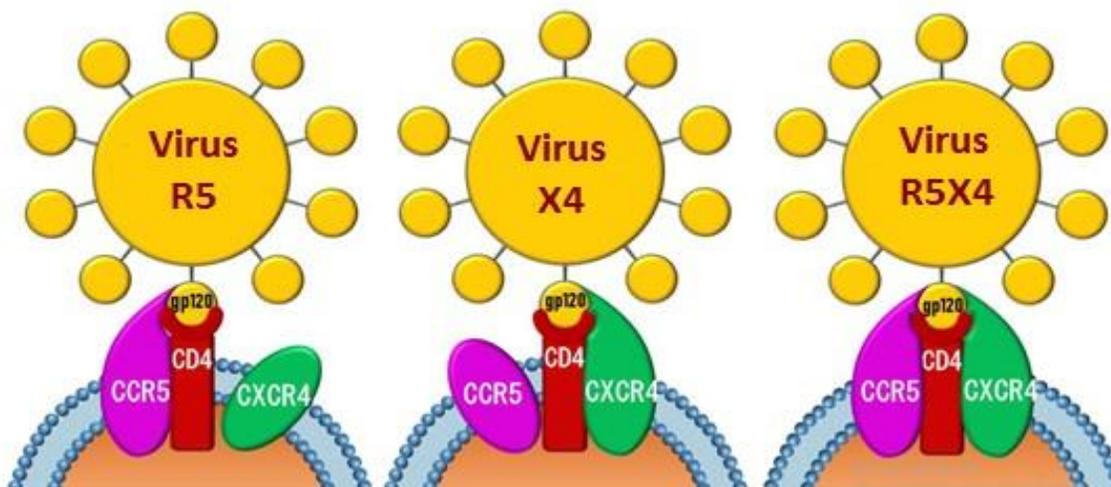
Los ligandos naturales de dicho correceptor incluyen MIP-1 $\alpha$  (del inglés macrophage inflammatory protein one alpha), MIP-1 $\beta$  (del inglés macrophage inflammatory protein one beta), RANTES (del inglés regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted) y MCP-2 (del inglés monocyte chemotactic protein two). Estos ligandos tienen un efecto supresor de la infección, ya que tienen la capacidad de impedir la fusión de membranas entre el virus y la célula diana (31).

Las cepas virales capaces de infectar líneas transformadas de células T y linfocitos CD4<sup>+</sup> primarios (T-trópicas o cepas X4), utilizan el coreceptor CXCR4. Es el receptor de la  $\alpha$ -quimiocina SDF-1 (del inglés stromal cell derived factor-1), que es un potente quimioatrayente de linfocitos T e imprescindible en la ontogenia de linfocitos B (31, 33). La emergencia de las variantes X4, ha estado asociada generalmente con una rápida pérdida de los CD4 y la progresión a sida (34). Muchas células T-trópicas pueden utilizar ambos correceptores, CCR5 y CXCR4 (cepas R5X4) (Figura 6).

Diferencias entre las cepas virales se reducen a cambios discretos en la secuencia del dominio V3 de la gp 120, asociados con la pérdida de sensibilidad a  $\beta$ - quimiocinas y el uso de correceptores

diferentes (33). De manera particular las cepas virales que utilizan CXCR4 o CCR5/CXCR4 están asociadas con una alta incidencia de desarrollo de sida (32).

En 1996 se identificó una mutación en el gen del receptor CCR5, deleción de 32 pares de bases (pb) en la región correspondiente al segundo dominio extracelular de la molécula. CCR5-Δ32 origina una alteración en el marco de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro que da lugar a una proteína truncada, por tanto no se expresa el correceptor en la superficie celular. Pacientes seropositivos heterocigóticos CCR5-Δ32, progresan más lentamente a sida, que los portadores homocigóticos. La mutación ejerce un efecto protector, por la reducción del número de moléculas CCR5 en la superficie celular (31, 33, 35, 36). Esta mutación se ve con más frecuencia en poblaciones europeas, lo que sugiere que este alelo puede conferir una ventaja evolutiva, como resultado de la presión selectiva originada por otras infecciones tales como la peste bubónica (*Yersinia pestis*) o la viruela (*Variola virus*) (35).



**Figura 6.** Variante del VIH-1 en función de su tropismo viral

Fuente: Fedora Grande y cols., 2019

### 3.8 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 (30).

La infección por VIH-1 podemos dividirla en tres etapas sucesivas: (1) primoinfección, (2) infección persistente asintomática, e (3) infección sintomática. La última se divide en dos: la fase precoz (complejo relacionado con el sida) y otra tardía (sida) (6).

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 (37). 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 (38).

La actividad vigorosa del sistema inmune proporciona una amplia demanda de  $CD4^+$  para soportar la replicación del VIH-1, aunque datos recientes en animales y humanos sugieren que la activación de células T no es un requerimiento absoluto para la infección (39). Cuando la viremia alcanza su más alto valor, el conteo de células  $CD4^+$  disminuye notablemente. Existen hipótesis acerca de un balance en la producción y destrucción de viriones, con el regreso parcial del conteo de células  $CD4^+$  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 (40).

En un término de semanas a meses (120 días en una cohorte), (41) el hospedero logra una vigorosa respuesta inmune, que parcialmente consigue controlar la replicación viral, estableciéndose entonces la etapa asintomática. De manera general este período tiene una duración de entre ocho a 10 años (42).

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  $CD4^+$  son a diario destruidas. 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  $CD4^+$  y por último, una profunda inmunosupresión con la aparición de las infecciones oportunistas y neoplasias que lo caracterizan (40).

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  $CD4^+$  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 (43).

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) (40).

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<sup>+</sup> 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 (44).

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, alimentación, hábitos tóxicos, etc. 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 (45).

### **3.9 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 (4). Está compuesto por cuatro grupos fundamentales; M (Major), O (Outlier), N (non M, non O) y más recientemente el grupo P (Plantier). Los virus pertenecientes al grupo M son los mayores responsables de la epidemia a nivel global y cuenta con nueve subtipos genéticos (A, B, C, D, F, G, H, J y K), más de 98 CRFs y numerosas URFs (5, 6).

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 y dos deben ser secuenciados completamente y otro parcialmente. La designación cpx (del inglés complex), es usada 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 (6).

### **3.10 Epidemiología**

A finales de 2017, 36,9 millones de personas vivían con VIH-1 en el mundo, de ellas 1,8 millones eran nuevas infecciones y 940 000 personas murieron por enfermedades relacionadas con el sida (46).

La gran mayoría de las personas están infectada por cepas que pertenecen al grupo M, los grupos O y N de VIH-1 representan menos de un 1 % de las infecciones en el mundo y se han detectado casi exclusivamente en África centro-occidental. El grupo O ha sido identificado en personas de Camerún y países vecinos, mientras que el N y el P solo se han encontrado en Camerún (47).

#### **3.10.1 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 ésta diversidad, la que se vislumbra en aumento con la diseminación de subtipos a nivel global (48).

La revisión sistemática y la vigilancia global de los subtipos desde 1990-2015, ha arrojado los siguientes resultados: subtipo C representó el 46,6 % de las personas que viven con VIH (16 280 897/34 921 639), de todas las infecciones por VIH-1 en el período 2010-2015, el subtipo B fue el responsable del 12,1 % de las infecciones (4 235 299/34 921 639), seguido del subtipo A 10,3 % (3 587 003/34 921 639), CRF02\_AG 7,7 % (2 705 110/34 921 639), CRF01\_AE 5,3 % (1 840 982/34 921 639), subtipo G 4,6 % (1 591 276/34 921 639) y el subtipo D 2,7 % (926 255/34 921 639). Los subtipos F, H, J y K combinados representaron el 0,9 % de las infecciones (311 332/34 921 639). Otras CRFs representaron el 3,7 % (1 309 082/34 921 639), elevando la proporción de todas las CRFs a 16,7 % (5 844 113/34 921 639). Las URFs constituyeron el 6,1 % (2 134 405/34 921 639), lo que dio como resultado que los recombinantes representaran el 22,8 % (7 978 517/34 921 639), de todas las infecciones de VIH a nivel global. La distribución de subtipos y recombinantes de VIH-1 cambian todo el tiempo a nivel de país, región y mundialmente. A nivel mundial durante el período 2005-2015 el subtipo B aumentó,

mientras que los subtipos A y D se mantuvieron estables, por otra parte los subtipos C y G y la CRF02\_AG disminuyeron. La CRF01\_AE, otras CRFs y URFs aumentaron lo que condujo a un incremento constante en la proporción global de recombinantes a lo largo del tiempo (49).

### **3.10.2 Epidemiología en Cuba**

Al cierre de 2018 habían 31 264 personas con VIH-1, de las cuales 21 946 (86 %) estaban recibiendo tratamiento antirretroviral. La transmisión sexual es el factor de riesgo más frecuente y a ella corresponde el 99 % de los casos descritos. El mayor número de casos son del sexo masculino con un 80,5 %, y los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) constituyen el 74,6 %. La mayor incidencia de casos se reportan en individuos con edades entre los 20 y 49 años, según datos del Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual VIH/sida del MINSAP (13). Cuba fue certificada en el 2015 como el primer país que eliminó la transmisión materno-infantil del VIH, por lo que esta vía, no constituye en estos momentos una causa de infección. La transmisión parenteral y la exposición ocupacional, constituyen otras causas de infección, con mucha menor incidencia (50).

Los diferentes estudios realizados de la epidemia cubana han identificado que el subtipo B representa aproximadamente el 30 % de la infección por VIH-1, seguido de CRF19\_cpx (24,1 %), CRF\_BG (20, 23, 24) (23,4 %) y CRF18\_cpx (12 %), también se detectaron recombinantes únicos, resultado de la circulación de los diferentes subtipos en el país (51, 52).

### **3.11 Tratamiento antirretroviral**

La terapia antirretroviral (TAR) ha cambiado la historia natural de la infección por el VIH. En la actualidad, existen más de 20 drogas ARV las cuales han sido aprobadas por la FDA y esta amplia disponibilidad de la terapia ha hecho que la lucha contra el VIH sea más conquistable. La TARVAE convencional incluye el uso de una combinación de 3 fármacos antirretrovirales, generalmente de 2 familias diferentes. Hasta hace poco tiempo sólo se disponía de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y no análogos de nucleósidos (ITIAN e ITINAN), inhibidores de la proteasa (IP) e inhibidores de la fusión. En los últimos años se han desarrollado también fármacos inhibidores de la integrasa (IIN) y antagonistas del correceptor CCR5 (53). No obstante, existen algunos obstáculos que pueden surgir antes o durante el tratamiento, uno de los más importantes es el desarrollo de resistencia viral a los medicamentos, la cual es causada

por mutaciones en la estructura genética del virus, provocando cambios en las enzimas blanco de la terapia, dejándolas inactivas (21).

Actualmente para el tratamiento de la infección por VIH se emplea una combinación de medicamentos, la cual suprime efectivamente la replicación, reduce los niveles de viremia, hasta el límite de detección en ensayos clínicos y sustancialmente reduce la morbilidad y la mortalidad en pacientes infectados con el virus (54). Sin embargo la terapia no es capaz de eliminar el virus y como consecuencia se requiere un uso de la misma por largo tiempo. Un importante mecanismo que permite que el virus persista en un individuo a pesar de la alta potencia de la terapia, es la latencia, mediante la cual el virus mantiene una población estable por largo tiempo (54).

### **3.11.1 Inhibidores de la entrada**

Desde la introducción de la terapia antirretroviral de alta eficacia (TARVAE), el VIH ha pasado de ser una enfermedad rápidamente mortal, a una enfermedad crónica y controlable. Sin embargo, los virus resistentes a los antirretrovirales no han tardado en aparecer y se ha notado aumento de estas cepas a nivel mundial (55).

La tendencia actual en el desarrollo de nuevos antirretrovirales es la innovación en el mecanismo de acción, con fármacos que inhiben los eventos previos a la integración del virus a la célula, lo que los hace activos contra virus resistentes a inhibidores de proteasa e inhibidores de la transcriptasa inversa. Estos fármacos han sido denominados colectivamente inhibidores de entrada, cuyas dianas fundamentales son la envoltura del VIH o las proteínas de membrana celular, ambas implicadas en la fusión del virus a la célula (56).

Los inhibidores de entrada bloquean la unión y la fusión del virus a la célula huésped mediante uno de tres mecanismos primarios: interacción con el receptor de CD4; interacción con los correceptores CCR5 o CXCR4, o inhibición de la fusión entre las membranas plasmáticas viral y celular. Los inhibidores de la molécula CD4 pueden ejercer su acción de dos maneras: al unirse con la gp 120, bloquean la unión con el CD4 y así, el cambio en la conformación que induce el CD4 sobre la proteína Env; al unirse directamente con el CD4, bloquean los cambios en la conformación necesarios en la envoltura. Los antagonistas de los correceptores se unen a CCR5 e impiden su interacción con la proteína Env. Los inhibidores de la fusión se unen directamente a

la gp 41 e interfieren con la formación del haz de seis hélices, necesario para la fusión del virus con la célula huésped (57).

### **3.11.2 Antagonistas de CCR5**

En junio de 2007 fue aprobado por la FDA, el Maraviroc, que es la primera droga de las llamadas inhibidoras de la entrada (35, 58). Este ARV bloquea la interacción entre VIH-1 y CCR5 impidiendo la entrada y la infección de las células por parte de las cepas con tropismo R5. Actualmente el Maraviroc es el único inhibidor de CCR5 que ha sido aprobado para su uso clínico, puede ser utilizado tanto en pacientes no tratados, como en pacientes multirresistentes. En la actualidad se han desarrollado otros antagonistas de CCR5, como es el caso del Cencriviroc que al parecer bloquea al receptor CCR2 (35), Aplaviroc y Vicriviroc. El tratamiento con Maraviroc se ha considerado efectivo, pero solo en los pacientes que presentan virus con tropismo R5, ya que se ha observado que es incapaz de inhibir la infección cuando los virus utilizan otro correceptor (35). La aprobación de estos antirretrovirales, ha generado la necesidad de disponer de ensayos para la determinación del tropismo viral en aquellos pacientes candidatos a iniciar un tratamiento con este fármaco, ya que la detección de variantes con tropismo X4, se ha asociado con el fracaso al tratamiento (59).

### **3.12 Resistencia a los antirretrovirales**

La rápida fijación de mutaciones de escape en respuesta al tratamiento, con una incompleta terapia de supresión o una terapia con una baja barrera genética de resistencia, son los ejemplos clásicos de selección natural (60). 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 (61).

La potencia de los ARV puede verse seriamente comprometida con la presencia de resistencia. La terapia está diseñada para que se utilice una combinación de ARV de diferentes clases, en el caso de los no análogos, es posible la resistencia cruzada, por lo que una mutación puede conferir resistencia a una droga o al resto de los medicamentos de la clase (62).

El acceso limitado a los ARV en algunas partes del mundo, los niveles subóptimos 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 VIH (63, 64).

### **3.12.1 Resistencia a los antagonistas de los correceptores**

La resistencia a MVC ha sido reportada previamente (65, 66) y se debe a tres mecanismos. El primer mecanismo está relacionado con la selección de variantes minoritarias preexistentes que utilizan el correceptor CXCR4 para entrar en la célula diana (67). El segundo involucra la selección de mutantes que pueden usar el correceptor CCR5 a pesar de la presencia del inhibidor (65) y el tercero está relacionado con la selección de mutaciones que se encuentran primariamente en el lazo V3 de la gp 120, las cuales inducen el cambio del correceptor CCR5 a CXCR4. Este último mecanismo ha sido demostrado *in vitro* (68); pero es raro en pacientes tratados con MVC (69).

### **3.13 Determinación del uso del correceptor**

A pesar de la relación establecida entre el uso del correceptor y la progresión de la enfermedad en pacientes VIH-1, la determinación del tropismo viral no se ha utilizado como un parámetro habitual de seguimiento clínico de los pacientes con infección por VIH. Sin embargo, la introducción de los antagonistas de CCR5 dentro de la terapia antirretroviral, y su limitada actividad antiviral para variantes R5-trópicas, requiere del conocimiento previo del uso del correceptor en cada paciente, antes de la prescripción clínica de dichos fármacos. Existen diversos métodos fenotípicos y genotípicos para determinar el tropismo del VIH-1 (53).

#### **3.13.1 Métodos fenotípicos**

Los ensayos utilizados para la determinación del tropismo han sido fundamentalmente fenotípicos y están basados principalmente en la tecnología de los virus recombinantes, que se utilizan para infectar líneas celulares que expresan CCR5 o CXCR4.(70, 71), (ESTA-Trofile, Tropitest, Toulouse Tropism Test), en la combinación de métodos genotípicos y fenotípicos (Virco type HIV-1, PhenoX-R, HIV-1 Phenoscript Env, etc), y finalmente en el cocultivo a partir de las CMSP del paciente, con distintas líneas celulares, como U87, que pueden expresar células TCD4<sup>+</sup> o un correceptor de quimiocina o las clásicas MT2 para determinar el efecto citopático viral. Estos ensayos constituyen todavía el método de referencia para caracterizar el tropismo viral por su gran sensibilidad para detectar las variantes minoritarias CXCR4 y/o CCR5 en los

subtipos B y no-B del VIH-1 y además representan el único método para medir la resistencia a los antagonistas de CCR5. Sin embargo, estos ensayos presentan, además de un precio elevado, complicaciones técnicas y en especial logísticas que dificultan su utilización en la práctica clínica (35, 59).

### **3.13.2 Métodos genotípicos**

Los métodos genotípicos representan una alternativa más factible que los fenotípicos, ya que son más rápidos, baratos y al alcance de los laboratorios de diagnóstico de VIH, que cuenten con el equipamiento necesario para desarrollar técnicas de biología molecular. Están basados en la secuencia del lazo V3 de la gp 120, ya que la misma determina en gran medida el uso preferencial de CCR5 y/o CXCR4. Vale la pena destacar que otras regiones de la envoltura como V1/V2 y C4 también parecen estar implicadas en este proceso (59). Desde los años 90, se han desarrollado varias reglas y algoritmos para la predicción del uso del correceptor de las variantes de VIH, que se fundamentan en las características de las secuencias de aminoácidos de dicha región. Entre ellas se encuentran la regla 11/25, la carga neta y la combinación de ambas reglas que clasifica una variante como X4 siempre y cuando una de ellas lo haga (59, 71).

La regla 11/25 fue uno de los primeros algoritmos desarrollados para la interpretación del tropismo viral y ha permanecido como uno de los más populares hasta la actualidad. Está fundamentada en el hecho de que estos virus presentan aminoácidos básicos como arginina (R) o lisina (K) en las posiciones 11 y/o 25 y frecuentemente están asociados con el fenotipo X4. Por el contrario la ausencia de R o K en estas posiciones está asociada con los virus con tropismo R5. Con el objetivo de mejorar la predicción del fenotipo viral, se le ha realizado una modificación a la regla 11/25, la cual ha sido denominada regla 11/24/25. En dicha regla se consideran virus con fenotipo X4 a las variantes que tengan algún aminoácido básico en las posiciones 11, 24 o 25, los virus que no cumplan esta condición son clasificados como virus con tropismo R5 (59, 71).

La carga neta es un algoritmo de simple interpretación por el cual se hace una estimación de la carga neta global de la región V3, teniendo en cuenta la siguiente fórmula  $(K+R) - (\text{ácido aspártico (D)} + \text{ácido glutámico (E)})$ . Si el resultado es  $\geq 5$ , el virus es clasificado como X4, de lo contrario se considera R5. Tanto la regla 11/25 como la carga neta presentan una baja sensibilidad para detectar los virus X4 (71).

En los últimos años se han identificado residuos y patrones de aminoácidos dentro del dominio V3 que están involucrados en la determinación del tropismo viral. Esto ha permitido el desarrollo de diferentes bases de datos con información genofenotípica de los aislamientos virales. A partir de estas bases y a través de la utilización de diferentes métodos estadísticos, se han diseñado algoritmos bioinformáticos que permiten predecir el uso del correceptor. La mayoría se encuentran disponibles en sitios web de libre acceso, como, Wetcat, Web position specific scoring matrices (PSSM), Fortinbras PSSM y Geno2pheno (71).

El algoritmo geno2pheno, fue desarrollado por la Universidad de Colonia y el Instituto Max-Planck de Alemania. Para hacer las predicciones emplea un método estadístico denominado support vector machine (SVM) y pueden ser tanto a partir de la secuencia FASTA de nucleótidos como de los aminoácidos de la región V3. La base de datos en la que basa sus predicciones está compuesta por más de 1000 secuencias de V3, la mayoría de ellas del subtipo B. Esta herramienta permite seleccionar el grado de sensibilidad, para detectar variantes X4, seleccionando el porcentaje de FPR (del inglés false positive rate) en cada predicción. Debe tenerse presente que un aumento en la sensibilidad en la detección de variantes con tropismo X4 siempre supone una pérdida en la especificidad (53).

## **IV MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Diseño del estudio y universo.**

Se realizó un estudio analítico de corte transversal para determinar la relación de las variantes de VIH-1 que circulan en Cuba, con el uso del correceptor y con la resistencia al Maraviroc. Para ello se secuenciaron fragmentos de los genes *pol* y *env* de VIH-1 provenientes de muestras de pacientes tratados y no tratados recibidas en el laboratorio de Infecciones de Trasmisión Sexual (ITS), del Departamento de Virología, del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) y en el Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC). Las muestras fueron tomadas en el período de septiembre del 2017 a junio del 2019.

#### **4.1.1 Universo de estudio**

El universo de estudio estuvo constituido por 96 muestras de plasma de pacientes seropositivos al VIH-1, 46 no tratados, recibidos en el CICDC o IPK, para estudio de resistencia transmitida y 50 tratados a los que se les solicitó, por parte del médico de asistencia, la prueba genotípica para determinar el tropismo de VIH (IPK).

Los pacientes cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: la aceptación para formar parte de la investigación a partir de la firma del consentimiento informado (Anexo 1) y que no hubiesen recibido tratamiento previo con Maraviroc.

#### **4.2 Obtención de la información**

La información clínica, inmunológica y virológica de los pacientes en estudio se obtuvo de una encuesta o modelo de recogida de información que se realizó a cada uno de ellos en el momento de toma de la muestra (Anexo I) y de la base de datos SIDATRAT (Base de datos de individuos seropositivos al VIH). Las variables que se emplearon para el análisis de los resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Operacionalización de las variables epidemiológicas, clínicas y virológicas que se analizaron.**

<b>Variables</b>	<b>Tipo</b>	<b>Escala</b>	<b>Descripción</b>
<b>Sexo</b>	Cualitativa nominal dicotómica	F M	Según sexo biológico.
<b>Edad</b>	Cuantitativa discreta	15-30 31-45 46-60 >60	Se tuvo en cuenta la edad cumplida en años al momento de la toma de muestra.
<b>Orientación sexual</b>	Cualitativa nominal	HSH HT	Disposición o conducta de mantener relaciones sexuales con personas de su propio sexo y/o del sexo opuesto.
<b>Región de residencia</b>	Cualitativa nominal	La Habana Región Occidental Región Central Región Oriental	Lugar de residencia, según encuesta epidemiológica realizada a los pacientes.
<b>Años de diagnóstico</b>	Cuantitativa discreta	< 1 año > 1 -3 años > 3-5 años > 5-10 años > 10 años	Se calculó a partir de la fecha de diagnóstico y la fecha de toma de muestra.
<b>Carga viral de VIH-1</b>	Cuantitativa discreta	<1000 1000-10 000 >10 000-100 000 > 100 000	Cantidad de partículas virales por mililitros de sangre (copias/mm <sup>3</sup> ) al diagnóstico de VIH y al momento de la toma de la muestra.
<b>Conteo de células T CD4<sup>+</sup>.</b>	Cuantitativa discreta	<200 >200-500 >500	Conteo de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (células/mm <sup>3</sup> ) al diagnóstico de VIH y al momento de la toma de muestra.
<b>Predicción del Fenotipo viral</b>	Cualitativa ordinal	R5 R5X4 X4	Habilidad del virus para unirse a los correceptores celulares CCR5 y/o CXCR4, determinada mediante la herramienta bioinformática G2P, carga neta, regla 11/25.
<b>Subtipo de VIH-1</b>	Cualitativa ordinal	A, B, C, D, F, G, H, URFs, CRFs (CRF18_cpx, CRF19_cpx, CRFs_BG 20, 23, 24)	Subtipo viral de VIH-1 con el cual se encuentra infectado el paciente estudiado, analizando dos genes virales: genes pol, env.
<b>Mutaciones en la región V3 de gp 120 del VIH-1</b>	Cualitativa nominal	Sí tiene No tiene	Presencia de mutaciones que confieren resistencia a Maraviroc y/o cambio de tropismo (posiciones 11 y 25), carga neta y mutaciones específicas de cada subtipo viral.
<b>Mutaciones en la región V2 de gp 120 del VIH-1</b>	Cualitativa nominal	Sí tiene No tiene	Presencia de mutaciones que confieren resistencia a Maraviroc y/o cambio de tropismo, carga neta y mutaciones específicas de cada subtipo viral.
<b>SIDA al diagnóstico de VIH-1</b>	Cualitativa nominal	Sí tiene No tiene	sida al momento del diagnóstico de la infección por VIH.
<b>SIDA actual</b>	Cualitativa nominal	Sí tiene No tiene	sida al momento de la toma de la muestra.
<b>Progresión a sida</b>	Cuantitativa continua	≤ 1 año 1-3 años >3 años No sida	Tiempo transcurrido entre la fecha de infección y el comienzo de la fase sida.

### **4.3 Aspectos éticos.**

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** y ha sido aprobado por el Comité de Revisión de Ética Médica del IPK (CEI-IPK 02-18).

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

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

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

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

### **4.4 Procesamiento de las muestras**

#### **4.4.1 Obtención y procesamiento de las muestras clínicas**

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

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo teniendo en cuenta las buenas prácticas de laboratorio y las medidas de bioseguridad. Las muestras clínicas se procesaron en gabinetes de seguridad clase II.

#### **4.4.2 Extracción del ARN viral.**

Se tomó 1mL de plasma por cada paciente y se centrifugó a 14 000 rpm durante una hora a 4°C. El sobrenadante se descartó dejando sólo 140 µL, con el que se disolvió el sedimento mediante agitación intensa (vórtex) por 15 segundos. Una vez disuelto se emplearon los 140 µL para la extracción del ARN viral, siguiendo el protocolo estándar para extracción de ARN descrito por el fabricante, utilizando el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit, de manera manual. El ARN extraído se conservó a -80°C hasta su utilización en los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, polimerase chain reaction). Como control positivo de los PCR se emplearon muestras de plasma de pacientes positivos a VIH-1 que previamente habían resultado positivas y se encuentran conservadas en el laboratorio de ITS, con CV entre 1000 y 10 000 copias/mL. Los controles negativos utilizados estaban constituidos por agua en vez de ADN.

#### **4.4.3 Síntesis y amplificación del ADN complementario (ADNc)**

##### **4.4.3.1 Amplificación del gen env**

##### **4.4.3.1.1 Reverso transcripción (RT) y amplificación (RT-PCR) del gen env (gp 160)**

La síntesis y amplificación del fragmento de ADNc de 3876 pb del gen *env*, se realizó utilizando el estuche comercial Super Script<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq High Fidelity (Invitrogen<sup>TM</sup>, EU) bajo las siguientes condiciones:

- 25 µL de Buffer 2X Reaction Mix, ([0,4mM de cada desoxi-ribonucleótidos trifosfatados (dNTP) y 2,4mM de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>)])
- 0,5 µL de cada cebador: KVL008 y KVL009 a 20 µM cada uno (**Tabla 2**)
- 10.5 µL de MgSO<sub>4</sub> a 5 mM
- 1µL de enzima Super Script<sup>TM</sup> III RT/Platinum<sup>®</sup> Taq High Fidelity
- 0.25 µL de Protector de RNasa a 40U/µL (Roche, Alemania)
- 11,7 µL de H<sub>2</sub>O para un volumen final de 40 µL

**Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de RT-PCR**

Nombre	Secuencia	Descripción
<b>KVL008</b>	5'-GGTCAKGGRTCTCCATAGAATGGA-3'	Cebador positivo para la amplificación de la región <i>gp 160</i> .
<b>KVL009</b>	5'-GCCAATCAGGGAAGWAGCCTTGTGT-3'	Cebador negativo para la amplificación de la región <i>gp 160</i> .

Finalmente a esta mezcla se le agregaron 10 µL del ARN extraído, para quedar 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 3.

**Tabla 3. Condiciones de la RT-PCR del gen *env***

Descripción	Temperatura	Tiempo
<b>Transcripción reversa</b>	55°C	30 minutos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	2 minutos
<b>40 ciclos de</b>		
<b>Desnaturalización</b>	94°C	15 segundos
<b>Hibridación de los cebadores</b>	52°C	30 segundos
<b>Extensión</b>	68°C	4 minutos
<b>Fin de los ciclos</b>		
<b>Elongación final</b>	68°C	5 minutos
<b>Almacenamiento</b>	4°C	12 horas

**4.4.3.1.2 PCR anidada de la gp 120**

La amplificación de los 2346 pb del gen que codifica para la proteína gp 120 del VIH-1 se realizó utilizando el estuche comercial *Expand High Fidelity (HF) PCR System* (Roche, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Mezcla 1**

- 0,4 µL *dNTPs* 25 mM
- 1 µL de cada cebador. AV317 y AV323 a 20 µM cada uno (Tabla 4)
- 17,6 µL de agua para completar un volumen final de 20 µL

**Tabla 4. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada**

Nombre	Secuencia	Descripción
<b>AV317</b>	5'-TCAAGCAGGACATAAYAAGGTAGG-3'	Cebador positivo para la amplificación de la región <i>gp 120</i> .
<b>AV323</b>	5'-CTGCTCCYAAGAACCCAA-3'	Cebador negativo para la amplificación de la región <i>gp 120</i> .

A esta mezcla se le adicionaron 5 µL del producto de amplificación del gen *env* obtenido durante la reacción de RT-PCR. Luego se le deben agregar 25 µL de la siguiente mezcla:

**Mezcla 2**

- 5 µL Expand HF Buffer 10X (Roche, Alemania)
- 4 µL de cloruro de magnesio(MgCl<sub>2</sub>) a 25 mM
- 0,75 µL de la enzima Expand HF a 3,5 U/ µL (Roche, Alemania)
- 15,25 µL de agua hasta completar un volumen final de 25 µL.

El volumen final de reacción fue de 50 µL. Las condiciones de ciclaje para la PCR anidada se describen en la Tabla 5. Este protocolo, incluyendo la RT-PCR (*gp 160*) y la PCR anidada (*gp 120*), fue descrito por Van Leathem y cols., en el año 2005.

**Tabla 5. Condiciones de la PCR anidada de la *gp 120***

Descripción	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	2 minutos
<b>10 ciclos de:</b>		
<b>Desnaturalización</b>	94°C	15 segundos
<b>Hibridación de los cebadores</b>	55°C	30 segundos
<b>Extensión</b>	68°C	3 minutos
<b>40 ciclos de:</b>		
<b>Desnaturalización</b>	94°C	15 segundos
<b>Hibridación de los cebadores</b>	55°C	30 segundos
<b>Extensión</b>	68°C	3 minutos*
<b>Fin de los ciclos</b>		
<b>Extensión final</b>	72°C	10 minutos
<b>Almacenamiento</b>	4°C	12 horas

\* Incremento de 5s en cada etapa de extensión.

#### 4.4.3.2 Amplificación del gen *pol*

##### 4.4.3.2.1 RT-PCR del gen *pol*

La síntesis del ADNc y la amplificación de un fragmento de 2060 pb del gen *pol*, se realizó utilizando el estuche comercial Super Script™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen™, EU) bajo las siguientes condiciones:

- 25 µL de Buffer 2X Reaction Mix, (0,4mM de cada dNTP y 2,4 mM de MgSO<sub>4</sub>).
- 0,5 de cada cebador. AV159 y AV192 a 20 µM cada uno (Tabla 6).
- 8 µL de MgSO<sub>4</sub> a 5 mM.
- 1 µL de enzima Super Script™ III RT/Platinum® Taq High Fidelity.
- 0,25 de Protector de RNasa a 40 U/µL (Roche, Alemania).
- 4,75 µL de agua para completar un volumen de 40 µL

**Tabla 6. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de RT-PCR**

Nombre	Secuencia	Descripción
AV159	5'-GGGGTTAAATAAAATAGTAAG-3'	Cebador positivo para la amplificación
AV192	5'-AATTGTTTTACATCATTAGTGTG-3'	Cebador negativo para la amplificación

Finalmente a esta mezcla se le agregaron 10 µL del ARN extraído obteniendo 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 7.

**Tabla 7. Condiciones en que se desarrolló la síntesis del ADN complementario y amplificación.**

Descripción	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	55°C	30 minutos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos
<b>40 ciclos de</b>		
Desnaturalización	94°C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	61°C	30 segundos
Extensión	68°C	2 minutos
<b>Fin de los ciclos</b>		
Elongación final	68°C	5 minutos
Almacenamiento	4°C	12 horas

#### 4.4.3.2.2 PCR anidada de la región *pol*

Para la PCR anidada se utilizó el estuche comercial Expand High Fidelity PCR System (Roche, Alemania) obteniéndose un fragmento interno de 1745 pb. Este sistema tiene un componente con actividad exonucleasa 3'-5', por tanto fue necesario preparar la mezcla de PCR en dos viales separados para prevenir la degradación de los cebadores.

##### Mezcla 1

- 1 µL de dNTPs a 10 mM
- 1,25 µL de cada cebador. Av190 y Av191 a 20 µM cada uno, (Tabla 8)
- 19,5 µL de H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen final de 23 µL

**Tabla 8. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada**

Nombre	Secuencia	Descripción
<b>AV190</b>	5'-GCTACACTAGAAGAAATGATGAC-3'	Cebador positivo para la amplificación.
<b>AV191</b>	5'-CTTGATAAATTTGATATGTCCATTG-3'	Cebador negativo para la amplificación.

A esta mezcla se le adicionaron 2 µL del producto de amplificación del gen *pol* obtenido durante la reacción de RT-PCR. Luego se le deben agregar 25 µL de la siguiente mezcla:

##### Mezcla 2

- 5 µL de 10X Expand Buffer.
- 6 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM.
- 0,75 µL de Expand HF Enzyme a 3,5 U/µL (Roche, Alemania).
- 13,25 µL de H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen final de 25 µL

Se obtuvo un volumen final de reacción de 50 µL, la cual fue sometida al siguiente ciclaje (Tabla 9).

**Tabla 9. Condiciones en que se desarrolló la PCR anidada del gen *pol*.**

Descripción	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos
<b>30 ciclos de</b>		
Desnaturalización	94°C	15 segundos
Hibridación de los cebadores	59°C	30 segundos
Extensión	68°C	3 minutos
<b>Fin de los ciclos</b>		
Elongación final	72°C	5 minutos
Almacenamiento	4°C	12 horas

#### 4.4.4 Análisis de los productos de la PCR anidada de los genes *pol* y *env*

Para analizar los productos obtenidos en las PCR anidadas de las dos regiones se tomaron 5 µL de los mismos más 2 µL del indicador de corrida *Gel Pilot Loading Dye*, 5 X, (QIAGEN, Alemania) y se aplicaron en un gel de agarosa al 1 % teñido con *Gel Red<sup>TM</sup> Nucleic acid*, 10,000 x (BIOTIUM, EU). Este gel se sometió a una electroforesis horizontal utilizando como tampón de corrida TBE 1X (0,4 M de Tris; 0,5 M de ácido bórico y 0,01 M de ácido etilendiaminotetracético (EDTA)). La corrida se realizó a 120 V durante 30 min. Las bandas de ADN amplificadas se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta (Analytikjena, Alemania). La talla correcta de la amplificación se determinó mediante la comparación con el patrón de migración del marcador de peso molecular 1kb *Gel Pilot Ladder* (QIAGEN, Alemania). Además se utilizaron controles negativos (C-) constituidos por agua en vez de ADN. Estos fueron incluidos en cada ensayo desde el paso de extracción del ARN con el objetivo de descartar posibles inhibiciones o contaminaciones en la PCR.

#### 4.4.5 Purificación y secuenciación de los productos de la PCR anidada.

Los productos amplificados de las regiones *env* y *pol* se purificaron utilizando el estuche comercial *QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit* (QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes.

##### 4.4.5.1 Secuenciación de la región V2C2V3C3 de la gp 120

Para obtener el fragmento de 675 pares de bases del gen *env* que codifica para la proteína gp 120 y que incluyó las regiones V2 (aa 158 a 196, 114 nt), C2 (aa 197 a 296, 297nt), V3 (aa 296 a 331, 105 nt) y C3 (aa 332 a 385, 159 nt) se emplearon cuatro reacciones de secuencia por cada

producto purificado de la PCR anidada. Para la reacción de secuenciación se prepararon mezclas constituidas por:

- 1µL de cada uno de los cebadores de secuencia AV304, AV306, AV307 y AV309 (Tabla 10)
- 8µL de la mezcla de reacción de secuencia del estuche DTCS Quick Star Master Mix (Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (BeckmanCoulter, USA)
- 6µL de H<sub>2</sub>O, de Beckman Coulter, USA.
- 5µL de ADN purificado

**Tabla 10. Secuencia de los cebadores empleados en la secuenciación del gen *env*.**

Nombre	Secuencia	Descripción
AV304	5'-ACATGTGGAAAAATGACATGGT-3'	Cebador positivo para la secuenciación de la región gp 120.
AV306	5'-TGTCAGCACAGTACAATGTACACA-3'	Cebador positivo para la secuenciación de la región gp 120.
AV307	5'-TCTTCTTCTGCTAGACTGCCAT-3'	Cebador negativo para la secuenciación de la región <i>gp 120</i> .
AV309	5'-CARTAGAAAAATTCYCCTCYACA-3'	Cebador negativo para la secuenciación de la región <i>gp 120</i> .

Se obtuvo un volumen final de reacción de 20 µL. Los cebadores y protocolos de la región de la envoltura fueron reportados por Van Leathem y colaboradores en el 2005 (72). La reacción de secuenciación se llevó a cabo en las siguientes condiciones. (Tabla 11).

**Tabla 11. Condiciones en las que se desarrolló la reacción de secuencia para el gen *env*.**

Descripción	Temperatura	Tiempo
<b>40 ciclos de</b>		
<b>Desnaturalización</b>	96°C	30 segundos
<b>Hibridación de los cebadores</b>	50°C	20segundos
<b>Extensión</b>	60°C	4 minutos
<b>Fin de los ciclos</b>		
<b>Almacenamiento</b>	4°C	12 horas

#### 4.4.5.2 Secuenciación del gen *pol*

Para realizar la secuenciación nucleotídica del fragmento de 1302 pb del gen *pol*, que abarca 297 nucleótidos (99 aminoácidos) de proteasa y 1005 nucleótidos (335 aminoácidos) de la transcriptasa inversa de VIH-1, se realizaron siete 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 Alemán y cols. en el año 2015 (73). Para la reacción de secuenciación se prepararon mezclas constituidas por:

- 1µL de cada uno de los cebadores de secuencia KVL162, KVL163, KVL164, KVL165, KVL176, KVL177 y KVL178. (Tabla 12)
- 8µL de la mezcla de reacción de secuencia del estuche DTCS Quick Star Master Mix(Dye Terminador Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (BeckmanCoulter, USA)
- 6µL de H<sub>2</sub>O, de Beckman Coulter, USA.
- 5µL de ADN purificado

**Tabla 12. Secuencias de los cebadores empleados en la reacción de secuenciación del gen pol.**

Nombre	Secuencia	Descripción
<b>AV162</b>	5´-TTCCCTCARATCACTCTTTGGCA -3´	Cebador positivo para la secuenciación
<b>AV163</b>	5´-CACAGGGATGGAAAGGRTCACC-3´	Cebador positivo para la secuenciación
<b>AV164</b>	5´-ACCAGTAAAAYTRAARCCAGGAATG-3´	Cebador positivo para la secuenciación
<b>AV165</b>	5´-GTRTTRTATGGATTTTCAGGCCCAA-3´	Cebador negativo para la secuenciación
<b>AV176</b>	5´-TTGYTCTATGYTGCCCTATTTCTA-3´	Cebador negativo para la secuenciación
<b>AV177</b>	5´-AARGAMAGCTGGACTGTCAATGA-3´	Cebador positivo para la secuenciación
<b>AV178</b>	5´-CTATTAAGTCTTTTGATGGGTCATA-3´	Cebador negativo para la secuenciación

Se obtuvo un volumen final de reacción de 20 µL. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en las siguientes condiciones (Tabla 13).

**Tabla 13. Condiciones en las que se desarrolló la reacción de secuencia para el gen de la polimerasa.**

Descripción	Temperatura	Tiempo
<b>50 ciclos de</b>		
<b>Desnaturalización</b>	96°C	30 s
<b>Hibridación de los cebadores</b>	50°C	20s
<b>Extensión</b>	60°C	4 min
<b>Fin de los ciclos</b>		
<b>Almacenamiento</b>	4°C	12 horas

#### 4.4.6 Edición de las secuencias.

Las secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos de VIH secuenciados se ensamblaron y editaron utilizando el programa Sequencher™ Version 4.10 (Genes Codes Corporation, USA), usando como referencia la secuencia nucleotídica de la cepa de VIH-1 B.FR.83.HXB2\_LAI\_IIIB\_BRU.K03455. Al final se obtuvieron secuencias consensos de las regiones secuenciadas (gen *pol*, gen *env*) de VIH-1 de cada paciente analizado.

#### 4.4.7 Identificación de los subtipos virales

Las herramientas para determinación de subtipos de VIH: COMET versión 2 (disponible en (<https://comet.lih.lu>) y REGA subtyping tool versión 3 (disponible en <https://rega.kuleuven.be/cev/avd/software>), se utilizaron para realizar la clasificación inicial del subtipo a partir de las secuencias editadas, para cada región del virus.

#### 4.4.8 Análisis filogenético.

Dado que la epidemia cubana se caracteriza por un alto número de CRF y URFs, todas las asignaciones se confirmaron con análisis filogenético de las secuencias obtenidas para cada gen analizado. Las secuencias de los genes *pol* y *env* fueron examinadas utilizando la herramienta bioinformática automatizada NGPhylogeny (<https://ngphylogeny.fr>) que posibilita obtener árboles filogenéticos a partir de las secuencias editadas en formato fasta (74).

Se empleó el flujo de trabajo de la opción de un solo paso (PhyML/One Click). Se introdujeron las secuencias en formato fasta y se realizó el alineamiento con el programa de alineamiento de secuencias múltiples (MAFFT versión 7) (75). Las secuencias alineadas fueron corregidas automáticamente con el fin de seleccionar las regiones informativas para el análisis filogenético, utilizando el programa BMGE (del inglés, Block Mapping and Gathering with Entropy) (76). Se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica de tiempo reversible general (GTR, siglas del inglés, General Time Reversible) y se generaron árboles filogenéticos utilizando el método de máxima verosimilitud PhyML versión 3.0 (77). Los árboles consensos, inferidos a partir de 1000 réplicas, se utilizaron para representar la historia evolutiva de las secuencias analizadas. El programa ITOL posibilitó visualizar los árboles filogenéticos en formato Newick. Se utilizaron secuencias de referencias de los subtipos incluidos en el análisis, que fueron comparadas con las obtenidas en este estudio.

Las secuencias inicialmente clasificadas como CRF20\_BG, CRF23\_BG o CRF24\_BG fueron nombradas CRF\_BG, debido a los puntos de recombinación similares en la región *pol* y la falta de puntos de recombinación en la región *env* (<http://www.hiv.lanl.gov>).

#### **4.4.8.1 Predicción del fenotipo viral y mutaciones que confieren resistencia a Maraviroc.**

El tropismo viral se predijo utilizando la herramienta genotípica G2P versión 2.5 [coreceptor] (<http://coreceptor.geno2pheno.org/>). Sobre la base de las directrices alemanas, los tropismos se dividieron en tres grupos de acuerdo con la probabilidad de identificar incorrectamente un virus R5 como X4. Un FPR,  $\leq 5\%$  son principalmente X4 y  $\geq 20\%$  son principalmente las variantes R5. Por lo tanto, clasificamos las secuencias del lazo V3 con FPR  $\geq 20\%$  como virus R5, con FPR  $> 5\%$  y  $< 20\%$  como virus con tropismo dual (R5X4) y con FPR  $\leq 5\%$  como virus X4 como se describió anteriormente.

Las mutaciones que confieren cambio en el tropismo viral se analizaron manualmente. La carga neta del lazo V3 se calculó restando residuos de carga negativa D y E de los cargados positivamente R y K en el lazo V3. Una carga neta positiva del lazo V3  $\geq 5$  fue considerada como predictiva de tropismo X4, mientras que una carga positiva por debajo de 5 fue predictiva de tropismo R5. Por otra parte, también se realizó el análisis de acuerdo con la regla 11/25, donde se considera que la presencia de aminoácidos cargados positivamente (R o K) en las posiciones 11 o 25 del lazo V3 es predictiva de tropismo X4.

Se identificaron manualmente las mutaciones asociadas a resistencia a MVC en el lazo V3, según lo publicado en la literatura, ya que no existe ningún algoritmo establecido para la detección de estas mutaciones de manera automática. Las mutaciones más comunes que se han reportado en esta región son: sustituciones de glicina (G) por (R) en la posición 11 (G11R), prolina (P) por R en posición 13 (P13R) y alanina (A) por K en la posición 25 (A25K) (31). Otros estudios *in vitro* han demostrado que las mutaciones en el bucle V3 de gp 120 por lo general no confieren resistencia completa a MVC (78), sino que se necesita la cooperación de varias mutaciones. Además de las mutaciones descritas anteriormente se han descrito las sustituciones de A por treonina (T) en la posición 316 (A316T), isoleucina (I) por valina (V) en la posición 323 (I323V) y A por serina (S) en la posición 319 (A319S) por secuenciación genética de aislamientos primarios de subtipos B y G de VIH-1. También se han descrito deleciones de isoleucina y serina en la posición 315 y posición 317, respectivamente (78).

También se hizo el análisis para el lazo V2, siendo la primera vez que se estudian las mutaciones de resistencia asociadas con esta región de gp 120. Las mutaciones más reportadas para esta región son sustituciones de V por metionina (M) en la posición 169 (V169M) y Aspargina (N) por K en la posición 192 (N192K) (79).

Se identificaron además los sitios de glicosilación N para ambas regiones de gp 120 (V2 y V3) y su posible relación con el tropismo y el subtipo viral (80).

#### **4.4.9 Análisis estadístico.**

Se confeccionó una base de datos en Excel. La media, la desviación estándar (SD), la mediana, el rango inter-cuartil (RIC), y las frecuencias (%) se utilizaron para describir las características de los pacientes. Las pruebas de  $\chi^2$  y Fisher se utilizaron para comparar variables categóricas y continuas. Se estimaron las Razones de Desigualdad (OR, del inglés odd ratio) y su intervalo de confianza (IC) del 95 %. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión de software estadístico SPSS 18 (SPSS Inc., Chicago, IL). Para realizar las comparaciones entre variables cuantitativas se utilizaron las pruebas de Anova con post ensayo de Dunnett y Mann Withney (Programa Graphpad Prism 5, San Diego California USA).

## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Características generales de los pacientes estudiados

En el presente estudio fueron incluidas un total de 96 muestras de pacientes seropositivos al VIH-1, correspondientes a los años 2017-2019. Se logró obtener secuencias de la región *env* de la gp 120 en 69 de ellas (71,88 %). Las muestras examinadas pertenecían tanto a pacientes tratados (33) como no tratados (36), por lo que esta condición se relacionó con el resto de las variables analizadas (**Tabla 14**).

El 88,41 % de los pacientes eran del sexo masculino, de los cuales el 73,91 % eran de orientación sexual HSH, lo que coincide con las características que ha presentado la epidemia cubana de VIH y cuyos datos, al cierre del año 2018, han sido publicados por la Vicedirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública de Cuba (13). Este reporte muestra que la epidemia de VIH afecta más al sexo masculino, el que representa más del 80 %. Los HSH constituyen el 74 % de todos los casos diagnosticados y aproximadamente el 90 % entre los del sexo masculino. La provincia que estuvo mayor representada fue La Habana con un 75,36 %, coincidiendo también con lo observado previamente, ya que esta provincia presenta mayor prevalencia de la infección en el país (casi el 70 %) (13). No se observaron diferencias significativas entre pacientes tratados y no tratados, para las variables epidemiológicas mencionadas. (**Tabla 14**).

Se observaron diferencias significativas entre tratados y no tratados en cuanto a los años de diagnóstico y la progresión a sida. El 55,56 % de los pacientes tratados llevaban más de 10 años de diagnosticados, mientras que en el grupo de los no tratados, el 100 % de los pacientes se encontraban en el rango de  $\leq 1-3$  años y el 81,82 % tenían diagnóstico reciente de la infección por VIH (**Tabla 14**).

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 ha ofrecido tratamiento libre de costo y de amplio acceso para todos los pacientes que lo necesitan (81). Aún más, a partir de la recomendación lanzada por la OMS, con vistas a alcanzar la estrategia 90-90-90 para el 2020, se decidió, por parte de las autoridades de salud cubanas, iniciar tratamiento a todos los pacientes, una vez que son diagnosticados (82). Estas estrategias han posibilitado una mayor sobrevivencia del paciente. Por otro lado, la reciente adopción de tratar a todos los individuos, debe contribuir a controlar la diseminación de la epidemia, reduciendo a mediano o largo plazo la incidencia de

casos. Ello justifica que la mayoría de los pacientes cubanos tratados tengan una supervivencia elevada, como se observa en el presente estudio, donde más del 50 % de los pacientes tienen más de 10 años de diagnosticados. En el caso de los pacientes no tratados, se trataba en su mayoría de individuos seleccionados para estudios de la resistencia transmitida por lo que es de esperar que tuvieran diagnósticos recientes de la infección por VIH, ya que este es un parámetro necesario para el análisis correcto de la resistencia transmitida (51).

El 36,23 % de los pacientes fueron clasificados como sida, de los cuales solo el 10,14 % ya eran casos sida al momento del diagnóstico, siendo 10 veces más frecuente que los pacientes tratados tuvieran sida al momento de la toma de muestra comparado con los no tratados (58,33 % vs 12,12 %,  $p=0,0001$ , OR:10,15, IC:2,94-34,99). El 58,34 % de los pacientes tratados habían evolucionado a sida y el 30,56 % (11/36 pacientes) lo había hecho en menos de un año, existiendo 3 veces más probabilidad de que los pacientes tratados desarrollaran sida en menos de un año desde la fecha del diagnóstico, comparado con los no tratados ( $p=0,0578$ , OR: 3,19, IC: 0,99-10,68).

En Cuba se informó que en el año 2016 fallecieron a causa del sida, 407 pacientes. De ellos, el 34 % tenían menos de 5 años diagnosticados con VIH, el 30 % eran debut sida y el 19 % habían fallecido el mismo año en que se diagnosticaron (83). No se puede descartar que los pacientes que evolucionaron a sida en menos de un año desde la fecha del diagnóstico, estuvieran relacionados con un diagnóstico tardío de la infección por VIH. Sin embargo, en un estudio realizado anteriormente en Cuba por Kourí y cols., se observó que pacientes que progresaron a sida en menos de tres años desde la fecha de infección, estaban infectados con la variante viral CRF19\_cpx, indicando que esta podría ser más virulenta (14).

La mediana de la CV del VIH en los pacientes estudiados fue elevada (58 600copias/mL) y no se encontraron diferencias entre los grupos de tratados y no tratados, observándose los mayores porcentajes en los rangos de 10 000-100 000 copias/mL y > 100 000 copias/mL. La carga viral plasmática, junto al conteo de  $LTCD4^+$ , es uno de los marcadores de progresión a sida que se emplean 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 (40). Las cifras observadas en los pacientes no tratados, podrían estar

relacionadas con que la mayoría tienen diagnóstico reciente y quizás algunos de ellos también están en la fase de infección reciente por VIH-1, (información no obtenida en el estudio), que 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 (21). También habría que explorar la relación de los altos valores de carga viral, con la variante viral que está infectando al paciente, que podría ser más virulenta y con alta capacidad replicativa. No se puede descartar además que, a pesar de que sean pacientes con diagnóstico reciente, tengan un diagnóstico tardío de la infección y se encuentren progresando a sida.

Para los pacientes tratados, los valores elevados de carga viral se explican porque en su mayoría se trata de pacientes que se encuentran con fallo a la terapia ARV y por eso se les indicó una prueba de tropismo, buscando la posibilidad de incluir el Maraviroc como opción terapéutica en un nuevo esquema. La CV plasmática es el principal parámetro para el seguimiento de la terapia ARV. Se considera que hay un fracaso virológico cuando la CV es detectable pasadas 24 semanas desde el comienzo del tratamiento ARV, o si tras hacerse indetectable ésta vuelve a aparecer (valores >50 copias/mL) en dos determinaciones consecutivas separadas entre 2-4 semanas (40). Los altos valores de carga viral de los pacientes tratados de este estudio, indican un fallo a la terapia ARV de larga evolución, 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 (84), lo que coincide con lo observado en los pacientes tratados del presente estudio.

El conteo de células TCD4<sup>+</sup> fue diferente entre pacientes tratados y no tratados. El 50 % de los pacientes tratados tenían < 200 células/mL comparado con el 12,12 % de los no tratados ( $p=0,0007$ , OR: 7,25, IC: 2,11-24,87). Por otro lado, el 30,30 % de los pacientes no tratados tenían > 500 células/mL, mientras que solo el 8,33 % de los tratados tenían estos valores de CD4 ( $p=0,0206$ , OR: 4,78, IC: 1,18-19,31). En los pacientes tratados, especialmente en aquellos que se encuentran en la etapa de sida (58,33 %) 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 es utilizado para determinar el estadio en que se encuentran los pacientes infectados por VIH. Durante la infección por VIH se produce una reducción progresiva en el número de células T

que expresan CD4 y un conteo de las mismas inferior a las 200 células/mL es uno de los marcadores del estadio de sida. Realizar la medición del conteo de CD4 antes de comenzar la terapia, puede darnos información sobre la función inmunológica del paciente (35). Resulta justificado encontrar un alto número de pacientes tratados del presente estudio exhibiendo bajos conteos de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, como resultado del fallo terapéutico de larga evolución. Además, como se describió anteriormente, más del 50 % eran pacientes con más de 10 años de diagnosticados con VIH, que habían recibido múltiples esquemas de TAR y el 58,33 % habían sido clasificados como sida, lo que implica bajos conteos de CD4 (40).

**Tabla 14. Características epidemiológicas, clínicas e inmunológicas de los pacientes estudiados**

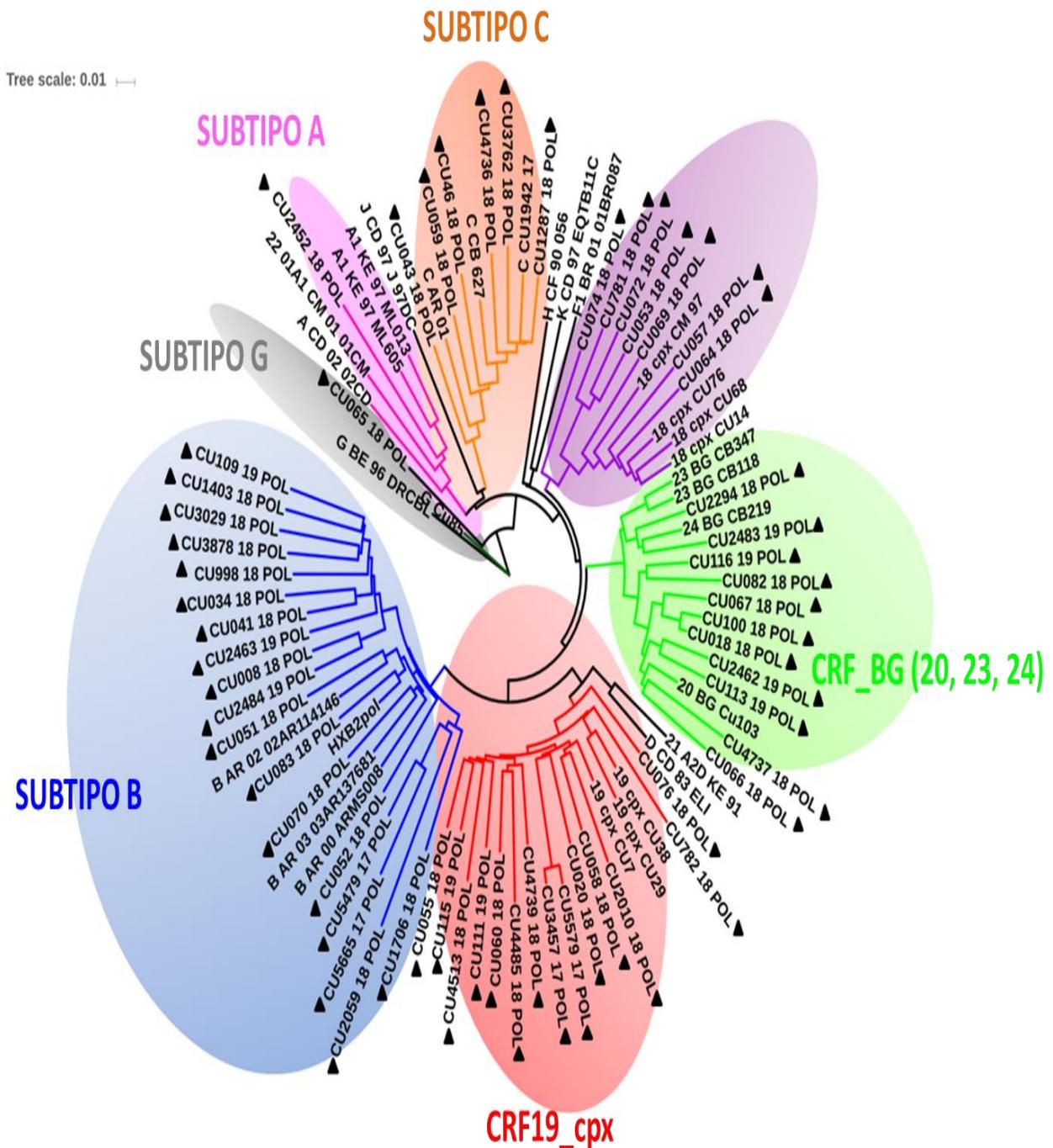
Características	Tratados		No tratados		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
	36	100	33	100	69	100
<b>Edad: mediana (RIC)</b>	<b>41,5 (16-65)</b>		<b>36 (19-68)</b>		<b>38 (16-68)</b>	
15-30	7	19,44	11	33,33	18	26,09
31-45	13	36,11	12	36,36	25	36,23
46-60	15	41,67	8	24,24	23	33,33
> 60	1	2,78	2	6,06	3	4,35
<b>Sexo</b>						
Masculino	32	88,89	29	87,88	61	88,41
<b>Región de residencia</b>						
La Habana	30	83,33	22	66,67	52	75,36
Occidente (excluida Habana)	1	2,78	5	15,15	6	8,70
Centro	3	8,33	4	12,12	7	10,14
Oriente	2	5,56	2	6,06	4	5,80
<b>Orientación sexual</b>						
HSH	28	77,78	23	69,70	51	73,91
<b>Años de diagnóstico de VIH: mediana (RIC)</b>	<b>13 (1-29)</b>		<b>1 (0-5)</b>		<b>3 (0-29)</b>	
≤ 1 año (Diagnóstico reciente)	2	5,56	27	81,82	29	42,03
> 1-3 años	5	13,89	6	18,18	11	15,94
> 3-5 años	1	2,78	0	0,00	1	1,45
> 5-10 años	8	22,22	0	0,00	8	11,59
> 10 años	20	55,56	0	0,00	20	28,99
<b>Sida al diagnóstico de VIH</b>	3	8,33	4	12,12	7	10,14
<b>Sida actual</b>	21	58,33	4	12,12	25	36,23
<b>Evolución a sida a partir del diagnóstico</b>						
≤ 1 año	11	30,56	4	12,12	15	21,74
1-3 años	4	11,11	0	0,00	4	5,80
> 3 años	6	16,67	0	0,00	6	8,70
No sida	15	41,67	29	87,88	44	63,77
<b>Carga viral en copias/mL: mediana(RIC)</b>	<b>61000 (87-2550000)</b>		<b>58150 (3640-6670000)</b>		<b>58600 (87-6670000)</b>	
< 1000	1	2,78	0	0	1	1,45
1000-10000	3	8,33	4	12,12	7	10,14
> 10000-100000	14	38,89	13	39,39	27	39,13
> 100000	13	36,11	13	39,39	26	37,68
Desconocido	5	13,89	3	9,09	8	11,59
<b>Conteo de CD4 en células/mL: mediana (RIC)</b>	<b>189,5 (1-726)</b>		<b>410 (35-954)</b>		<b>259 (1-954)</b>	
< 200	18	50	4	12,12	22	31,88
200-500	11	30,56	11	33,33	22	31,88
> 500	3	8,33	10	30,30	13	18,84
Desconocido	4	11,11	8	24,24	12	17,39

## 5.2 Detección de subtipos de VIH-1 en las regiones *pol* y *env*

El análisis filogenético es la técnica de referencia para el subtipado y discriminación entre subtipos, CRF y URF de VIH, sin embargo debido a su complejidad se necesita de personal altamente entrenado en programas bioinformáticos por lo que no está implementado en la práctica habitual del laboratorio de virología clínica. Para facilitar la identificación de los subtipos de VIH en la rutina del laboratorio, se han desarrollado varias herramientas que se encuentran disponibles en diferentes sitios webs (REGA, Standford, COMET, NCBI, STAR, EuResist, TherapyEdge y jpHMM). Aunque son rápidas, fáciles de usar y muy útiles para la identificación de los subtipos puros, presentan el inconveniente de su menor sensibilidad para la discriminación entre las CRFs, con respecto al análisis filogenético convencional (85).

Recientemente, se dispone de métodos automatizados que permiten hacer el análisis filogenético de un conjunto de secuencias, incluida la generación de árboles filogenéticos. Esto posibilita, no solo confirmar de manera rápida y precisa los subtipos obtenidos con las otras herramientas, sino además realizar estudios de origen y evolución de un grupo de organismos (6, 85).

En el presente trabajo, se realizó el análisis filogenético en 69 muestras, para una región de 187 aa del gen *env* que codifica los fragmentos de C2V3C3 de la gp 120. En 58 de las 69 muestras (84,05 %) se pudo además secuenciar y analizar la región *pol* (99 aa de PR y 335 de la TI). Se utilizaron, como métodos iniciales para la determinación de subtipos, las herramientas COMET y Rega Subtyping tool. Todas las secuencias obtenidas (58 de *pol* y 69 de *env*) fueron con posterioridad re-clasificadas con el programa NGPhylogeny, que posibilitó construir árboles filogenéticos (Figuras 7 y 8).



**Figura 7. Árbol filogenético del gen *pol* de VIH-1**

El análisis incluyó 87 secuencias nucleotídicas, 58 secuenciadas en el presente estudio y 29 de referencia. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud (PhyML versión 3) y el modelo de sustitución nucleotídica GTR. El árbol consenso, inferido se utilizó para representar la historia evolutiva de las secuencias analizadas. Los diferentes subtipos se muestran en un árbol circular con ramas señaladas en diferentes colores de acuerdo al subtipo: **Rosado** subtipo A; **Azul**, subtipo B; **Naranja**, subtipo C; **Gris**, subtipo G; **Verde**, CRFs\_BG (20, 23,24), **Rojo**, CRF19\_cpx; **Violeta**, CRF18\_cpx. Las muestras cubanas secuenciadas en el presente estudio se encuentran marcadas con un triángulo negro, el resto son secuencias de referencia de los diferentes subtipos de VIH-1, incluidas en este trabajo.



Los subtipos de VIH-1 detectados con mayor frecuencia fueron el subtipo B, el CRF19\_cpx y los CRF\_BG (20, 23, 24), tanto al estudiar los genes *env* y *pol* por separado, como al examinar las variantes virales de manera global, considerando el análisis conjunto de los subtipos detectados en las dos regiones del virus (Figuras 7 y 8 y Tabla 15), estos hallazgos coinciden con lo que se ha observado en varios estudios previos de Cuba (51, 86-88).

En Cuba, a pesar de la baja prevalencia de la infección con el VIH-1 circulan gran variedad de subtipos (86), principalmente B, C, G y H, las formas recombinantes CRFs\_BG (20, 23 y 24) y los recombinantes complejos, CRF19\_cpx y CRF18\_cpx (88). Mientras que los recombinantes BG tienen origen cubano, los CRF18\_cpx y CRF19\_cpx parecen tener origen africano (88), aunque se comportan de manera epidémica solo en Cuba. Esta diversidad contrasta con la epidemia casi exclusiva de Subtipo B en el resto del Caribe (94 %) (87). En un estudio realizado por Kourí y cols., donde se analizaron más de 1500 secuencias de pacientes seropositivos a VIH, con fechas de diagnóstico de la infección desde 1986 hasta 2018, se observó que el subtipo B se encontraba, de manera general en un 30 % de la población estudiada, mientras que las formas recombinantes (CRF\_BG, CRF19\_cpx y CRF18\_cpx), se encontraron en el 51 % de las muestras. En menor cuantía se encontraron otros subtipos tales como, A, C, D, F, G, H, J, otras CRFs y URFs (52).

**Tabla 15. Variantes de VIH-1 obtenidas mediante secuenciación parcial de dos regiones del virus, en las muestras analizadas.**

Subtipo VIH-1	Subtipo en <i>pol</i> N=58	Subtipo en <i>env</i> N=69	Subtipo global N=58
	N (%)	N (%)	N (%)
<b>A1</b>	1 (1,72)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>B</b>	18 (31,03)	26 (37,68)	18 (31,03)
<b>C</b>	6 (10,34)	5 (7,25)	5 (8,62)
<b>G</b>	1 (1,72)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>CRF_BG</b>	11(18,96)	17(24,64)	10(17,24)
<b>CRF19_cpx</b>	14 (24,13)	18 (26,09)	12 (20,68)
<b>CRF18_cpx</b>	7 (12,06)	3 (4,35)	1 (1,72)
<b>URF</b>	0 (0,00)	0 (0,00)	12 (20,68)

Los subtipos de VIH-1 no cambiaron significativamente entre los pacientes tratados y no tratados, aunque fue más frecuente detectar los Subtipos B y C entre los pacientes tratados y los

CRF\_BG, CRF19\_cpx y URF entre los no tratados (Tabla 16). Como se describió anteriormente, los pacientes tratados tenían más tiempo de diagnosticados y de infectados con VIH, que los pacientes no tratados, lo que explica estas diferencias observadas en las frecuencias de los subtipos. En la última década se ha observado una disminución en la circulación del subtipo B a expensas de un incremento de los virus recombinantes BG (CRFBG\_20, CRFBG\_23 y CRFBG\_24) y el CRF19\_cpx(51, 86-88).

Un estudio realizado en el 2017 por Machado y cols (51) en individuos cubanos con diagnóstico reciente de la infección por VIH, reveló que la frecuencia de aparición de los subtipos B, CRF19\_cpx y CRF\_BG (20, 23 y 24) fue casi idéntica: B (26,9 %), CRF19\_cpx (24,1 %), CRF\_BG (20, 23, 24) (23,4 %). Kourí y col, también encontraron resultados similares, pero en población mayoritariamente tratada; subtipo B (30 %), CRF19\_cpx, (20 %), CRF\_BG (20, 23, 24) (21 %), CRF18\_cpx (10 %). Aún más, cuando la autora estratificó la distribución de los subtipos de acuerdo a la fecha de diagnóstico de la infección por VIH, se observó que los subtipos A, C, F, G y H prevalecieron en individuos diagnosticados entre los años 1986 a 1990 y que los recombinantes BG no estaban al inicio de la epidemia cubana de VIH y se incrementaron de manera significativa después de la década del 2000, a expensas de la disminución del subtipo B. El virus CRF19\_cpx, aunque estaba desde el inicio de la epidemia, ha incrementado su frecuencia de manera exponencial a partir del año 2010 (89).

**Tabla 16. Subtipo global de VIH-1 en pacientes tratados y no tratados mediante secuenciación parcial de dos regiones del virus.**

Subtipo global	Tratados		No tratados		Total	
	N=29	%	N=29	%	N=58	%
<b>B</b>	12	41.38	6	20.69	18	31.03
<b>C</b>	4	13.79	1	3.45	5	8.62
<b>CRF18_cpx</b>	0	0.00	1	3.45	1	1.72
<b>CRF19_cpx</b>	5	17.24	7	24.14	12	20.69
<b>CRF_BG (20, 23, 24)</b>	3	10.34	7	24.14	10	17.24
<b>URF</b>	5	17.24	7	24.14	12	20.69

Al analizar los subtipos de manera global, se encontraron algunas diferencias en 12 muestras, que presentaron un subtipo viral diferente entre los genes *pol* y *env*. Estas variantes virales fueron consideradas como URFs (cinco en pacientes tratados y siete en no tratados),

representando el 20,7 % de las variantes virales detectadas al analizar el subtipo de manera global (Tabla 16). Estos resultados coinciden con lo publicado por Machado y colaboradores (90) los que describen un incremento de las CRF\_BG y de múltiples URF (11,1 %) entre pacientes cubanos recién diagnosticados entre los años 2013 y 2014. En ese estudio la URF más frecuentemente observada fue la combinación de CRF18\_cpx/CRF19\_cpx.

La recombinación constituye una fuente adicional de variación del VIH y desempeña un papel esencial en su evolución y en la expansión geográfica de los subtipos. La generación de retrovirus recombinantes requiere que dos virus infecten una célula, bien simultáneamente, a través de un episodio único de transmisión, o bien de forma secuencial, en varios episodios. En el VIH-1, la recombinación se puede producir entre diferentes cepas del mismo subtipo (intra-subtipo), de distintos subtipos (inter-subtipo) o de diferentes grupos (inter-grupo) (91).

La recombinación *in vitro* puede ligar mutaciones en el VIH-1 y aumentar la resistencia a un determinado antirretroviral o generar virus multirresistentes (92). Este fenómeno puede darse también *in vivo*. La recombinación puede facilitar la adquisición de mutaciones que compensen la pérdida de la capacidad replicativa de estos virus, producida por mutaciones previas que causan resistencia.

Nájera y col., en un artículo publicado en la década del 2000 diserta sobre el sub-registro de URFs en zonas donde circulan a la vez múltiples subtipos y CRFs, así como la posibilidad de generar nuevas formas genéticas en aquellas poblaciones donde esto ocurre (4). Este fenómeno coincide con lo observado en la epidemia cubana de VIH, donde circulan gran cantidad de variantes genéticas, por lo que es de esperar el incremento de las URF en Cuba. Este resultado además advierte sobre la importancia de secuenciar más de un gen de VIH para obtener resultados más precisos al realizar estudios de epidemiología molecular en el país.

La alta frecuencia de recombinantes encontrados en las zonas donde circulan múltiples formas genéticas nos advierte sobre el posible efecto negativo del uso incontrolado de las drogas antirretrovirales (ARVs). Esto podría potenciar la aparición y circulación generalizada de cepas multirresistentes generadas a partir de la recombinación (93, 94).

De manera interesante se observó que, en el presente estudio, el virus CRF18\_cpx fue el más representado formando parte de las URF (7/12, 58,3 %,  $p=0,0000$ , OR: 63, IC: 6,3-622) y específicamente entre los pacientes no tratados, en contraste con los tratados (5/7 vs 2/5,

p=0,0455, OR: 21,00, IC: 1,21-564-14). La URF más frecuente fue la combinación de CRF18\_cpx/CRF19\_cpx, todas observadas entre los pacientes no tratados (42,8 %) (Tablas 16 y 17). Solo una muestra (1,72 %) fue clasificada como CRF18\_cpx en el análisis del subtipo global. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Machado y colaboradores, los que encontraron que la URF CRF18\_cpx/CRF19\_cpx fue la más frecuente en pacientes recién diagnosticados con VIH entre el 2013 y 2014 (90). Valdría la pena investigar en el futuro si el hallazgo frecuente del CRF18\_cpx, formando parte de las URF podría estar relacionado con una desventaja evolutiva de esta variante viral y que en combinación con otro subtipo u otra forma recombinante podría incrementar su capacidad replicativa y su patogenicidad. En un estudio anterior, donde se estudió el uso del correceptor en 42 muestras cubanas, se observó que las dos muestras identificadas como CRF18\_cpx, tenían tropismo CCR5 (95). Como se discutirá más adelante, en la presente investigación, se observaron resultados similares.

**Tabla 17. Distribución de los virus recombinantes únicos detectados entre pacientes tratados y no tratados.**

Subtipo gen <i>pol/ gen env</i>	URF	%	Tratados	%	No tratados	%
G/B	1	8,33	0	0,00	1	14,3
CRF18_cpx/B	2	16,67	1	20,00	1	14,3
C/ CRF18_cpx	1	8,33	1	20,00	0	0,00
A1/CRF19_cpx	1	8,33	1	20,00	0	0,00
CRF18_cpx/CRF_BG	1	8,33	0	0,00	1	14,3
CRF19_cpx/CRF_BG	2	16,67	2	40,00	0	0,00
CRF_BG /CRF19_cpx	1	8,33	0	0,00	1	14,3
CRF18_cpx/CRF19_cpx	3	25,00	0	0,00	3	42,8
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>100,00</b>	<b>5</b>	<b>100,00</b>	<b>7</b>	<b>100,00</b>

### 5.3 Predicción del uso del correceptor viral y relación con el Subtipo de VIH-1.

La entrada del VIH-1 a la célula diana es mediada por interacciones secuenciales de la glicoproteína de la envoltura gp 120 con el CD4 y con uno de los dos receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4, denominados correceptores del VIH (32). Los virus que predominan en las primeras etapas de la infección utilizan preferiblemente el correceptor CCR5. Durante el curso de la infección se produce, en alrededor del 50 % de los pacientes, el cambio en el uso del correceptor de VIH-1, de CCR5 a CXCR4. Se conoce que el cambio en el tropismo viral está

asociado con un deterioro acelerado del sistema inmune y un pronóstico clínico desfavorable. Además, se ha observado que el tratamiento con antagonistas de CCR5 puede seleccionar las poblaciones minoritarias de los virus con la habilidad de utilizar CXCR4. Es por ello que la determinación del tropismo reviste importancia, no solo desde el punto de vista clínico, para el paciente que iniciará terapia con Maraviroc, sino también desde el punto de vista epidemiológico, para identificar los virus que tienen potencialmente mayor virulencia y que podrían estar relacionados con un mayor riesgo de progresión rápida a sida (35).

Al investigar la predicción del uso del correceptor en el presente estudio, se pudo observar que, de manera general, la mayoría de las muestras mostraron el fenotipo R5, tanto al analizar el subtipo en el fragmento de *env* (63,77 %, 44/69 muestras), como en el subtipo global (62,06 %, 36/58 muestras), mientras que el 36,23 % y el 37,93 % fueron R5X4/X4 para los mismos fragmentos, respectivamente (Tabla 18). La literatura reporta que del 60 al 80 % de los sujetos, en las primeras etapas de la infección por el VIH, portan variantes virales R5 y se considera que son las principales variantes virales responsables de las nuevas infecciones. Las variantes virales X4 o R5X4 emergen en aproximadamente el 50 % de los individuos en etapas posteriores de la enfermedad, generalmente asociado a rápida depleción de las células TCD4<sup>+</sup> y progresión a sida (96). Por otro lado, Kourí y cols., en 2016 (97) publicaron un estudio de 42 muestras de pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 y ellos describieron que el 38,1 % de los pacientes portaban virus con capacidad reducida para el uso del correceptor CCR5 (virus R5X4 o X4), lo cual coincide con los hallazgos de la presente investigación.

Al analizar la relación entre el subtipo viral en el gen de la envoltura y el fenotipo o tropismo viral en las muestras estudiadas, se demostró que solo el subtipo C y el recombinante CRF19\_cpx, mostraron asociación significativa con virus que utilizan el correceptor X4y R5X4/X4, respectivamente (Tabla 18). Fue nueve veces más probable que los virus del subtipo C tuvieran tropismo X4 comparado con el resto de los subtipos, tanto al analizar el subtipo en el gen *env* ( $p= 0,0260$ , OR:9,30 IC:1,57-54,96) como en el subtipo global ( $p=0,0318$ , OR:9,68, IC:1,43-52,34). El análisis del CRF19\_cpx mostró que es casi tres veces más probable que los virus CRF19\_cpx tengan tropismo viral R5X4/X4 en el gen *env*, comparado con las otras variantes virales ( $p=0,0487$ ; OR: 2,90;IC: 1,00-8,42). Esta asociación se hace aún más significativa al analizar el subtipo de manera global, donde se encuentra una probabilidad de seis veces para los

virus R5X4 ( $p=0,0051$ , OR: 6,23 IC: 1,58-24,43) y de cuatro veces para el análisis de la suma de R5X4/X4 ( $p=0,0234$ ; OR: 4,23; IC: 1,15-15,52) (Tabla 18). Esto indica que el subtipo en la región *pol* (que se tuvo en cuenta para el análisis global del subtipo), reviste un papel importante en el tropismo viral, para el caso del virus CRF19\_cpx, lo cual ha sido descrito previamente por Kourí y colaboradores en 2015 (14).

El primer reporte de la relación del CRF19\_cpx con el uso del correceptor CXCR4 se realizó en muestras de pacientes cubanos no tratados tomadas entre los años 2007 y 2011 (14). Ese estudio halló que el CRF19\_cpx se asoció con una progresión rápida a sida y una de las hipótesis para explicar esta progresión rápida fue el hallazgo de niveles más altos de expresión de RANTES y una proporción significativamente más frecuente de virus X4 entre los pacientes infectados con esta variante viral (14). Otro estudio posterior, también de muestras de pacientes cubanos mostró que los virus CRF19\_cpx presentaban con mayor frecuencia cepas con tropismo R5X4/X4 ( $p=0.009$ ) o X4 ( $p=0.019$ ) (95). Los resultados de la presente investigación refuerzan estos hallazgos descritos casi exclusivamente en Cuba.

No obstante, en el año 2018, un grupo de investigadores españoles publicó la emergencia del CRF19\_cpx en 57 pacientes con orientación sexual HSH, residentes de Málaga. Plantean el origen del recombinante entre 2007 y 2010 y en estrecha relación con otro virus CRF19\_cpx reportado en el Reino Unido. Ellos reportaron la asociación de este virus con la mutación G190A, que confiere resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos. Sin embargo no encontraron asociación con progresión rápida a sida. En este estudio solo se secuenció el gen *pol*, por lo que no se pudo determinar el tropismo viral (98).

El virus CRF19\_cpx es una forma genética compleja solo reportada en Cuba (99) pero con evidencias ancestrales en África Central. En la actualidad, se ha convertido entre la segunda y la tercera variante del VIH-1 en frecuencia que circula en Cuba (entre 20-24 %) (51).

Esta forma recombinante contiene en su genoma los subtipos D (C-parte de Gag, PR, TR y nef), subtipo A (N-parte de Gag, Integrasa, Env) y subtipo G (Vif, Vpr, Vpu y parte C-terminal de Env) (99). Los subtipos D y A han sido asociados con rápida y lenta progresión a sida, respectivamente comparado con el subtipo B. La probabilidad de estar infectado con un virus que utiliza el correceptor CXCR4 y no haber desarrollado sida, es mayor en el subtipo D que en el A, según un estudio realizado en gestantes de Uganda (100), sugiriendo un cambio temprano en el uso del

correceptor hacia una variante viral con tropismo X4. No obstante estos hallazgos no explicarían nuestras observaciones debido a que en el virus CRF19\_cpx, la región que codifica para las proteínas de la envoltura, responsables del tropismo, deriva del subtipo A. Por este motivo debemos tratar de relacionar otras características epidemiológicas, del virus o de la respuesta inmune, con la asociación entre esta variante viral y el uso de este correceptor.

**Tabla 18. Comparación de la predicción del uso del correceptor entre los subtipos de VIH detectados.**

Predicción del uso del correceptor	Subtipo en env						Subtipo global (pol y env)						
	Muestras por subtipo						Muestras por subtipo						
	N (%)						N (%)						
	Total	B	C	CRF_BG	CRF 19_cpx	CRF 18_cpx	Total	B	C	CRF_BG	CRF19_cpx	CRF18_cpx	URF
	69 (100)	26 (100)	5 (100)	17 (100)	18 (100)	3 (100)	58 (100)	18 (100)	5 (100)	10 (100)	12 (100)	1 (100)	12 (100)
R5	44 (63,77)	19 (73,08)	2 (40)	12 (70,58)	8 (44,44)	3 (100)	36 (62,06)	14 (73,91)	2 (40)	8 (71,43)	4 (42,86)	1 (100)	7 (54,55)
Valor p R5					P=0,0487 OR:0,343 IC:0,11-0,99						P=0,0234 OR:0,236 IC:0,64-0,86		
R5X4	14 (20,29)	4 (15,38)	0 (0)	4 (23,53)	6 (33,33)	0 (0)	12 (20,68)	1 (13,04)	0 (0)	2 (21,43)	6 (42,86)	0 (0)	3 (27)
Valor p R5X4											P=0,0051 OR:6,230 IC:1,58-24,43		
X4	11 (15,94)	3 (11,54)	3 (60)	1 (5,88)	4 (22,22)	0 (0)	10 (17,24)	3 (13,04)	3 (60)	0 (7,14)	2 (14,29)	0 (0)	2 (18,18)
Valor p X4			P=0,0260 OR:9,305 IC:1,57-54,96						P=0,0318 OR:9,680 IC:1,43-52,34				
R5X4/X4*	25 (36,23)	7 (26,92)	3 (60)	5 (29,41)	10 (55,56)	0 (0)	22 (37,93)	4 (26,09)	3 (60)	2 (28,57)	8 (57,14)	0 (0)	5 (45,45)
Valor p R5X4/X4*					P=0,0487 OR:2,90 IC:1,00-8,42						P=0,0234 OR:4,233 IC:1,15-15,52		

La asociación del subtipo C con virus que utilizan el correceptor CXCR4, obtenida en la presente investigación, contrasta con estudios anteriores. En estudios *ex vivo*, algunos autores han publicado que, a pesar de que el subtipo C es el más prevalente a nivel global, paradójicamente parece menos virulento que otros subtipos (101), sugiriendo un único mecanismo molecular que simultáneamente afecta la eficiencia replicativa del virus, a la vez que facilita los eventos de transmisión viral. Muchos mecanismos parecen involucrar a las glicoproteínas de Env y a los mecanismos de entrada, observándose que la detección de variantes R5X4 y X4 es un evento

relativamente raro para el subtipo C, aún en estadios avanzados de la infección, al compararse con el subtipo B (102). Por su parte, Garrido y col., estudiaron un número mayor de muestras del subtipo C y también encontraron baja frecuencia de aparición del fenotipo X4 (34).

Venner y cols., en el 2016 (103) estudiaron mujeres de Uganda y Zimbawe y observaron que las infectadas con el subtipo C tenían mayores conteos de células TCD4<sup>+</sup> durante el seguimiento, así como menos proporción de pacientes que evolucionaron a sida, en comparación con los subtipo A y D. De manera contrastante, Mlisana y cols., reportaron la progresión rápida a sida en mujeres sudafricanas infectadas con subtipo C, pero en esta investigación no se exploró el uso del correceptor (104).

Estudios como los de Cashin y col. apoyan la hipótesis de que las cepas R5 del subtipo C pueden evolucionar *in vivo* a través de interacciones alteradas con CCR5, que puede manifestarse *in vitro* como un incremento en la capacidad para emplear correceptores alternativos (105). Schuitemaker H. y col., refieren un aumento de la presencia de cepas que utilizan CXCR4 en el subtipo D (106, 107). Esta observación es consistente con el ritmo más rápido de la progresión de la enfermedad reportada para la infección con este subtipo tanto en África (108, 109), como fuera de este continente (109).

Como se observa en la Tabla 17, de los 12 virus clasificados como URFs, cinco se clasificaron como virus que utilizan el correceptor CXCR4 (tres R5X4 y dos X4) y al analizar los virus recombinantes únicos con tropismo dual o X4 que componen a estos recombinantes se observó que tres de los cinco (60 %) tenían incluido al CRF19\_cpx en su genoma. En dos de estas muestras el CRF19\_cpx se identificó en el gen de la envoltura y en la otra, en el gen de la polimerasa viral. Como se describió anteriormente, la URF observada con mayor frecuencia fue la combinación CRF18\_cpx/CRF19\_cpx (tres muestras, dos X4 y una R5), todas en pacientes no tratados, con diagnóstico reciente de VIH. En contraste a lo descrito para el CRF19\_cpx, los tres virus CRF18\_cpx obtenidos en el gen *env*, así como el único CRF18\_cpx detectado en *pol*, fueron R5, coincidiendo con lo observado en estudios anteriores (14, 95). Habría que explorar en estudios futuros la posibilidad de que el CRF18\_cpx sea menos virulento, y con menor capacidad replicativa y que necesite la combinación con otra variante viral para su mejor adaptación. Se ha planteado la hipótesis de si la recombinación inter-subtipo puede dar lugar a cepas más patógenas si los fragmentos genómicos de diferentes subtipos se unen en un virus con mayor

capacidad de replicación, pero no se ha encontrado ninguna prueba directa para este escenario, aunque los resultados de la presente investigación apuntan a robustecer esta hipótesis (110).

La situación es más compleja con los genotipos mixtos (tanto CRFs como URFs) con sólo unos pocos aislamientos caracterizados hasta la fecha (111, 112). Un reciente estudio en Guinea Bissau, muestra una alta frecuencia de virus con tropismo X4 (86 %) en la forma recombinante CRF02\_AG (84). De igual manera, también se ha reportado recientemente en España una alta incidencia de virus X4 entre usuarios de drogas intravenosas infectados con el recombinante CRF14\_BG (113), así como la asociación de CRF01\_AE con el fenotipo X4 en Tailandia (90).

Para determinar la predicción del fenotipo viral a partir del genotipo, el programa más empleado es el Geno2Pheno, que se basa en los valores de FPR (34, 71). Existen varios algoritmos o guías que utilizan valores de corte diferentes para definir los virus X4. Las guías alemanas son las más estrictas en realizar esta clasificación, ya que solo aquellos virus con valores de FPR menores al 5 % son considerados X4. En la figura 9A podemos observar que entre las muestras estudiadas, aquellas que se clasificaron como X4 mostraron valores medios de FPR de 1,15 %, las R5X4 de 12,76 % y las clasificados como R5, valores de 58.02 %, demostrándose diferencias significativas entre los grupos. Al comparar los valores medios de FPR con relación a la distribución por subtipos (Figura 9B), se detectó que el CRF19\_cpx mostró cifras inferiores con relación a los otros subtipos estudiados (27,2 %), en particular con relación al CRF18\_cpx (83,8 %) y el Subtipo B (44,3 %), donde esta diferencia fue significativa, lo que apoya el resultado antes descrito con relación a la mayor proporción de virus X4 o R5X4 del recombinante CRF19\_cpx. Por el contrario, el virus CRF18\_cpx exhibió los mayores valores de FPR, reforzando lo descrito previamente sobre la relación de este virus recombinante con el fenotipo R5 y la posibilidad de que sea un virus con menor capacidad replicativa.

Un estudio longitudinal, empleando secuenciación de nueva generación, en 11 pacientes recién infectados que mostraban fenotipo R5, reveló la emergencia de variantes que utilizaban el correceptor CXCR4 en el 18,4 % de los pacientes. Los bajos niveles de FPR basales fueron predictores del cambio temprano del correceptor (114). Esto demuestra el valor de FPR para predecir el uso del correceptor.

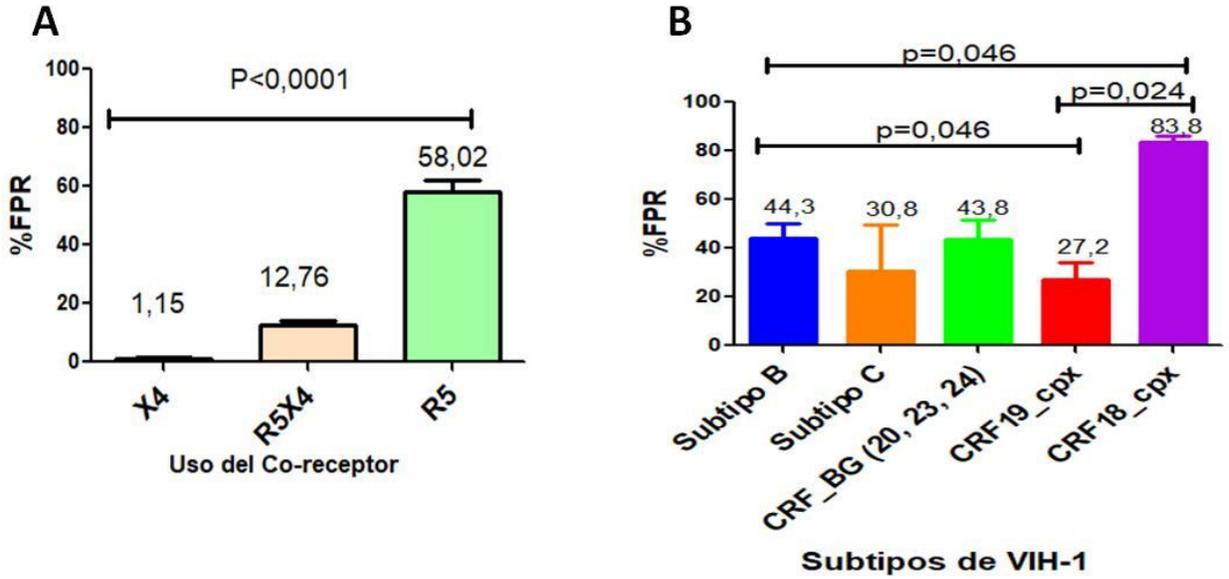


Figura 9. Media de los valores de FPR de cada secuencia (lazo V3) obtenida mediante la predicción del genotipo (geno2pheno) y estratificada acorde al uso del correceptor (A) y el subtipo de VIH-1 (B).

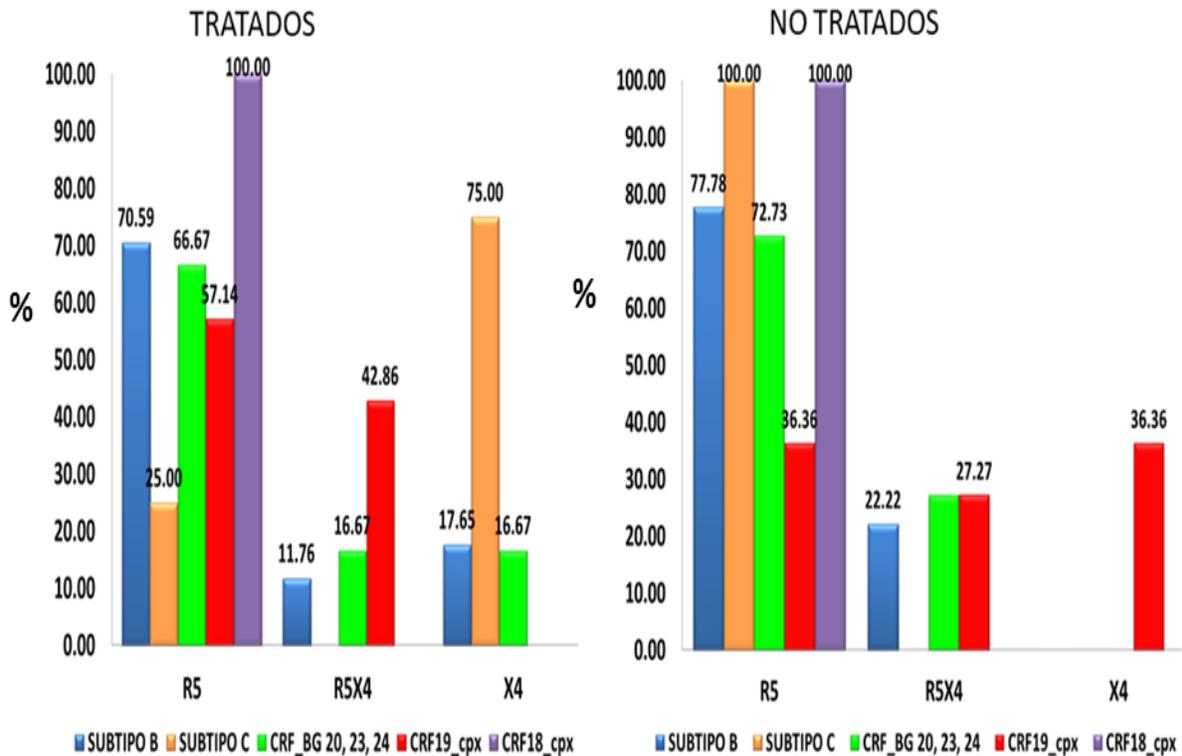


Figura10. Comparación del uso del correceptor entre pacientes tratados y no tratados.

Al estratificar el uso de correceptor entre pacientes tratados y no tratados no se observaron diferencias entre los dos grupos para el uso del correceptor: de las 36 muestras estudiadas de pacientes tratados, 23 (63,9 %) virus se clasificaron como R5, seis como R5X4 (16,7 %) y siete como X4 (19,4 %). De las 33 muestras de pacientes no tratados, 21 (63,63 %) se catalogaron como virus R5, ocho como R5X4 (24,24 %) y cuatro como X4 (12,12 %) (Datos no mostrados). Sin embargo, sí se revelaron algunas diferencias entre los subtipos, al analizar el gen *env* relacionado con el uso del correceptor (Figura 10). Los virus del subtipo C fueron predominantemente X4 en los pacientes tratados (3/4, 75 %,  $p=0,0178$ , OR: 14,777, IC: 1,71-127,58) y los virus CRF19\_cpx de tipo R5X4 (3/7, 42,86 %,  $p=0,0375$ , OR: 5,88, IC: 1,09-32,74). En los pacientes no tratados, es llamativo, que a pesar de que estos pacientes en su mayoría (81,82 %) habían sido diagnosticados recientemente, aquellos infectados con virus CRF19\_cpx fueron preferentemente de tipo X4, (4/7 pacientes, 36,36 %,  $p=0,0081$ , OR: 27,00, IC: 1,29-562,39). Aún más, tres de estos pacientes tenían menos de un año de diagnóstico de la infección con VIH y el cuarto tenía dos años de diagnosticado, lo cual apoyaría la hipótesis descrita previamente de que el tropismo X4 observado para el virus CRF19\_cpx no está relacionado con la evolución de la historia natural de la infección con VIH, sino con rápida progresión a sida. Sin embargo, como no tenemos certeza de la fecha de infección de estos pacientes, no se puede descartar que sean diagnósticos tardíos de la infección por VIH.

Por el contrario el subtipo C (también asociado en este estudio a fenotipo X4) se encontró principalmente en pacientes tratados, que en su mayoría tenían cinco o más años de diagnosticados, coincidiendo con lo establecido clásicamente para el cambio de tropismo de R5 a X4. La literatura reporta que del 60 a 80 % de los sujetos, en las primeras etapas de la infección por el VIH, portan variantes virales R5 y se considera que son los principales tipos de virus responsables de las nuevas infecciones. Las variantes virales X4 o R5X4 emergen en aproximadamente el 50 % de los individuos en etapas posteriores de la enfermedad, generalmente asociado a rápida depleción de las células TCD4<sup>+</sup> y progresión a sida (40).

Un estudio que involucró muestras de pacientes de la India, Uganda y Sudáfrica, tratados y no tratados, infectados con subtipos no B de VIH-1 reveló que la mayoría de los pacientes no tratados, infectados con subtipo C exhibieron fenotipo R5. Sin embargo, el 25 % de los pacientes sudafricanos, infectados con subtipo C y que estaban bajo régimen de terapia exhibieron

fenotipo R5X4 y el 4 %, X4 (115). Esto coincide con lo observado en la presente investigación, donde el subtipo C se asoció con fenotipo X4, pero estuvo relacionado a pacientes tratados. Ese mismo estudio, concluyó que, de manera general, independientemente del subtipo, la mayoría de los pacientes no tratados exhibieron virus con fenotipo R5, mientras que en los pacientes tratados, emergieron las variantes R5X4, tanto para subtipo C (25 %) en Sudáfrica, como para Subtipo A (41 %) y subtipo D (65 %) en Uganda. El subtipo C de la India, tanto para pacientes tratados como no tratados fue predominantemente R5 (más de un 94 %) (115).

#### **5.4 Relación entre el fenotipo viral, variables clínico epidemiológicas, carga viral y el conteo de células TCD4<sup>+</sup>**

Existen una serie de factores que pueden condicionar la progresión a sida de los pacientes, dentro de ellos se han reconocido factores dependientes del hospedero, del virus así como del ambiente (109).

Al analizar las variables epidemiológicas de los pacientes estudiados con relación al uso del correceptor (Tabla 19), se observó que los pacientes infectados con virus R5X4, tanto tratados (66,67 %) como no tratados (62,5 %), estaban comprendidos en el rango de edad entre 31 y 45 años ( $p=0,014$ , OR: 4,39, IC: 1,27-15,13). No encontramos una razón específica para la detección de virus con tropismo dual en pacientes con edades entre 31 y 45 años, solo podríamos argumentar que, debido a que se conoce que los virus con tropismo R5X4 son un paso intermedio en el cambio de tropismo de R5 a X4, los pacientes que portan este tipo de virus podrían estar en un rango de edad intermedio. Para el resto de las variables epidemiológicas no se presentaron diferencias significativas teniendo en cuenta el fenotipo viral. En un estudio realizado por Guo y cols., en 99 pacientes no tratados, residentes en Jiaying China, de los cuales el 78,8 % eran del sexo masculino y la media de la edad era de 35 años, no encontraron diferencias significativas entre dichas variables y el uso del correceptor (116). Kourí y col., en el 2016 (95), tampoco observaron diferencias significativas entre las variables epidemiológicas (incluidas la edad, el sexo, la orientación sexual) y el uso del correceptor, no siendo así para el tiempo de diagnóstico, donde el 70,6 % de los pacientes con reciente diagnóstico presentaban virus R5.

**Tabla 19. Relación del fenotipo viral con las variables epidemiológicas de los pacientes estudiados.**

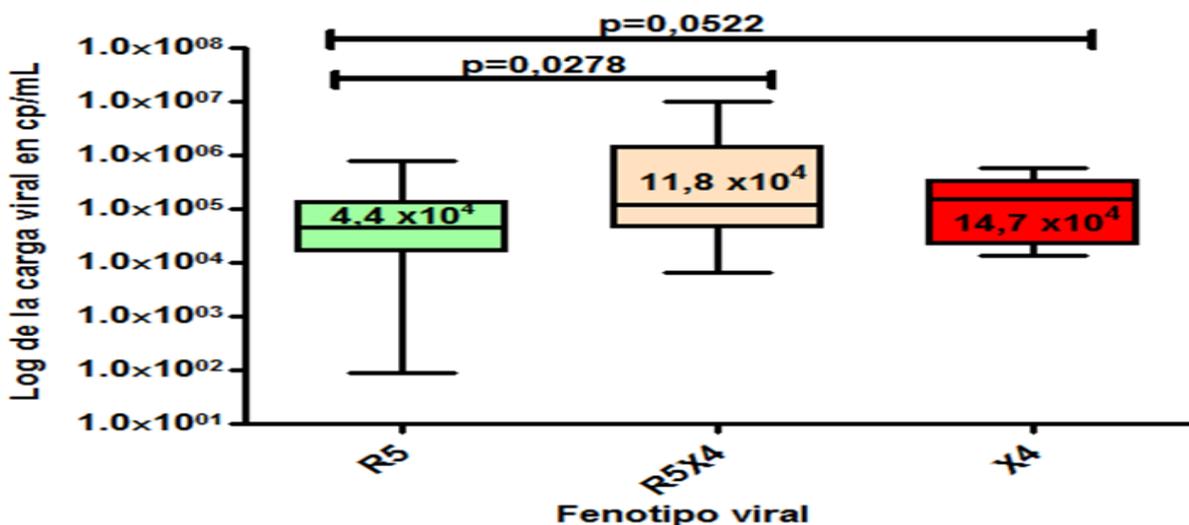
Datos del paciente	Predicción del fenotipo viral											
	Tratados						No tratados					
	R5	(%)	R5X4	%	X4	%	R5	%	R5X4	%	X4	%
	23	100	6	100	7	100	21	100	8	100	4	100
<b>Rango de edad</b>												
15-30	4	17,39	1	16,67	2	28,57	9	42,86	2	25,00	0	0,00
31-45	7	30,43	4	66,67	2	28,57	7	33,33	5	62,50	0	0,00
46-60	11	47,83	1	16,67	3	42,86	5	23,81	1	12,50	2	50,00
> 60	1	4,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	50,00
<b>Región de residencia</b>												
La Habana	19	82,61	4	66,67	7	100,00	13	61,90	6	75,00	3	75,00
Occidente (excluida La Habana)	1	4,35	0	0,00	0	0,00	4	19,05	0	0,00	1	25,00
Centro	1	4,35	2	33,33	0	0,00	3	14,29	1	12,50	0	0,00
Oriente	2	8,70	0	0,00	0	0,00	1	4,76	1	12,50	0	0,00
<b>Sexo Masculino</b>	22	95,65	4	66,67	6	85,71	17	80,95	8	100,00	0	0,00
<b>Orientación sexual HSH</b>	18	78,26	4	66,67	6	85,71	13	61,90	6	75,00	0	0,00
<b>Años de diagnóstico de VIH</b>												
≤ 1 año (Diagnóstico reciente)	1	4,35	1	16,67	0	0,00	18	85,71	6	75,00	3	75,00
> 1-3 años	3	13,04	1	16,67	1	14,29	3	14,29	2	25,00	1	25,00
> 3-5 años	1	4,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 5-10 años	5	21,74	1	16,67	2	28,57	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 10 años	13	56,52	3	50,00	4	57,14	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<b>Sida al diagnóstico de VIH</b>	3	13,04	1	16,67	0	0,00	3	14,29	1	12,50	0	0,00
<b>Sida actual</b>	12	52,17	4	66,67	5	71,43	3	14,29	1	12,50	0	0,00
<b>Evolución a sida después del diagnóstico de VIH</b>												
≤ 1 año	6	26,09	4	66,67	1	14,29	3	14,29	1	12,50	0	0,00
1-3 años	2	8,70	0	0,00	2	28,57	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 3 años	4	17,39	0	0,00	2	28,57	0	0,00	0	0,00	0	0,00
No sida	11	47,83	2	33,33	2	28,57	18	85,71	7	87,50	4	100,00

Como se observa en la Tabla 20, del total de pacientes que tenían CV disponible (61/69), 24 fueron clasificados como R5X4/X4, siendo 3,9 veces más probable que los pacientes infectados con estos fenotipos virales tuvieran CV superior a las 100 000 copias/mL ( $p=0,012$ , OR: 3,93, IC: 1,32-11,67). Además, al examinar las medianas de las cargas virales (Figura 11) con relación al fenotipo viral se observaron mayores valores de CV para el fenotipo R5X4 y X4, siendo esta diferencia significativa para los virus R5X4 ( $p=0,0278$ ). Sin embargo al analizar por separado pacientes tratados y no tratados no se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

Usualmente, se define que los virus R5 tienen una baja capacidad replicativa con velocidad de replicación lenta (conocidos como slow/low), con valores de CV bajos y no son inductores de sincicios. Estos virus predominan en la etapa más temprana de la infección y se han asociado con una progresión lenta a sida. Lo contrario se refiere para los virus R5X4 o X4,(117) que tienen mayor capacidad replicativa, son inductores de sincicios y por tanto exhiben mayores niveles de CV y bajos conteos de células TCD4<sup>+</sup> (85), lo que coincide con los hallazgos mostrados en este estudio.

**Tabla 20. Relación del fenotipo viral con la carga viral y el conteo de CD4 de los pacientes.**

Características clínicas	Predicción del fenotipo viral												Total	%
	Tratados						No tratados							
	R5	(%)	R5X4	%	X4	%	R5	(%)	R5X4	%	X4	%		
	23	100	6	100	7	100	21	100	8	100	4	100	69	100
<b>Carga viral en copias/mL</b>														
< 1000	1	4,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	1,45
1000-10000	3	13,04	0	0,00	0	0,00	3	14,29	1	12,50	0	0,00	7	10,14
> 10000-100000	8	34,78	2	33,33	4	57,14	11	52,38	1	12,50	1	25,00	27	39,13
> 100000	7	30,43	4	66,67	2	28,57	4	19,05	6	75,00	3	75,00	26	37,68
Desconocido	4	17,39	0	0,00	1	14,29	3	14,29	0	0,00	0	0,00	8	11,59
<b>Conteo de CD4 en células/mL</b>														
< 200	9	39,13	5	83,33	4	57,14	3	14,29	1	12,50	0	0,00	22	31,88
200-500	8	34,78	1	16,67	2	28,57	7	33,33	3	37,50	1	25,00	22	31,88
> 500	3	13,04	0	0,00	0	0,00	7	33,33	2	25,00	1	25,00	13	18,84
Desconocido	3	13,04	0	0,00	1	14,29	4	19,05	2	25,00	2	50,00	12	17,39

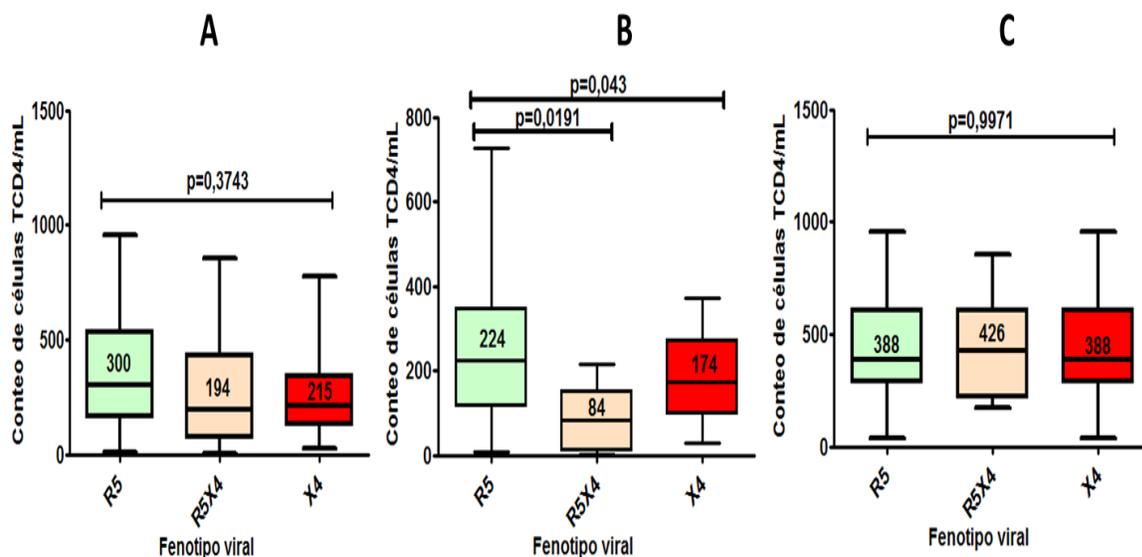


**Figura 11. Mediana de los valores de CV estratificada acorde al uso del correceptor**

A pesar de que las medianas del conteo de CD4 fueron superiores en los pacientes infectados con virus R5, la diferencia no fue significativa al estudiar el total de muestras con CD4 disponible (Figura 12 A). En el estudio realizado por Guo y cols, en pacientes chinos, no tratados, al asociar la media del conteo de CD4 con el tropismo, no observaron diferencias significativas entre los pacientes con virus R5 con los que portaban variantes X4 (116). En la presente investigación, al analizar los pacientes tratados se observan valores significativamente inferiores en aquellos que portaban virus R5X4 comparados con los que tenían virus R5. Al estratificar el conteo de células

TCD4<sup>+</sup>, se observó que, en los pacientes tratados, el 83,3 % y el 57,14 % de los infectados con virus R5X4 y X4, respectivamente, tenían conteos celulares por debajo de 200 células (Figura 12 B y Tabla 20).

Las variaciones de los recuentos de células TCD4<sup>+</sup> en el tiempo se considera un predictor central de la progresión de la enfermedad, la muerte y el inicio del tratamiento y es utilizado por OMS para definir estadificación de la enfermedad (40). Aunque la replicación del virus y por consiguiente la CV es el motor que impulsa la progresión a sida, el recuento de células TCD4<sup>+</sup> es el marcador más útil para predecir el riesgo inmediato de desarrollar determinadas infecciones oportunistas. En un estudio realizado por Garrido y col, en el cual se incluyeron 150 muestras de plasma de pacientes seropositivos españoles, se observó la alta prevalencia de virus X4 entre pacientes tratados y con conteo de células TCD4<sup>+</sup> inferior a las 200 células.(34). Maartens y cols., en una actualización de la historia natural y patogenia de la infección por VIH-1 refieren que el conteo de células TCD4<sup>+</sup> en sangre es dinámico; ya que en la infección aguda ocurre una reducción de los mismos, seguido de una recuperación de la concentración y finalmente hay una disminución progresiva si no se trata la infección por VIH-1 (118).



**Figura 12. Mediana de los valores de CD4<sup>+</sup> estratificada acorde al uso del correceptor. A: Todos los pacientes, B: Pacientes tratados y C: Pacientes no tratados.**

Al analizar la relación entre los subtipos detectados en el presente estudio (en el gen *env*, *pol*, así como de manera global) con las variables epidemiológicas, se observaron algunas asociaciones significativas. Como se muestra en la Anexo 3, los recombinantes CRF\_BG (teniendo en cuenta el

subtipo detectado en *env*) fueron más frecuentes en pacientes que se encontraban en las edades comprendidas entre 15 y 30 años (8/17, 47,06 %,  $p=0,023$ , OR: 3,73, IC: 1,15-12,10) y que tenían diagnóstico reciente de la infección por VIH, con relación a los otros subtipos (12/17, 70,59 %,  $p=0,006$ , OR: 4,94, IC:1,50-16,29). Por el contrario, el subtipo B fue significativamente menos frecuente en pacientes con infección reciente (7/26, 26,92 %,  $p=0,048$ , OR: 0,35, IC: 0,12-1,00). Esto coincide con lo planteado anteriormente sobre el incremento de las formas recombinantes BG, a expensas de la disminución del subtipo B en pacientes recién infectados (51).

El subtipo C (al analizar el gen *env*), fue significativamente más frecuentes entre pacientes del sexo femenino comparado con el resto de los subtipos (2/5 de Subtipo C vs 6/64 con otros subtipos,  $p=0,039$ , OR: 6,44, IC: 0,89-46,52) (Anexo 4).

Cerca de la mitad de la infección global de VIH es causada por cepas del subtipo C, el cual es el más predominante entre los nueve subtipos puros de VIH y las numerosas URFs y CRFs (119). Esta variante viral se introdujo en Cuba desde el inicio de la epidemia de VIH, en 1986 y en sus inicios estuvo vinculada a individuos heterosexuales que se infectaron en África y probablemente se ha mantenido circulando en alguna medida entre este grupo de pacientes (120, 121). Varios estudios de África muestran elevada prevalencia de subtipo C en ese continente, incluida la elevada prevalencia entre mujeres (104). Por otro lado, este virus también estuvo asociado con sida actual (en *pol* 5/6 pacientes,  $p=0,015$ , OR: 10,29, IC: 1,11-95,14 y en *env* 4/5 pacientes  $p=0,035$ , OR: 8,19, IC: 0,86-77,90), lo cual es de esperar, ya que como se ha referido anteriormente en su mayoría, eran pacientes tratados y con más de 10 años de diagnóstico de infección con VIH (Anexos 3 y 4). Previamente se describió, en la presente investigación, que el subtipo C estuvo asociado al fenotipo X4 del virus, lo cual se justifica por las características epidemiológicas que tenían estos pacientes y la evolución natural de la infección por VIH.

El 85,71 % (6/7) de los pacientes infectados con el virus recombinante CRF18\_cpx (en el gen *pol*) tenían diagnóstico reciente de la infección ( $p=0,015$ , OR: 10,10, IC: 1,12-90,45) (Anexo 3). Como se ha descrito en varios artículos y se discutió previamente en esta investigación, las formas recombinantes del VIH-1, particularmente las CRF\_BG y CRF19\_cpx se han detectado cada vez con más frecuencia en Cuba, así como las URF (51, 52) debido tanto a la propagación de la

epidemia como la continua generación de nuevas formas recombinantes únicas en zonas donde circulan diferentes variantes genéticas (122). El virus CRF18\_cpx, se ha mantenido en cuarto lugar de frecuencia durante muchos años (51, 52) y en el presente estudio comprobamos que estuvo casi exclusivamente formando parte de las URF (al analizar el subtipo global), indicando que la recombinación del CRF18\_cpx con otro virus podría representar una ventaja evolutiva facilitando las nuevas infecciones por VIH en el país.

Como se describe en la Anexo 3, el virus CRF19\_cpx (en el gen *pol*) se asoció con la orientación sexual HSH (7/14 CRF19\_cpx vs 11/44 de otros subtipos, 50 %,  $p= 0,050$ , OR: 0,29, IC: 0,083-1,03). La epidemia de VIH se ha caracterizado, de manera general, por un predominio de la conducta sexual HSH, entre los individuos infectados (13). Sin embargo se han observado diferencias en la distribución de los subtipos en relación con la orientación sexual. Los subtipos A, F, G, H que circulan en Cuba, se han asociado a la orientación sexual heterosexual, debido al origen africano de estos subtipos, que se introdujeron en el país a partir de personal cubano, fundamentalmente militares, que estuvieron colaborando en África entre las décadas del 70 y el 80 del siglo pasado (123-125). Por el contrario, el subtipo B, generalmente se ha asociado a orientación sexual HSH, lo que ha sido observado en varios estudios (123-125). La mayoría de los estudios también han descrito una mayor frecuencia de los virus CRF19\_cpx y CRF\_BG entre los HSH, aunque las diferencias no han sido significativas, como se observa en la presente investigación para el CRF19\_cpx. Habría que explorar si este virus se encuentra formando algún cluster de transmisión, aunque acorde a los datos epidemiológicos recogidos, los pacientes no estaban relacionados. No se encontró asociación con ninguna otra variable epidemiológica. Otros estudios también han referido la distribución de determinados subtipos entre personas con conductas específicas de riesgo. González-Domenech y cols., reportaron la emergencia de un brote de CRF19\_cpx en hombres españoles jóvenes, recién diagnosticados con VIH, todos ellos con orientación sexual HSH (98). Otro estudio publicado en 2019, también de individuos españoles HSH infectados con VIH, demostró la presencia de variantes no B, agrupadas en cinco clúster que incluían 10 o más individuos (dos clúster diferentes de subtipo F1 y uno de cada una de las variantes CRF02\_AG, A1 y C), demostrando que la epidemia de VIH entre HSH españoles se ha diversificado, con la expansión de variantes no B (126). Otro estudio en Alemania describió

un incremento en la circulación de subtipo A entre HSH y de subtipo C entre heterosexuales usuarios de drogas intravenosas (127).

**Tabla 21. Relación entre el rango de edad con los años de diagnóstico y el estadio de sida entre los pacientes estudiados.**

Variables epidemiológicas	Rango de edad							
	15-30	%	31-45	%	46-60	%	> 60	%
	18	100	25	100	23	100	3	100
<b>Años de diagnóstico de VIH</b>								
≤ 1año (Diagnóstico reciente)	12	66,67	9	36,00	7	30,43	1	33,33
> 1-3 años	3	16,67	4	16,00	3	13,04	1	33,33
> 3-5 años	0	0,00	1	4,00	0	0,00	0	0,00
> 5-10 años	3	16,67	4	16,00	1	4,35	0	0,00
> 10 años	0	0,00	7	28,00	12	52,17	1	33,33
<b>Sida actual</b>	1	5,56	7	28,00	16	69,57	1	33,33

Adicionalmente se encontraron algunas diferencias estadísticas entre los pacientes estudiados, no directamente relacionadas con el subtipo o tropismo viral (Tabla 21. Los pacientes con edades entre 46-60 años, estuvieron relacionados con tener más de 10 años de diagnóstico, (12/23, 52,17 % p=0,003, OR: 5,18, IC: 1,69-15,85) y sida al momento del estudio (16/23, 69,57 %, p=0,000, OR: 9,37, IC: 2,97-29,64). Por el contrario, los individuos en los rangos de edades de 15-30 años se asociaron con diagnóstico reciente (12/18, 66,67 %, p=0,014, OR: 4,0, IC: 1,27-12,50) y con no tener sida al momento de la toma de la muestra (1/18, 5,56 % p=0,002, OR: 0,066, IC: 0,008-0,53). Esto se justifica por la evolución de la infección con VIH, donde se plantea que en un período de 8 a 10 años los pacientes progresan a sida (109). El empleo de la terapia ARV ha modificado la historia natural y evolución de la infección, no obstante hay un grupo de pacientes que desarrollan fallo a la terapia por diversas causas (mala adherencia, resistencia ARV, entre otras) y que pueden evolucionar a sida (128). Los pacientes tratados, incluidos en la presente investigación, habían recibido múltiples regímenes de terapia y se incorporaron al estudio de tropismo para evaluar la factibilidad del empleo de Maraviroc, por ello es más probable que este grupo esté incluido en los de mayor edad, más tiempo de diagnóstico y estén en la etapa de sida. La relación de los pacientes jóvenes con aquellos que tienen diagnóstico reciente y que no tienen sida, también se justifica por lo referido respecto a la evolución y curso clínico de la infección con VIH (40) y evidencia que en Cuba, la edad de adquisición de la

infección predomina entre los individuos jóvenes y que el diagnóstico se realiza por lo general en etapas tempranas de la infección con VIH (13).

Al comparar los valores de CV entre los diferentes subtipos virales, teniendo en cuenta la variante detectada al secuenciar el gen *env* (Figura 13A), *pol* (Figura 13B) y en el análisis del subtipo global (Figura 13C), se observaron diferencias en los valores de CV entre los subtipos, demostrándose cifras de CV significativamente superiores para los virus CRF19\_cpx, comparado con los otros virus ( $p \leq 0,05$ ), tanto en *pol*, en *env*, como en el análisis del subtipo global. Por otro lado, el subtipo B fue el que mostró valores más bajos de CV, demostrándose diferencias significativas con relación a los otros subtipos. Al estratificar los valores de CV por rangos (Anexo 6), se observa que los virus del Subtipo B mostraron valores bajos de CV (rango de 1000-10 000 copias/mL, al analizar el gen *pol* ( $p = 0,0000$ , OR: 0,0071, IC: 0,000-0,075).

En un estudio previo de progresión rápida a sida publicado por Kourí y cols., utilizando también muestras de VIH de pacientes cubanos, se compararon los subtipos B y CRF20-23-24\_BG con el CRF19\_cpx, revelando que los pacientes infectados con este último tenían mayores niveles de CV al diagnóstico de VIH, mientras que al momento de la toma de la muestra la diferencia se observó solo al comparar con los CRF\_BG (20, 23, 24) (14). Esto coincide con los resultados observados en este estudio, con respecto a la mayor CV del CRF19\_cpx comparada con los otros subtipos, es especial con el subtipo B.

La alta CV del CRF19\_cpx, quizás resultante de la alta replicación viral podría apoyar la hipótesis de que esta variante viral tiene mayor capacidad replicativa, que es un rasgo distintivo de los virus que utilizan el correceptor CXCR4. Kourí y cols., llegaron a la conclusión de que estos virus presentan una alta adecuación evolutiva, lo que permite que se repliquen de manera eficiente activando la respuesta inmune, lo que a su vez incrementa los niveles de RANTES, esta quimiocina (ligando natural del CCR5) bloqueando el correceptor de entrada CCR5, promoviendo el cambio del virus R5 a X4, explicando potencialmente la rápida progresión a sida.

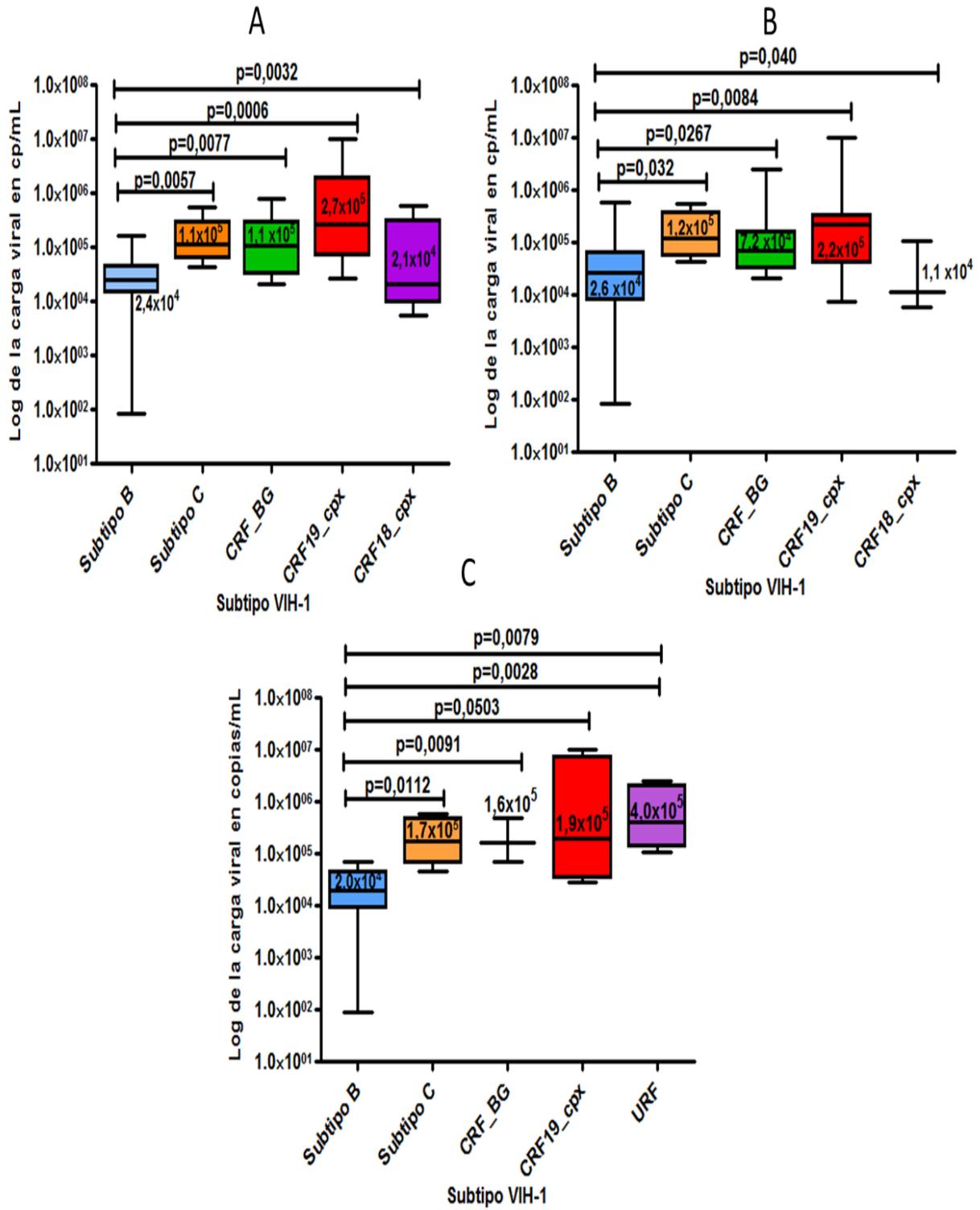


Figura 13. Comparación de los valores de carga viral según la variante viral detectada en la región del gen *pol* (A), en el gen *env* (B) y en el subtipo global (C) de las muestras estudiadas.

## **5.5 Mutaciones en las regiones V2 y V3 de la proteína de envoltura gp 120, en las secuencias cubanas de VIH-1.**

Está bien establecido que, para que ocurra la entrada del VIH a la célula hospedera, la gp 120 viral debe primero unirse a dos receptores celulares: la molécula CD4 y a uno de los dos correceptores (CCR5 y CXCR4) (33).

El lazo V3 de la gp 120 es un componente esencial del sitio de unión al correceptor y es el principal determinante del tropismo viral, es una región altamente inmunogénica y está íntimamente relacionada con la infectividad viral (129). En contraste V2, aunque también forma parte del sitio de unión al correceptor, no es esencial para la infectividad viral, pero participa en varias funciones de *Env*: proporciona un motivo que se une a las integrinas  $\alpha 4\beta 7$  (receptor involucrado en la persistencia del virus en la mucosa intestinal), también contribuye a la formación del trímero de la gp 120 y se ha demostrado que cambios en la longitud de V2 y en los patrones de glicosilación facilitan al virus escapar de la neutralización de los anticuerpos específicos para V3 y células TCD4<sup>+</sup> (5).

Las mutaciones del lazo V3 se han reportado como las más importantes para definir el uso del correceptor, sin embargo, se ha reconocido que también se requieren mutaciones adicionales en las regiones de V1/V2 y C4 para el cambio del tropismo (122).

### **5.5.1 Mutaciones en el lazo V3**

La región del lazo V3 tiene una longitud de 35 aminoácidos y abarca desde las posiciones 297 a 331 de la gp 120 de VIH. Aunque la secuencia aminoacídica de V3 es altamente variable, por lo general la longitud de esta región es conservada. De hecho, es la región menos variable entre las regiones variables del gen *env* (129). Como se observa en el anexo 7 la mayoría de las secuencias analizadas en la presente investigación mantienen los 35 aminoácidos. Solo dos secuencias (Subtipo C y B, respectivamente) presentaron inserciones de los aminoácidos G e I entre las posiciones 14 y 15 del lazo V3 (309-312 de la gp 120), mientras que otras cuatro presentaron delecciones en la posición 24 (tres CRF19\_cpx y un CRF18\_cpx).

En la presente investigación se observó alta concordancia para las 44 muestras clasificadas como R5 por el programa de predicción del fenotipo viral a partir del genotipo (G2P), al compararlo con el análisis mediante el cálculo de la carga neta (43/44, 97,73 %), así como con la regla 11/25 (100 %). También se aprecia correspondencia parcial para las 12 muestras clasificadas como X4

con el programa G2P, al compararlo con el análisis mediante el cálculo de la carga neta (6/12, 50 %), así como con la regla 11/25 (7/12, 58,33 %). Sin embargo esta correlación falló al analizar las muestras con tropismo dual, ya que según la regla 11/25 todas se clasificaron como virus R5 y mediante la carga neta, 13/14 fueron también consideradas como R5. Al analizar estas variables con relación al subtipo, se observó que para todos los virus del subtipo B clasificados como R5 o X4 se cumplen las reglas antes mencionadas con relación al tropismo, no siendo así para los otros subtipos. En un estudio realizado por Garrido y col., se observó que la herramienta genotípica G2P, presentaba una buena sensibilidad para inferir el tropismo X4 en los virus del subtipo B, pero tuvo una mala especificidad para los subtipos no B, además mostró una sobreestimación de los virus con tropismo X4 para los subtipos no B, siendo estos resultados coincidentes con los obtenidos en esta investigación (34). Al inicio de la epidemia mundial se infirió que el subtipo predominante era el B, ya que los estudios de secuencias virales generalmente se realizaban a partir de muestras del continente americano o europeo. Por ello, los algoritmos creados para el análisis del uso del correceptor se basan fundamentalmente en las características de este subtipo, por lo que la sensibilidad y la especificidad para el mismo son mayores comparadas con las observadas para los subtipos no B (53).

Como se muestra para el subtipo B del VIH-1, el bucle V3 también parece ser el principal determinante genético en la elección del correceptor en los subtipos D y A. En estudios más recientes, las cepas del subtipo C que usaban el CXCR4 no muestran la misma dependencia que otros subtipos en los residuos cargados positivamente en el bucle V3 (130, 131).

Aún más, estudios recientes sobre los subtipos C, D, CRF01 y CRF02 indican que las reglas podrían diferir, dependiendo del subtipo. Las distribuciones de los correceptores entre los diferentes subtipos de VIH-1 también difieren considerablemente (107, 132). La enfermedad progresa más rápidamente en pacientes con una infección de subtipo D, tal vez debido a la alta prevalencia de cepas con tropismo X4 y poblaciones de virus mixtos (108, 109), lo cual está en concordancia con los hallazgos reportados en el presente estudio, así como en otros estudios del virus CRF19\_cpx de Cuba (14). Por lo tanto, es esencial predecir con exactitud el tropismo, tanto para el inicio de la terapia con inhibidores de CCR5, como para los estudios de patogenia. El empleo de métodos fenotípicos, podría constituir una de las herramientas que permitirían confirmar el tropismo viral (96).

La comparación de las secuencias aminoacídicas del lazo V3 entre las 69 muestras mostró diferencias significativas entre los diferentes subtipos (Anexo 7). El aminoácido Histidina (H) en la posición 13 fue mucho más frecuente en el subtipo B (11/26, 42,30 %) ( $p=0,0416$ , OR: 4,60, IC: 1,00- 21,42) y en el CRF18\_cpx (3/3) ( $p=0,0088$ , OR: 43,40, IC: 1,68- 1119,71), comparado con el CRF\_BG (2/17, 11,76 %). Por el contrario, la R fue más prevalente en esa posición en las CFRs CRF19\_cpx (9/18, 50 %) ( $p=0,0001$ ), CRF\_BG (13/17) ( $p<0,00001$ ) y en el subtipo C (4/5, 80 %) ( $p=0,0002$ ), mientras que ninguna muestra del subtipo B tenía este aminoácido ( $p=0,0001$ ).

La R en la posición 18 (23/26, 88,46 %) se detectó con más frecuencia en el subtipo B comparado con los recombinantes, que en esta posición tenían principalmente glutamina (Q): CRFs\_BG 17/17, CRF18\_cpx 3/3 y CRF19\_cpx 16/18, ( $p<0,00001$ ). Adicionalmente, los virus CRF19\_cpx tenían V en la posición 12 (16/18, 88,9 %) y 19 (15/18, 83,3 %) en contraste a la I y la A detectadas en estas posiciones, respectivamente, para casi todas las muestras de las otras variantes virales analizadas, excepto el subtipo C. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ). El subtipo C en la posición 12 tenía V en 3/5 (60 %) muestras y en la posición 19, mostró diferentes aminoácidos.

Se identificaron aminoácidos característicos del CRF19\_cpx en el lazo V3 (V12, R/H13, Q18, V19), los que fueron significativamente más frecuentes en esta variante viral, en comparación con el subtipo B. También los CRFs\_BG 20-23-24 tenían estas mutaciones en las posiciones 13 y 18 en comparación con el subtipo B ( $p <0,0001$ ). Los CRF\_BG (20, 23, 24), presentaron diferencias significativas con el resto de los subtipos en cuanto a la presencia de la A en la posición 22 ( $p=0,009$ ; OR: 7,86; IC: 1,36-45,52).

Estos polimorfismos específicos de los diferentes subtipos coinciden con los hallazgos publicados recientemente en secuencias cubanas, donde se observó un patrón de mutaciones para cada uno de los diferentes virus que circulan en Cuba (95). Otros investigadores también han informado previamente la asociación entre algunas variantes virales y determinadas mutaciones del lazo V3. Zhang y cols., en 2014 encontraron que la mutación E25R/Q/N fue la más frecuente entre los subtipos C, B y CRF07\_BC.(133).

Se observó que, en la punta del bucle V3 de los subtipos No-B del presente estudio, fue más prevalente la secuencia aminoacídica GPGQ (88,37 %, 38/43 muestras,  $p <0,0001$ ), mientras que

en los subtipos B predominó el motivo GPGR (88,46 %, 23/26 muestras), lo que coincide con estudios anteriores realizados en muestras cubanas (82). Un estudio publicado en el 2010 (134) sobre la variabilidad del bucle V3 comenta que la secuencia aminoacídica GPGR es frecuentemente encontrada en el subtipo B del VIH-1, mientras que la GPGQ predomina entre todas las demás cepas del VIH-1 (134).

Ellos establecen una comparación entre secuencias del lazo V3 de pacientes franceses y brasileños y encuentran que el motivo GPGR fue predominante en pacientes franceses y menos frecuentes en pacientes brasileños, los que mostraron una mayor diversidad en la punta del bucle V3. Además exponen que se ha identificado una variante del subtipo B (B-Br) con el motivo GWGR en una alta proporción de pacientes infectados con el subtipo B en Brasil y que ha sido reconocida como predominante en varios estudios. En esta investigación solo se identificó un paciente del subtipo B (CU065-18) que presentaba dicha variante B-Br (135).

Un estudio realizado en España en el 2014, donde describen el predominio de virus CRF14\_BG con tropismo CXCR4 entre pacientes recién diagnosticados, refieren que las mutaciones T13, M14, V19 y W20, fueron identificadas mayoritariamente en este recombinante, comparado con el subtipo B (136). Sin embargo, en los virus CRF\_BG secuenciados en la presente investigación, no se observó el patrón descrito para el CRF14\_BG. Vale la pena recalcar que en la región *env* (específicamente V3) el CRF14\_BG contiene el subtipo B, mientras que los CRF\_BG (20, 23, 24) (descritos en Cuba) contienen el subtipo G en este gen, por lo que es de esperar que los patrones de mutaciones sean diferentes entre estos recombinantes BG.

Se ha descrito que las secuencias de V3 varían considerablemente entre las diferentes cepas y subtipos virales y esta variabilidad es más pronunciada en la corona del lazo V3 (14 aminoácidos en el medio de V3). No obstante, existen regiones conservadas que están relacionadas con la importante función de V3 como elemento del sitio receptor de quimiocinas (CCR5 y CXCR4), facilitando la entrada del virus a la célula (8).

Estas regiones conservadas son consideradas blancos potenciales para el diseño de inmunógenos que sean capaces de generar una respuesta amplia y cruzada de anticuerpos neutralizantes frente a diferentes cepas virales. Es por ello que el reconocimiento de las regiones que son específicas de cada variante viral y las regiones conservadas del lazo V3 reviste gran

importancia, específicamente para el diseño de candidatos vacunales cubanos, donde habría que tener en cuenta la variabilidad de los subtipos, CRF y URF que circulan en el país.

### 5.5.2 Mutaciones en el lazo V2 de la gp 120

La región variable V2, también juega un papel crucial en el enmascaramiento de los epítomos neutralizantes de la gp 120. Los cambios en la longitud de V2 y en los patrones de glicosilación favorecen el escape del virus a la respuesta inmune mediada por anticuerpos específicos para V3 (129). La región V2 es variable tanto en la secuencia de aminoácidos como en la longitud, siendo mucho más variable que V3. V2 es inmunogénica en el 20–45 % de las personas infectadas con VIH, en contraste con V3 que induce respuesta inmune en casi el 100 % de los individuos infectados. El lazo V2 comienza justo al terminar V1, tiene una longitud promedio de 39 a 40 aminoácidos y abarca desde las posiciones 158 hasta la 196 de la gp 120 de VIH. V2 está limitada por puentes de cisteína y la región hipervariable comprende desde la posición D185 hasta la S190, donde se observan múltiples inserciones(129).

En 40 (57,97 %) de las 69 secuencias del gen *env* se pudo analizar, además de la región V3, la región variable V2 (Anexo 8). La longitud de las secuencias varió entre las muestras estudiadas, siendo la de menor longitud la CU051-18 (37 aminoácidos, subtipo B, tropismo R5X4) y la de mayor longitud la CU066-18 (46 aminoácidos, CRF\_BG, tropismo R5). El promedio de la longitud de las secuencias fue 40,05 aminoácidos con múltiples deleciones e inserciones, particularmente en la región hipervariable (Anexo 8).

Similar a lo observado para V3, se observan algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos, relacionadas al subtipo viral. En la posición 164 fue más frecuente observar el aminoácido E entre los virus recombinantes CRF19\_cpx, CRF\_BG y CRF18\_cpx (15/18, 83,33 %  $p=0,001$ , OR: 10,71, IC: 2,32-49,49) comparado con los subtipos (B y C), en los que se observó una variedad de diferentes aminoácidos en esta posición: G, M, R, D, Triptófano (W) y E.

En la posición 165 fue más frecuente observar el aminoácido Leucina (L) entre los virus recombinantes CRF19\_cpx, CRF\_BG y CRF18\_cpx (10/18, 55,56 %  $p= 0,001$ , OR: 12,50, IC: 2,23-70,19) comparado con los subtipos puros que también presentaban una variedad de aminoácidos: V, M, R, I y L. En la posición 169, los recombinantes CRF19\_cpx y CRF\_BG (11/17, 60 %,  $p=0,0002$ , OR: 19,25, IC: 3,32-111,75) tenían con mayor frecuencia el aminoácido K, a diferencia de los otros subtipos.

En la posición 195 se observó con más frecuencia el aminoácido N entre los virus recombinantes CRF19\_cpx, CRF\_BG y CRF18\_cpx (16/18, 88,89 %  $p < 0,001$ , OR: 36,00, IC: 5,80-223,54) comparado con los subtipos B (3/19, 15,79 %) y C (1/3, 33,33 %)

No existen estudios anteriores de Cuba donde se hayan comparado las secuencias de V2 entre diferentes variantes virales, por lo que este sería el primer análisis que detalla la secuencia de V2 en muestras cubanas. Similar a lo observado para V3, se detectaron patrones de aminoácidos, específicos de subtipos, sin embargo en V2, se observó además mayor variación entre las secuencias aminoacídicas y en la longitud de las mismas.

La alta variabilidad observada en el lazo V2 del presente estudio, tanto en los patrones aminoacídicos, como en la presencia de múltiples deleciones e inserciones coincide con lo reportado en la literatura que afirma que el lazo V2 es una región más variable que V3, probablemente porque esta variabilidad no afecta la infectividad viral (8).

Dentro del genoma de VIH existen varios tipos de mutaciones que incluyen las sustituciones de nucleótidos, las inserciones y las deleciones (137). Mientras que los tipos de sustituciones en VIH-1 han sido bien caracterizadas y específicamente en el gen *env*, se le ha prestado menos atención a las inserciones y a las deleciones de las secuencias (138).

En estudios comparativos, Wood y cols., reportaron que las inserciones y deleciones se acumulan preferencialmente en los lazos variables de gp 120 comparado con el resto de la secuencia de VIH y se ha sugerido que podrían estar relacionadas con la transmisión y el cambio de tropismo (139).

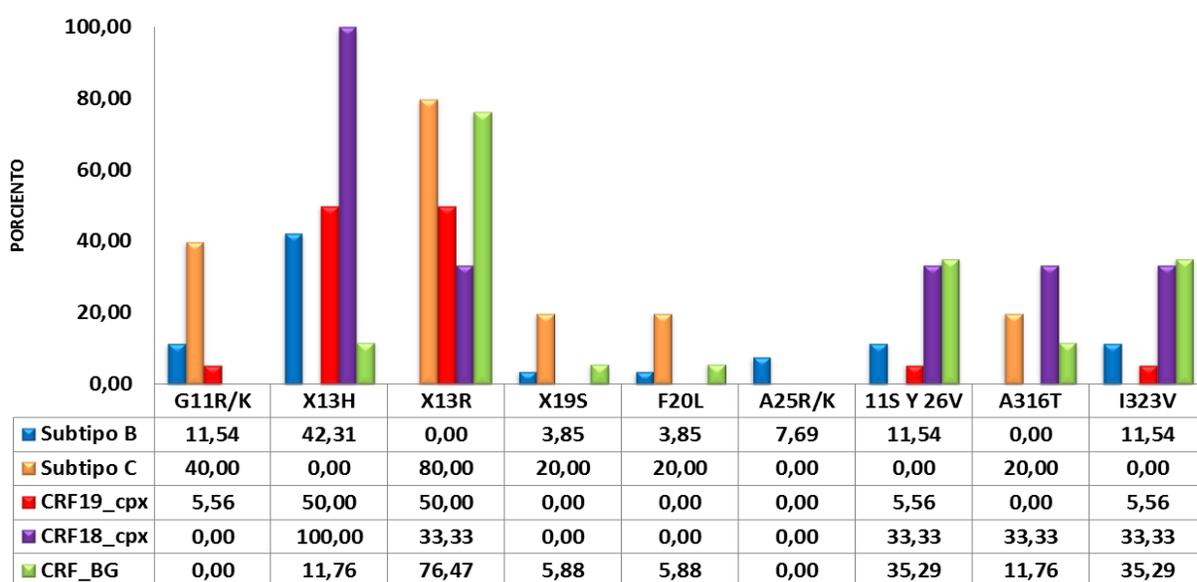
Palmer y Poon quisieron determinar si existía asociación entre la aparición de inserciones y deleciones con el subtipo y estimaron que en los subtipos B y C fueron menos frecuentes de lo esperado. Asumieron que las diferencias en la longitud de las secuencias de los lazos variables pueden ser causadas por una única inserción o deleción que se fije. Observaron que V1, V2 y V4, tienden a presentar mayor número de inserciones y deleciones independientemente del subtipo, mientras que V3 y V5 tienden a contener menor cantidad de inserciones y deleciones. Esto coincide con lo observado en el presente estudio para V2 y V3 (Anexos 7 y 8) (138).

### **5.5.3 Mutaciones en V2 y V3 asociadas a cambio de tropismo y resistencia a MVC**

Se han descrito dos mecanismos principales que contribuyen a la emergencia de la resistencia a MVC. La selección de cepas minoritarias X4 o R5X4 que no son inhibidas por los antagonistas de

los correceptores y la adquisición de la habilidad de los virus R5 de interactuar con la conformación del correceptor CCR5 unido a MVC. Este último escenario tipifica la genuina resistencia MVC (140).

A pesar de que la resistencia a MVC se encuentra asociada con una gran variedad de cambios aminoacídicos tanto en la gp 120 como en la gp 41, los cambios en el lazo V3 se han identificado como los principales contribuyentes al fenotipo de resistencia a casi todos los agonistas y antagonistas de CCR5 (141). Al analizar las secuencias del lazo V3 de las 69 muestras estudiadas, pudimos observar que, de manera general, 54 (78,26 %), presentaron al menos una mutación asociada a resistencia a MVC. Este porcentaje es muy elevado, teniendo en cuenta que los pacientes no habían recibido terapia previa con MVC (Figura 14).



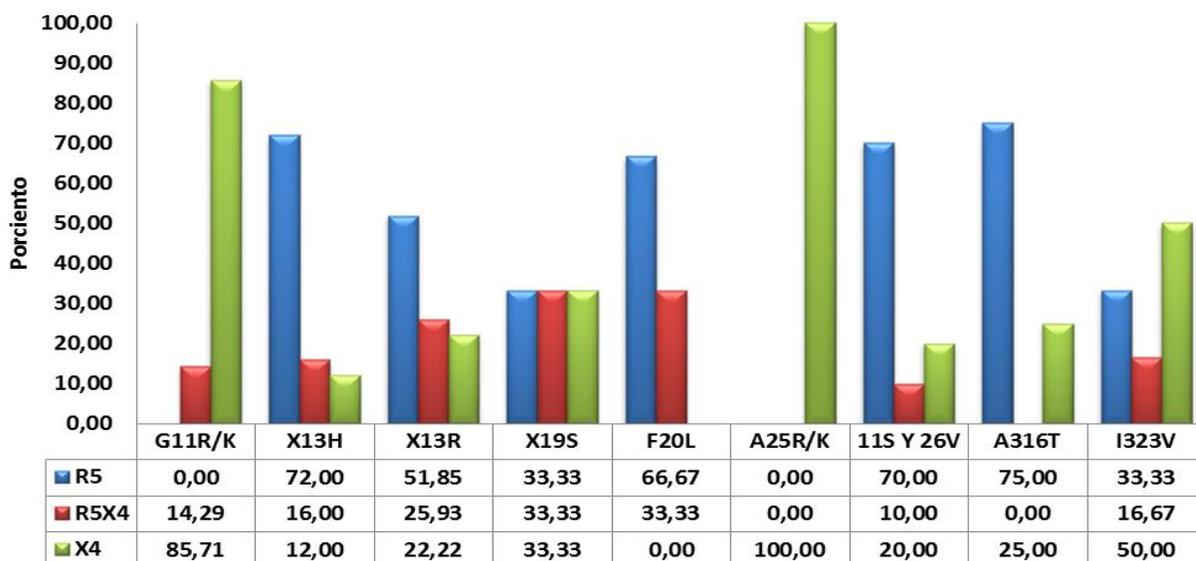
**Figura 14. Mutaciones en el lazo V3 de VIH-1 asociadas a resistencia a MVC, distribuidas acorde al subtipo viral.**

En la presente investigación, la mutación X13H, también denominada P/T308H, (en dependencia de si se tiene en cuenta solo la posición a partir del comienzo del lazo V3 o de la gp 120) se detectó frecuentemente en casi todas las variantes virales estudiadas, excepto en el subtipo C al igual que la I323V, aunque en menor proporción. La mutación A316T también estuvo presente en las muestras de los subtipos no B (excepto en el CRF19\_cpx) (Figura 14). La mutación G11R se detectó en muestras del subtipo B y C ( $p=0,012$  OR: 10,36 IC: 1,15-92,90), mientras que la X13R se observó frecuentemente en las muestras de los subtipos no B ( $p=0,0004$  OR: 32,47 IC: 1,89-

556,37). El cambio de A por K en la posición 25 (A25K) solo se observó en pocas muestras, todas del subtipo B.

Se han descrito, por otros autores, mutaciones asociadas a la resistencia a MVC relacionadas con el subtipo viral. Se ha sugerido que las mutaciones naturales a MVC podrían ser más comunes en el subtipo C que en el subtipo B de VIH-1. El análisis de 65 muestras mostró que 52.3 % (75 % del subtipo C y en el 18.2 % del subtipo B) tenían al menos una mutación asociada con la resistencia MVC (118) Una mutación comúnmente vista fue la A316T en la región gp 120, ocurriendo en 67.8 % de muestras del subtipo C y 18.2 % de las muestras del subtipo B. Además se encontró una alta prevalencia de la mutación A316T, en parejas zambianas de madre-infantes infectadas con subtipo C de VIH-1 (120). Esto coincide con los hallazgos del presente estudio, donde la mutación A316T se observó en los pacientes infectados con los CRF18\_cpx, CRF\_BG y subtipo C, mientras que ninguno infectado con el subtipo B la presentó.

Se han descrito mutaciones variables que pueden ocurrir en el bucle V3 de la gp 120 pero no siempre confieren resistencia completa a MVC (142) y no se ha descrito un patrón característico de mutaciones que pueda ayudar a predecir la resistencia. Las sustituciones de A316T, I323V y A319S se han observado por secuenciación de los aislados primarios de VIH-1 de los subtipos B y G después de pases secuenciales en cultivo (143).



**Figura 15. Mutaciones en el lazo V3 de VIH-1 asociadas a resistencia a MVC, distribuidas acorde al fenotipo viral.**

Al analizar las mutaciones que confieren resistencia a MVC, con relación a predicción del tropismo viral se observaron algunas diferencias (Figura 15). Las muestras que presentaron la mutación X13H, estuvieron asociadas con mayor frecuencia con variantes virales con tropismo R5 ( $p=0,039$ , OR: 2,84, IC: 1,03-7,77). Las mutaciones de las posiciones 11 y 25 se relacionaron con virus con tropismo X4, lo cual es de esperar, ya que estas mutaciones están relacionadas con el cambio de tropismo. Ninguna otra asociación mostró diferencias significativas.

Swenson y cols., al analizar, mediante secuenciación profunda, muestras de plasma de sujetos que experimentaron fracaso del tratamiento, observaron múltiples mutaciones de aminoácidos en la tercera región variable de gp 120 asociadas con cambio de tropismo. Las mutaciones más comunes incluyeron sustituciones de G por R en la posición 11 (G11R), prolina (P) por R en la posición 13 (P13R) y A por K en la posición 25 (A25K) (144). La secuenciación profunda demostró además que la mayoría de estos pacientes tenían algunos virus con tropismo no R5 en el momento de la detección inicial (110). En un estudio de 62 individuos infectados con VIH-1 con fenotipo R5 que habían estado recibiendo MVC durante 10 días, solo dos mostraron la aparición de cepas de VIH-1 con tropismo dual R5X4 (109).

En las muestras estudiadas, 14 de las que tenían estas mutaciones presentaban tropismo R5 y 20, tropismo R5X4/X4. Los pacientes que presentaban los virus con las mutaciones en las posiciones 11 y 25 todos tenían fenotipo X4, como se observa en el alineamiento del lazo V3 del Anexo 7. El presente estudio tiene la limitación de que el proceso de secuenciación llevado a cabo fue con el método de Sanger, donde solo se detectan las variantes mayoritarias, presentes en una proporción superior al 20 %, quizás, si empleáramos la secuenciación profunda, podríamos detectar otras variantes minoritarias con tropismo no R5.

**Tabla 22. Asociación de las mutaciones de resistencia del dominio V3, con tratados y no tratados.**

Mutaciones	Tratados	%	No tratados	%
		36	100,00	33
<b>G11R/K</b>	5	13,89	1	3,03
<b>X13H</b>	15	41,67	10	30,30
<b>X13R</b>	10	27,78	17	51,52
<b>X19S</b>	1	2,78	2	6,06
<b>F20L</b>	2	5,56	1	3,03
<b>A25R/K</b>	1	2,78	0	0,00
<b>11S Y 26V</b>	5	13,89	5	15,15
<b>A316T</b>	2	5,56	2	6,06
<b>I323V</b>	6	16,67	5	15,15

Al relacionar las mutaciones que confieren resistencia a MVC con la exposición previa a terapia ARV, no se encontraron diferencias en la frecuencia de las mismas entre los dos grupos. No obstante se evidenció que la mutación X13R fue más frecuente en pacientes no tratados que en pacientes tratados, 17/33 (51,52 %) ( $p=0,044$ , OR: 2,76, IC: 1,02-7,50), para el resto de las mutaciones descritas no se encontraron diferencias significativas (Tabla 22).

Se han realizado estudios de mutagénesis viral dirigida al sitio de las sustituciones en la posición 316 y la posición 323 de la gp 120 para revertir la mutación al aa que se encuentra en esta posición en el virus salvaje, en los que se recupera la respuesta al ARV, lo que evidencia la importancia de estas mutaciones en la resistencia a esta droga (145). Tilton y colaboradores reportaron que en un paciente resistente a MVC, las mutaciones presentes incluyeron la (P/T308H), T320H e I323V en el bucle V3; D407G y pérdida de un sitio de glicosilación en el residuo 386 en la región V4; y V489I en la región C5( 116 ). La mutación P308H pareció ser la más importante, dando como resultado una resistencia completa al tratamiento con MVC, mientras que las mutaciones H320T y V323I resultaron en una resistencia menor. Adicionalmente, se han referido una serie de mutaciones virales a partir pacientes incluidos en el ensayo clínico MOTIVATE; estas incluyen: G11S + I26V, S18G + A22T, A19S + I26V, I20F + A25D + I26V e I20F + Y21I en la región V3 (146).

Para la región V2 se realizó una extensa búsqueda bibliográfica investigando las mutaciones relacionadas con resistencia a los inhibidores de los correceptores que han sido descritas en diversos estudios. Identificamos la mutación V169M, detectada en cinco muestras del presente estudio (CU008-18, CU035-18, CU998-18, CU1403-18 y CU2484-19), todas del subtipo B y con tropismo CCR5. También se detectó la mutación N192K en otras cinco muestras (CU052-18, CU065-18, CU083-18, CU1706-18, CU3029-18), todas también del subtipo B y con tropismo variable: tres R5, una R5X4 y una X4 (Anexo 8). Estudios *in vitro*, realizando pases seriales de las cepas CC1/85 y Bal de HIV-1 demostraron la aparición de estos mismos cambios de V169M y N192K en la región V2, lo que coincide con lo observado en la presente investigación para 40 muestras de VIH analizadas. Se ha sugerido que las mutaciones fuera del bucle V3 podrían compensar las mutaciones de resistencia que ocurren dentro del mismo (145). Considerando la extensa variabilidad de Env entre las cepas de VIH-1 y la inherente naturaleza flexible de la unión de la proteína Env al correceptor, existe la probabilidad de que los aislamientos clínicos de

sujetos que no han recibido terapia con esta droga, exhiban una respuesta reducida de inhibición frente a MVC.(140).

Dada la elevada frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia y/o cambio de tropismo de los pacientes incluidos en la presente investigación habría que explorar si existe resistencia natural al MVC en las CRFs así como en el subtipo C que circula en Cuba, o si se trata de polimorfismos. Se necesitan más estudios en otras variantes virales, para ver si las variaciones en sitios específicos de V3 y otras regiones variables de la envoltura viral pueden influir en la infectividad del virus, escape del sistema inmune y resistencia al MVC.

### **5.6 Patrones de glicosilación en los lazos V3 y V2**

La gp 120 del VIH es una potente glicoproteína que en su superficie expone los antígenos que juegan un papel significativo en el reconocimiento y la unión al receptor de la célula diana. Una razón por la cual se dificulta el reconocimiento inmunológico, es que esta glicoproteína presenta abundantes sitios de glicosilación: motivos de secuencias que codifican la unión postraduccional de los grupos glicanos con los residuos de N (138). Los sitios de glicosilación se han visto muy ligados a la conformación de las proteínas, al reconocimiento y unión a los receptores celulares. La glicoproteína de la envoltura de VIH es el blanco de los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro y el sitio más importante para el diseño de una vacuna de VIH basada en anticuerpos. El trímero Env del VIH está cubierto de aproximadamente 90 glicanos unidos que protegen la proteína de la vigilancia inmune (147).

El promedio de los sitios de glicosilación encontrados en los lazos V2 y V3 de las muestras cubanas secuenciadas, fue de 1,85 y 0,97 respectivamente (Anexos 7 y 8). En un estudio realizado por Palmer y Poon en el cual se incluyeron 6605 secuencias de la base de datos de Los Álamos, observaron que el promedio de sitios de glicosilación para el lazo V3 era de 0,9, lo cual coincide con el obtenido en la presente investigación, no siendo así en el caso del lazo V2 el cual fue de 1,85, comparado con el 2,1 obtenido por los autores antes referidos (138).

En 66 de 69 secuencias del lazo V3 (95,65 %) se identificó un solo sitio de glicosilación (posiciones 6-8 del lazo V3), solo dos muestras del subtipo C (CU043-18, CU3762-18) y una CRF\_BG (CU092-18) no mostraron este patrón. La muestra CU018-18, presentó un sitio de glicosilación adicional en las posiciones 32-34 del lazo V3. Los patrones encontrados coincidieron con los descritos por Kitawi y cols.(5).

Para el lazo V2, hubo coincidencia con los patrones descritos en la literatura, pero se encontraron en mayor número con respecto a V3 (Anexo 7). De las 40 muestras a las que se les realizó el análisis de V2, el 82,5 % (33/40), presentaban 2 sitios de glicosilación, el 2,5 % (1/40) no tuvo ninguno o tenían 3 sitios y el 12,5 % (5/40), presentó solo uno. Excepto cuatro muestras (CU5479-17, CU109-19, CU2484-19, CU4739-18), el resto presentaron un sitio de glicosilación en las posiciones 3-5 y la mayoría de los otros sitios de glicosilación se encontraron en las posiciones 185-190, siendo en su mayoría el patrón del tipo NNXS(T). Además, dos de las muestras tenían patrones en las posiciones 34-38 de V2. Al analizar la carga neta se observaron valores inferiores a los reportados para el lazo V3 (promedio 1,22), probablemente porque existe mayor número de aminoácidos cargados negativamente (D y E).

Al determinar el número de sitios de glicosilación estratificados según el subtipo, se obtuvieron los siguientes resultados: para el lazo V2, subtipo B: 1,79 [0-3]), subtipo C: 2, CRF\_BG: 1,88 [1-2], CRF19\_cpx: 1,89 [1-2]. Para el lazo V3, subtipo B: 1, subtipo C: 0,6 [0-1], CRF\_BG: 1 [0-2], CRF19\_cpx: 1, CRF18\_cpx: 1. Palmer y Poon (138) determinaron que los subtipos B y C tenían significativamente mayor número de sitios de glicosilación dentro del lazo V3, (0,96 [0,87-1,05] y 0,95 [0,96-1,05] respectivamente, lo cual no coincide con lo observado en este estudio. El subtipo C, mostró valores inferiores que lo reportado anteriormente y el resto de los subtipos estudiados mostraron el mismo número de sitios de glicosilación Anexo 8. En un estudio realizado por Kitawi y cols, en el cual analizan la relación de la presencia de determinados patrones de glicosilación, con el subtipo y el fenotipo viral, presentes en la región C2V3, ellos determinaron que los patrones que se observaban con mayor frecuencia eran los constituidos por NXT, NXS o NNXS(T), donde X puede ser cualquier aminoácido excepto P (5).

Un estudio, donde se analiza la gp 120 del recombinante CRF01\_AE, de varias cepas que mostraron resistencia o susceptibilidad a la neutralización viral frente a un anticuerpo (Ac) monoclonal anti-CD4, mostró que aquellas cepas que tenían un residuo particular de glicosilación en los aminoácidos 186 y 197 de la gp 120 (región V2) mostraron resistencia a la neutralización (80). Como referimos anteriormente, muchas de las muestras de la presente investigación, mostraron sitios de glicosilación en la posición 186 (cuatro subtipo B, 1 CRF\_BG y cinco CRF19\_cpx) habría que explorar en investigaciones futuras si la resistencia o

susceptibilidad de algunas de estas cepas frente a la neutralización, tendría implicaciones importantes para el diseño de vacunas o terapias. No se muestran los resultados para la posición 197, debido a que las secuencias incluidas en el presente trabajo solo llegaban hasta la posición 196. En nuestro estudio no se detectaron diferencias significativas en los patrones de glicosilación relacionados con el tropismo ni con los subtipos virales.

En resumen, los hallazgos del presente estudio refuerzan la hipótesis de que el virus CRF19\_cpx utiliza preferentemente el correceptor CXCR4 (virus dual o X4), y se replica con alta eficiencia. Este comportamiento es incluso más frecuente entre pacientes no tratados, con diagnóstico reciente de la infección, lo que podría tener impacto en la rápida progresión de la infección así como en la limitación del empleo de MVC para pacientes infectados con esta variante viral. Lo opuesto se observó para el recombinante CRF18\_cpx. El elevado porcentaje de mutaciones y/o polimorfismos observado en las secuencias cubanas, tanto del lazo V2 como V3 advierten la necesidad de evaluar a profundidad, con estudios fenotípicos, la susceptibilidad del VIH frente a los inhibidores de los correceptores.

## CONCLUSIONES

1. La diversidad genética del VIH-1, observada en el presente estudio confirma los hallazgos sobre la epidemiología molecular de este virus en Cuba.
2. El tropismo preferencial por el correceptor CXCR4, detectado en la variante CRF19\_cpx, acompañado de una mayor replicación viral y sin relación con el tiempo de diagnóstico de los pacientes, refuerza la hipótesis de que esta variante viral es más patogénica.
3. El tropismo X4 en el subtipo C estuvo sustentado con el prolongado tiempo de evolución de la enfermedad y el estadio de sida de los pacientes.
4. El hallazgo frecuente del CRF18\_cpx formando parte de las URF, con tropismo R5 y baja carga viral, sugiere la posible recombinación intersubtipo con un virus con mayor capacidad replicativa como mecanismo para incrementar su patogenicidad y transmisibilidad.
5. Las características epidemiológicas observadas en los pacientes infectados con los diferentes subtipos estudiados, confirman el incremento de las formas recombinantes en los últimos años, a expensas de la disminución de los subtipos puros.
6. La elevada frecuencia de polimorfismos y mutaciones que confieren resistencia a Maraviroc en las regiones V2 y V3 de VIH-1 de las formas recombinantes cubanas, indican que podría existir resistencia natural a este antirretroviral.

## **RECOMENDACIONES**

1. Estudiar el comportamiento del fenotipo viral, la capacidad replicativa, uso del correceptor y susceptibilidad al Maraviroc in vitro, de las principales variantes de VIH que circulan en Cuba.
2. Realizar un estudio, con un diseño representativo del país, sobre la prevalencia de resistencia primaria y secundaria a Maraviroc en Cuba, así como de seguimiento en aquellos que se encuentran bajo terapia con esta droga.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, NY)*. 1983;220(4599):868-71.
2. UNAIDS. Resumen mundial sobre la epidemia de sida. 2017. 2018.
3. Aldrich C, Hemelaar J. Global HIV-1 diversity surveillance. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(12):691-4.
4. 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.
5. 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.
6. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwang D. HIV subtype diversity worldwide. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2019;14(3):153–60.
7. Straus ES. Human Immunodeficiency Viruses: Replication. In: Freed OE, Martin AM, editors. *Fields Virology 6th edition*. 2. Philadelphia 2013.
8. Zolla-Pazner S, Cardozo T. Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):527-35.
9. Sede MM, Moretti FA, Laufer NL, Jones LR, Quarleri JF. HIV-1 Tropism Dynamics and Phylogenetic Analysis from Longitudinal Ultra-Deep Sequencing Data of CCR5- and CXCR4-Using Variants. *PLoS ONE*. 2014;9(7).
10. Smyth RP, Davenport MP, Mak J. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus research*. 2012;169(2):415-29.
11. Aves T, Tambe J, Siemieniuk RAC, Mbuagbaw L. Antiretroviral resistance testing in HIV-positive people *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018(11):70.
12. Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, et al. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *The New England journal of medicine*. 2008;359(14):1429-41.
13. Dirección Nacional de Epidemiología M. Base de datos nacional de la infección por VIH. 2018.
14. Kouri V, Khouiri 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.
15. Peeters M, D'Arc M, Delaporte E. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS reviews*. 2014;16(1):23-34.
16. Gao F YL, White AT, et al. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in West Africa. *Nature*. 1992;358:495–9.
17. 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.
18. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science (New York, NY)*. 2000;287(5453):607-14.
19. Retroviridae. In: Goff SP, editor. *Fields Virology 6th edition*. 2. Philadelphia, PA 19103 USA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2013.
20. 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. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. 1996;8(5):336-7.
21. Balasubramaniam M, Pandhare J, Dash C. Immune Control of HIV. *J Life Sci (Westlake Village)*. 2019;1(1):4-37.

22. Abbas AK. Congenital and Acquired Immunodeficiencies. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. Cellular and Molecular Immunology 8th edition. Philadelphia, PA 19103-28992015.
23. Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312(5996):763-7.
24. Adamson CS, Freed EO. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral research*. 2010;85(1):119-41.
25. Sourial S, Nilsson C, Warnmark A, Achour A, Harris RA. Deletion of the V1/V2 region does not increase the accessibility of the V3 region of recombinant gp125. *Current HIV research*. 2006;4(2):229-37.
26. Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine*. 1991;324(5):308-17.
27. Cullen BR. The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell*. 1990;63(4):655-7.
28. Cullen BR. Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell*. 1993;73(3):417-20.
29. Cullen BR. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*. 1998;93(5):685-92.
30. 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.
31. Barmania F, Pepper MS. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. *Applied & Translational Genomics*. 2013;2:3-16.
32. Grande F, Occhiuzzi MA, Rizzuti B, Ioele G, De Luca M, Tucci P, et al. CCR5/CXCR4 Dual Antagonism for the Improvement of HIV Infection Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019;24(3).
33. Álvarez V, López- Larrea C, Coto E. Receptores de quimiocinas en la infección por VIH-1 y la progresión hacia el sida. *Inmunología*. 1999;18:11.
34. Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, et al. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(3):887-91.
35. 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 MD 2012.
36. Garg H, Lee RT, Maurer-Stroh S, Joshi A. HIV-1 adaptation to low levels of CCR5 results in V3 and V2 loop changes that increase envelope pathogenicity, CCR5 affinity and decrease susceptibility to Maraviroc. *Virology*. 2016;493:86-99.
37. 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.
38. Freed EO, Ross SR. Retroviruses 2004: review of the 2004 Cold Spring Harbor Retroviruses Conference. *Retrovirology*. 2004;1:25.
39. 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.
40. Sabin CA, Lundgren JD. The natural history of HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2013;8(4):311-7.
41. Weber J. The pathogenesis of HIV-1 infection. *British medical bulletin*. 2001;58:61-72.
42. Coffin JM. HIV viral dynamics. *AIDS (London, England)*. 1996;10 Suppl 3:S75-84.
43. 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.

44. 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.
45. Fauci AS, Stanley S, et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV reproduction. *Annals of internal medicine*. 1996;124:654.
46. UNAIDS. Global HIV & AIDS Statistics. 2018.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. MINSAP. Prevención de la transmisión materno infantil de la sífilis y el VIH. Informe de resultados. 2014.
51. 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.
52. 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.
53. Gutierrez F, Rodríguez JC, Garcia F, Poveda E. [Methods for determination of HIV tropism and their clinical use]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011;29 Suppl 5:45-50.
54. Ke R, Conway JM, Margolis DM, Perelson AS. Determinants of the efficacy of HIV latency-reversing agents and implications for drug and treatment design. *JCI insight*. 2018;3(20).
55. Ray N, Doms RW. HIV-1 coreceptors and their inhibitors. *CTMI*. 2006;303:97-120.
56. Rolland M. HIV-1 phylogenetics and vaccines. *Curr Opin HIV AIDS*. 2019;14:227-32.
57. Latinovic OS, Reitz M, Heredia A. CCR5 Inhibitors and HIV-1 Infection. *J AIDS HIV Treat*. 2019;1(1):1-5.
58. Poveda E, Soriano V. Optimizing management of treatment-naïve and treatment-experienced HIV+ patients: the role of maraviroc. *HIV/AIDS (Auckland, NZ)*. 2010;2:51-8.
59. Aguilera Guirao A, Álvarez Estévez M, Reina González G, Rodríguez Martín C. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. In: Mansilla EC, Moreno RC, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica*2014.
60. Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science (New York, NY)*. 1989;243(4899):1731-4.
61. Brenner BG, Routy JP, Petrella M, Moisi D, Oliveira M, Detorio M, et al. Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *Journal of virology*. 2002;76(4):1753-61.
62. Sluis-Cremer N. The emerging profile of cross-resistance among the nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Viruses*. 2014;6(8):2960-73.
63. UNAIDS. Global HIV & AIDS Statistics. 2016.
64. UNAIDS. Global HIV & AIDS Statistics. 2014.
65. Westby M. Resistance to CCR5 antagonists. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2007;2(2):137-44.
66. Flynn JK, Ellenberg P, Duncan R, Ellett A, Zhou J, Sterjovski J, et al. Analysis of Clinical HIV-1 Strains with Resistance to Maraviroc Reveals Strain-Specific Resistance Mutations, Variable Degrees of Resistance, and Minimal Cross-Resistance to Other CCR5 Antagonists. *AIDS research and human retroviruses*. 2017;33(12):1220-35.

67. Jiang X, Feyertag F, Meehan CJ, McCormack GP, Travers SA, Craig C, et al. Characterizing the Diverse Mutational Pathways Associated with R5-Tropic Maraviroc Resistance: HIV-1 That Uses the Drug-Bound CCR5 Coreceptor. *Journal of virology*. 2015;89(22):11457-72.
68. Nedellec R, Coetzer M, Lederman MM, Offord RE, Hartley O, Mosier DE. Resistance to the CCR5 inhibitor 5P12-RANTES requires a difficult evolution from CCR5 to CXCR4 coreceptor use. *PLoS One*. 2011;6(7):e22020.
69. Schlecht HP, Schellhorn S, Dezube BJ, Jacobson JM. New approaches in the treatment of HIV/AIDS - focus on maraviroc and other CCR5 antagonists. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4(2):473-85.
70. Gutierrez F, Rodriguez JC, Garcia F, Poveda E. Tropismo del VIH. Técnicas disponibles y utilidad. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011;29(5):45-50.
71. Poveda E, Alcami J, Paredes R, Cordoba J, Gutierrez F, Llibre JM, et al. Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. *AIDS reviews*. 2010;12(3):135-48.
72. Van Laethem K, Schrootena Y, Lemeya P, Van Wijngaerdena E, De Witb S, Van Ransta M, et al. A genotypic resistance assay for the detection of drug resistance in the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene. *Elsevier BV*. 2005;123.
73. Aleman Y, Vinken L, Kouri V, Perez L, Alvarez A, Abrahantes Y, et al. Performance of an in-house human immunodeficiency virus type 1 genotyping system for assessment of drug resistance in Cuba. *PloS one*. 2015;10(2):e0117176.
74. Lemoine F, Correia D, Lefort V, Doppelt-Azeroual O, Mareuil F, Cohen-Boulakia S, et al. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic acids research*. 2019;47.
75. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30(4):772-80.
76. Criscuolo A, Gribaldo S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC evolutionary biology*. 2010;10(1):210.
77. GUINDON S, DUFAYARD J-F, LEFORT V, ANISIMOVA M, HORDIJK W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*. 2010;59(3):307-21.
78. Asin-Milan O, Chamberland A, Wei Y, Haidara A, Sylla M, Tremblay CL. Mutations in variable domains of the HIV-1 envelope gene can have a significant impact on maraviroc and vicriviroc resistance. *AIDS research and therapy*. 2013;10:15.
79. Woollard SM, Kanmogne GD. Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:5447-68.
80. Utachee P, Nakamura S, Isarangkura-Na-Ayuthaya P, Tokunaga K, Sawanpanyalert P, Ikuta K, et al. Two N-linked glycosylation sites in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01\_AE envelope glycoprotein gp 120 regulate viral neutralization susceptibility to the human monoclonal antibody specific for the CD4 binding domain. *Journal of virology*. 2010;84(9):4311-20.
81. Perez J, Perez D, Gonzalez I, Diaz Jidy M, Orta M, Aragones C, et al. Approaches to the management of HIV-AIDS in Cuba. 2004.
82. MINSAP. Plan estratégico nacional para la prevención y el control de las ITS y el VIH/SIDA. 2014-2018. 2013.
83. Dirección Nacional de Epidemiología M. Base de datos nacional de la infección por VIH. . 2016.
84. 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).
85. Mehta SR, Schairer C, Laittle S. Ethical issues in HIV phylogenetics and molecular epidemiology. *Current Opin HIV AIDS*. 2019;14:221-6.

86. Kouri V, Aleman Y, Perez L, Perez J, Fonseca C, Correa C, et al. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;55(4):348-55.
87. Perez L, Thomson MM, Bleda MJ, Aragones C, Gonzalez Z, Perez J, et al. HIV Type 1 molecular epidemiology in cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS research and human retroviruses*. 2006;22(8):724-33.
88. 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.
89. Kouri V, Aleman Y, Perez L, Perez J, Fonseca C, Correa C, et al. High frequency of antiviral drug resistance and non-b subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. *Journal of the International AIDS Society*. 2014;17(4 Suppl 3):19754.
90. Machado LY, Y. P, M. DH, Pérez L, Blanco M, Kourí V, et al. Increase of recombinat 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.
91. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 1989;63(3):1455-9.
92. Moutouh L, Corbeil J, Richman DD. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):6106-11.
93. Steain MC, Wang B, Dwyer DE, Saksena NK. HIV-1 co-infection, superinfection and recombination. *Sexual health*. 2004;1(4):239-50.
94. Carvajal-Rodriguez A, Crandall KA, Posada D. Recombination favors the evolution of drug resistance in HIV-1 during antiretroviral therapy. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2007;7(4):476-83.
95. Kourí V, Alemán Y, Díaz D, Pérez L, Limia CM, Soto Y, et al. Co-Receptor Tropism Determined by Genotypic Assay in HIV-1 Circulating in Cuba. *Journal of AIDS & clinical research*. 2016;7(592).
96. Oberle CS, Joos B, Rusert P, Campbell NK, Beauparlant D, Kuster H, et al. Tracing HIV- 1 transmission: envelope traits of HIV- 1 transmitter and recipient pairs. *Retrovirology*. 2016;13(62).
97. Kouri V, Aleman Y, Díaz D, Peréz L, Limia M C, Soto Y, et al. Co-Receptor Tropism Determined by Genotypic Assay in HIV-1 Circulating in Cuba. *Journal of AIDS & clinical research*. 2016;7(7):592.
98. González- Domenech C, I. V, Delaye L, Mayorga ML, Palacios R, Delatorre J. Emergence as an outbreak of the HIV-1 CRF19\_cpx variant in treatment-naive patients in Southern Spain. *PloS one*. 2018;13(1).
99. Casado G, Thomson MM, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19\_cpx) in Cuba. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2005;40(5):532-7.
100. Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtypoe D: High prevalence of CXCR4 tropims and heterogeneous composition of viral populations. *J virology*. 2007;81(15):7885-93.
101. Abraha A, Nankya IL, Gibson R, Demers K, Tebit DM, Johnston E, et al. CCR5- and CXCR4-tropic subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates have a lower level of pathogenic fitness than other dominant group M subtypes: implications for the epidemic. *Journal of virology*. 2009;83(11):5592-605.
102. Jakobsen MR, Cashin K, Roche M, Sterjovski J, Ellett A, Borm K, et al. Longitudinal Analysis of CCR5 and CXCR4 Usage in a Cohort of Antiretroviral Therapy-Naive Subjects with Progressive HIV-1 Subtype C Infection. *PloS one*. 2013;8(6):e65950.
103. Venner CM, Nankya I, Kyeyune F, Demers K, Kwok C, Chen PL, et al. Infecting HIV-1 Subtype Predicts Disease Progression in Women of Sub-Saharan Africa. *EBioMedicine*. 2016;13:305-14.

104. Mlisana K, Werner L, Garrett NJ, McKinnon LR, van Loggerenberg F, Passmore J-AS. Rapid Disease Progression in HIV-1 Subtype C–Infected South African Women. *Clinical Infectious Diseases Advance*. 2014.
105. Cashin K, Jakobsen MR, Sterjovski J, Roche M, Ellett A, Flynn JK, et al. Linkages between HIV-1 specificity for CCR5 or CXCR4 and in vitro usage of alternative coreceptors during progressive HIV-1 subtype C infection. *Retrovirology*. 2013;10:98.
106. Kaleebu P, Nankya IL, Yirell DL, Shafer LA, Kyosiimire-Lugemwa J, Lule DB, et al. Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2007;45(1):28-33.
107. Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, et al. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *Journal of virology*. 2007;81(15):7885-93.
108. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, Chohan V, McClelland RS, Certain L, et al. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(8):1177-80.
109. Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystie I, de Ruiter A, et al. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *Journal of the International AIDS Society*. 2010;13:4.
110. van der Kuyl AC, Cornelissen M. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology*. 2007;4:67.
111. 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.
112. Zhong P, S BU, Konings F, Urbanski M, Ma L, Zekeng L, et al. Genetic and biological properties of HIV type 1 isolates prevalent in villagers of the Cameroon equatorial rain forests and grass fields: further evidence of broad HIV type 1 genetic diversity. *AIDS research and human retroviruses*. 2003;19(12):1167-78.
113. Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp 120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(20):9434-8.
114. Arif MS, Hunter J, Leda AR, Zukurov JPL, Samer S, Camargo M, et al. Pace of Coreceptor Tropism Switch in HIV-1-Infected Individuals after Recent Infection. 2017;91(19).
115. Ataher Q, Portsmouth S, Napolitano LA, Eng S, Greenacre A, Kambugu A, et al. The epidemiology and clinical correlates of HIV-1 co-receptor tropism in non-subtype B infections from India, Uganda and South Africa. *Journal of the International AIDS Society*. 2012;15:2.
116. Guo JL, Yan Y, Zhang JF, Ji JM, Ge ZJ, Ge R, et al. Co-receptor tropism and genetic characteristics of the V3 regions in variants of antiretroviral-naïve HIV-1 infected subjects. *Epidemiology and infection*. 2019;147:e181.
117. Afani SA, Gallardo OA. [Antiretroviral resistance in human immunodeficiency virus infection]. *Revista chilena de infectologia : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*. 2011;28(5):461-9.
118. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. . *Lancet (London, England)*. 2014;384(9939):258-71.
119. Ashokkumar M, Aralaguppe SG, Tripathy SP, Hanna LE, Neogi U. Unique Phenotypic Characteristics of Recently Transmitted HIV-1 Subtype C Envelope Glycoprotein gp 120: Use of CXCR6 Coreceptor by Transmitted Founder Viruses. 2018;92(9).
120. Rolo FM, Miranda L, Wainberg MA, Gu Z, Lobaina L, Noa E, et al. Envelope V3 region sequences of Cuban HIV-1 isolates. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1995;9(2):123-5.

121. Lobaina L, Noa E, Dubed M, Navea L, Vilarrubia OL, Diaz H. Isolation and virological characterization of HIV-1 in Cuba. Relationship with the clinical status of the patients. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 1996;50(10):501-4.
122. Domínguez Palao F, Vega Y, Delgado E, Pérez Álvarez L, Thomson Okatsu M. Analysis of both the envelope sequence and the complete genome of a HIV-1 subtype F cluster of rapid expansion in Galicia: coreceptor use prediction and phylogeny. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2012;6(2):19-37.
123. Perez L, Alvarez LP, Carmona R, Aragonés C, Delgado E, Thomson MM, et al. Genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients infected with several HIV type 1 genetic forms in Cuba. *AIDS research and human retroviruses*. 2007;23(3):407-14.
124. Aragonés C, Sanchez L, Campos JR, Perez J. Antiretroviral therapy adherence in persons with HIV/AIDS in Cuba. *MEDICC review*. 2011;13(2):17-23.
125. Blanco M, Machado LY, Diaz H, Ruiz N, Romay D, Silva E. HIV-1 Genetic Variability in Cuba and Implications for Transmission and Clinical Progression. *MEDICC review*. 2015;17(4):25-31.
126. Delgado E, Benito S, Montero V, Cuevas MT, Fernández-García A, Sánchez-Martínez M, et al. Diverse Large HIV-1 Non-subtype B Clusters Are Spreading Among Men Who Have Sex With Men in Spain. *Front Microbiol* 2019; 10: 655. 2019;10(655).
127. Hauser A, Hofmann A, Meixenberger K, Altmann B, Hanke K, Bremer V, et al. Increasing proportions of HIV-1 non-B subtypes and of NNRTI resistance between 2013 and 2016 in Germany: Results from the national molecular surveillance of new HIV-diagnoses. *PLoS One*. 2018;13(11).
128. Guo H, Liu C, Liu B, Wood C, Kong X. Analysis of primary resistance mutations to HIV-1 entry inhibitors in therapy naive subtype C HIV-1 infected mother-infant pairs from Zambia. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;58(1):233-9.
129. Zolla-Pazner S, Cohen SS, Boyd D, Kong XP, Seaman M, Nussenzweig M, et al. Structure/Function Studies Involving the V3 Region of the HIV-1 Envelope Delineate Multiple Factors That Affect Neutralization Sensitivity. *Journal of virology*. 2016;90(2):636-49.
130. Coetzer M, Cilliers T, Ping LH, Swanstrom R, Morris L. Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology*. 2006;356(1-2):95-105.
131. Jensen MA, Coetzer M, van 't Wout AB, Morris L, Mullins JI. A Reliable Phenotype Predictor for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Based on Envelope V3 Sequences†. *Journal of virology*. 2006;80(10):4698-704.
132. Obermeier M, Pironti A, Berg T, Braun P, Daumer M, Eberle J, et al. HIV-GRADE: a publicly available, rules-based drug resistance interpretation algorithm integrating bioinformatic knowledge. *Intervirology*. 2012;55(2):102-7.
133. Zhang L, Ma L, Wang Z, Wang Y, Zhang J, Wang H, et al. Alterations in HIV-1 gp 120 V3 region are necessary but not sufficient for coreceptor switching in CRF07\_BC in China. *PloS one*. 2014;9(3):e93426.
134. Tomasini-Grotto RM, Montes B, Triglia D, Torres-Braconi C, Aliano-Block J, de AZPM, et al. Variability Of The Conserved V3 Loop Tip Motif In Hiv-1 Subtype B Isolates Collected From Brazilian And French Patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41(3):720-8.
135. Junqueira DM, Medeiros RM, Leite TC, Guimaraes ML, Graf T, Pinto AR, et al. Detection of the B-GWGR variant in the southernmost region of Brazil: unvilling the complexity of the HIV-1 subtype B epidemic. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(6):735-40.
136. Perez-Alvarez L, Delgado E, Vega Y, Montero V, Cuevas T, Fernandez-Garcia A, et al. Predominance of CXCR4 tropism in HIV-1 CRF14\_BG strains from newly diagnosed infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(1):246-53.

137. Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *Journal of virology*. 2010;84(19):9864-78.
138. Palmer J, Poon AFY. Phylogenetic measures of indel rate variation among the HIV-1 group M subtypes. *Virus evolution*. 2019;5(2):vez022.
139. Wood N, Bhattacharya T, Keele BF, Giorgi E, Liu M, Gaschen B, et al. HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC. *PLoS pathogens*. 2009;5(5):e1000414.
140. Borm K, Jakobsen MR, Cashin K, Flynn JK, Ellenberg P, Ostergaard L, et al. Frequency and Env determinants of HIV-1 subtype C strains from antiretroviral therapy-naive subjects that display incomplete inhibition by maraviroc. *Retrovirology*. 2016;13(1):74.
141. Zhang J, Gao X, Martin J, Rosa B, Chen Z, Mitreva M, et al. Evolution of coreceptor utilization to escape CCR5 antagonist therapy. *Virology*. 2016;494:198-214.
142. Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, et al. Structure and dynamics of the gp 120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1(JR-FL) to maraviroc. *PloS one*. 2013;8(6):e65115.
143. Nakata H, Maeda K, Das D, Chang SB, Matsuda K, Rao KV, et al. Activity and structural analysis of GRL-117C: a novel small molecule CCR5 inhibitor active against R5-tropic HIV-1s. *Scientific reports*. 2019;9(1):4828.
144. Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, Jensen MA, et al. Deep Sequencing to Infer HIV-1 Co-Receptor Usage: Application to Three Clinical Trials of Maraviroc in Treatment-Experienced Patients. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(2):237-45.
145. Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, et al. Structure and Dynamics of the gp 120 V3 Loop That Confers Noncompetitive Resistance in R5 HIV-1JR-FL to Maraviroc. *PloS one*. 2013;8(6).
146. Lewis M, Mori J, Toma J, Mosley M, Huang W, Simpson P, et al. Clonal analysis of HIV-1 genotype and function associated with virologic failure in treatment-experienced persons receiving maraviroc: Results from the MOTIVATE phase 3 randomized, placebo-controlled trials. *PloS one*. 2018;13(12):e0204099.
147. Cao L, Diedric JK, Kulp DW, Pauthner M, He L, Park S-KR, et al. . Global site-specific N-glycosylation analysis of HIV envelope glycoprotein. *Nature communications*. 2017;8 (14954).

# ANEXOS

## ANEXO 1

### Planilla de recolección de datos del paciente

Código de muestra asignado por IPK \_\_\_\_\_ o LISIDA \_\_\_\_\_

Fecha de toma de la muestra \_\_\_\_\_

#### I- Datos generales y variables sociodemográficas:

1-Nombre y apellidos \_\_\_\_\_

2- Caso Índice \_\_\_\_\_

3-Fecha de diagnóstico de VIH \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

4-Provincia \_\_\_\_\_ 5-Municipio \_\_\_\_\_ 6-Nivel de escolaridad \_\_\_\_\_

7-Edad al diagnóstico \_\_\_\_\_ 8-Edad Actual \_\_\_\_\_ 9-Sexo \_\_\_\_\_

#### II-VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS:

10- Explique la forma de detección de la infección por VIH  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

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

Si \_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_ Motivo por el que se hizo la prueba \_\_\_\_\_  
No \_\_\_\_\_

12- Fecha probable de contagio \_\_\_\_\_

13- Forma de contagio: Sexual: \_\_\_\_ Parenteral: \_\_\_\_ Vertical: \_\_\_\_

14- Orientación sexual \_\_\_\_\_

#### III- Variables Clínicas y de Laboratorio

15-Hallazgos al Examen Físico:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

16-SIDA \_\_\_\_ No SIDA \_\_\_\_ Fecha SIDA \_\_\_\_\_

17-Carga Viral al diagnóstico de VIH \_\_\_\_\_

Carga Viral de la muestra \_\_\_\_\_

18-Conteo de CD4 al diagnóstico de VIH \_\_\_\_\_

Conteo de CD4 de la muestra \_\_\_\_\_

#### IV-Historia de Terapia

19-Tratado \_\_\_\_ No Tratado \_\_\_\_\_

## **ANEXO 2**

### **Carta de Consentimiento Informado.**

Por medio de la presente certifico que el Dr. \_\_\_\_\_ me ha informado sobre los estudios que se me realizarán como parte del protocolo de investigación relacionado con la Vigilancia de la resistencia del VIH-1 a drogas antirretrovirales en Cuba. Los resultados de dichos estudios serán utilizados y publicados de forma anónima, pudiendo yo en cualquier momento abandonar dichas investigaciones, sin que ello pueda repercutir negativamente en mi asistencia médica en el futuro.

Del mismo modo, certifico que participaré en dicho estudio de una forma absolutamente voluntaria, con derecho a conocer los resultados de los exámenes que se me realicen.

Certifico por la presente que autorizo a las entidades sanitarias y al comité ético a que consulten los informes hospitalarios que digan mi nombre, sin que por ello pierdan su carácter confidencial.

Nombre y apellidos del paciente:

Firma del paciente:

Nombre y apellidos del testigo:

Firma del testigo:

Fecha:

Yo: \_\_\_\_\_, médico responsable de la toma de muestra del protocolo de investigación certifico por medio de la presente haberle explicado al paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que el mismo ha participado de forma absolutamente voluntaria en el ensayo.

Fecha:

Firma:

### ANEXO 3

#### Comparación del subtipo viral (*pol*) con las variables epidemiológicas

Datos del paciente	Subtipo viral en <i>pol</i>																							
	Tratados												No tratados											
	A1	%	B	%	C	%	CRF_BG	%	CRF19_cpx	%	CRF18_cpx	%	B	%	C	%	G	%	CRF_BG	%	CRF19_cpx	%	CRF18_cpx	%
	1	100	12	100	5	100	3	100	7	100	1	100	6	100	1	100	1	100	8	100	7	100	6	100
<b>Rango de edad</b>																								
15-30	0	0,00	2	16,67	0	0,00	0	0,00	2	28,57	1	100,00	3	50,00	0	0,00	0	0,00	4	50,00	2	28,57	1	16,67
31-45	0	0,00	2	16,67	2	40,00	3	100,00	3	42,86	0	0,00	3	50,00	1	100,00	1	100,00	1	12,50	2	28,57	2	33,33
46-60	0	0,00	8	66,67	3	60,00	0	0,00	2	28,57	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	37,50	2	28,57	2	33,33
> 60	1	100,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	14,29	1	16,67
<b>Región de residencia</b>																								
La Habana	1	100,00	10	83,33	0	0,00	2	66,67	6	85,71	1	100,00	3	50,00	0	0,00	1	100,00	7	87,50	5	71,43	3	50,00
Occidente (excluida La Habana)	0	0,00	1	8,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	16,67	1	100,00	0	0,00	0	0,00	2	28,57	0	0,00
Centro	0	0,00	1	8,33	0	0,00	0	0,00	1	14,29	0	0,00	2	33,33	0	0,00	0	0,00	1	12,50	0	0,00	1	16,67
Oriente	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	33,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	33,33
<b>Sexo Masculino</b>	1	100,00	12	100,00	3	60,00	3	100,00	5	71,43	1	100,00	5	83,33	1	100,00	1	100,00	8	100,00	6	85,71	5	83,33
<b>Orientación sexual HSH</b>	0	0,00	11	91,67	2	40,00	3	100,00	4	57,14	1	100,00	4	66,67	1	100,00	1	100,00	7	87,50	3	42,86	4	66,67
<b>Años de diagnóstico de VIH</b>									0															
≤ 1 año (Diagnóstico reciente)	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	28,57	0	0,00	5	83,33	0	0,00	0	0,00	6	75,00	6	85,71	6	100,00
> 1-3 años	0	0,00	2	16,67	0	0,00	0	0,00	1	14,29	0	0,00	1	16,67	1	100,00	1	100,00	2	25,00	1	14,29	0	0,00
> 3-5 años	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	33,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 5-10 años	0	0,00	2	16,67	1	20,00	0	0,00	1	14,29	1	100,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 10 años	1	100,00	8	66,67	4	80,00	2	66,67	3	42,86	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<b>Sida al diagnóstico de VIH</b>	0	0,00	1	8,33	0	0,00	0	0,00	2	28,57	0	0,00	1	16,67	0	0,00	0	0,00	2	25,00	1	14,29	0	0,00
<b>Sida actual</b>	1	100,00	7	58,33	5	100,00	1	33,33	4	57,14	0	0,00	1	16,67	0	0,00	0	0,00	2	25,00	1	14,29	0	0,00
<b>Evolución a sida después del diagnóstico de VIH</b>																								
≤ 1 año	0	0,00	2	16,67	1	20,00	1	33,33	4	57,14	0	0,00	1	16,67	0	0,00	0	0,00	2	25,00	1	14,29	0	0,00
1-3 años	0	0,00	2	16,67	2	40,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 3 años	1	100,00	3	25,00	2	40,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
No sida	0	0,00	5	41,67	0	0,00	2	66,67	3	42,86	1	100,00	5	83,33	1	100,00	1	100,00	6	75,00	6	85,71	6	100,00

## ANEXO 4

### Comparación del subtipo viral (*env*) con las variables epidemiológicas.

Datos del paciente	Subtipo viral en región C2V3 <i>env</i>																			
	Tratados										No tratados									
	B	%	C	%	CRF_BG	%	CRF19_cpx	%	CRF18_cpx	%	B	%	C	%	CRF_BG	%	CRF19_cpx	%	CRF18_cpx	%
	17	100	4	100	6	100	7	100	2	100	9	100	1	100	11	100	11	100	1	100
<b>Rango de edad</b>																				
15-30	3	17,65	0	0,00	3	50,00	0	0,00	1	50,00	3	33,33	0	0,00	5	45,45	3	27,27	0	0,00
31-45	4	23,53	2	50,00	3	50,00	4	57,14	0	0,00	5	55,56	1	100,00	3	27,27	2	18,18	1	100,00
46-60	10	58,82	2	50,00	0	0,00	2	28,57	1	50,00	1	11,11	0	0,00	3	27,27	4	36,36	0	0,00
>60	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	14,29	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	18,18	0	0,00
<b>Región de residencia</b>																				
La Habana	14	82,35	3	75,00	5	83,33	6	85,71	2	100,00	5	55,56	0	0,00	8	72,73	9	81,82	0	0,00
Occidente (excluida La Habana)	1	5,88	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	11,11	1	100,00	1	9,09	2	18,18	0	0,00
Centro	2	11,76	0	0,00	0	0,00	1	14,29	0	0,00	3	33,33	0	0,00	1	9,09	0	0,00	0	0,00
Oriente	0	0,00	1	25,00	1	16,67	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	9,09	0	0,00	1	100,00
<b>Sexo Masculino</b>	17	100,00	2	50,00	5	83,33	6	85,71	2	100,00	7	77,78	1	100,00	11	100,00	9	81,82	1	100,00
<b>Orientación sexual HSH</b>	16	94,12	2	50,00	4	66,67	5	71,43	1	50,00	5	55,56	1	100,00	10	90,91	6	54,55	1	100,00
<b>Años de diagnóstico de VIH</b>																				
≤ 1 año (Diagnóstico reciente)	0	0,00	0	0,00	2	33,33	0	0,00	0	0,00	7	77,78	0	0,00	10	90,91	9	81,82	1	100,00
> 1-3 años	3	17,65	0	0,00	0	0,00	1	14,29	1	50,00	2	22,22	1	100,00	1	9,09	2	18,18	0	0,00
> 3-5 años	0	0,00	0	0,00	1	16,67	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 5-10 años	4	23,53	1	25,00	1	16,67	2	28,57	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 10 años	10	58,82	3	75,00	2	33,33	4	57,14	1	50,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<b>Sida al diagnóstico de VIH</b>	2	11,76	0	0,00	0	0,00	1	14,29	0	0,00	1	11,11	0	0,00	1	9,09	2	18,18	0	0,00
<b>Sida actual</b>	10	58,82	4	100,00	2	33,33	4	57,14	1	50,00	1	11,11	0	0,00	1	9,09	2	18,18	0	0,00
<b>Evolución a sida después del diagnóstico de VIH</b>																				
≤ 1 año	5	29,41	1	25,00	2	33,33	3	42,86	0	0,00	1	11,11	0	0,00	1	9,09	2	18,18	0	0,00
1-3 años	2	11,76	1	25,00	0	0,00	0	0,00	1	50,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
> 3 años	3	17,65	2	50,00	0	0,00	1	14,29	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
No sida	7	41,18	0	0,00	4	66,67	3	42,86	1	50,00	8	88,89	1	100,00	10	90,91	9	81,82	1	100,00



## ANEXO 6

### Relación de las variables clínicas (CD4 y CV), con los subtipos en env, para pacientes tratados y no tratados

Características clínicas	Subtipo envoltura																			
	Tratados										No tratados									
	B	%	C	%	CRF_BG	%	CRF19_cpx	%	CRF18_cpx	%	B	%	C	%	CRF_BG	%	CRF19_cpx	%	CRF18_cpx	%
	17	100	4	100	6	100	7	100	2	100	8	100	1	100	11	100	11	100	1	100
<b>Carga viral en copias/mL</b>																				
< 1000	1,00	5,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1000-10000	2,00	11,76	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	14,29	0,00	0,00	1,00	12,50	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	9,09	1,00	100,00
> 10000-100000	8,00	47,06	1,00	25,00	2,00	33,33	2,00	28,57	1,00	50,00	3,00	37,50	1,00	100,00	7,00	63,64	2,00	18,18	0,00	0,00
> 100000	3,00	17,65	3,00	75,00	3,00	50,00	3,00	42,86	1,00	50,00	2,00	25,00	0,00	0,00	3,00	27,27	8,00	72,73	0,00	0,00
Desconocido	3,00	17,65	0,00	0,00	1,00	16,67	1,00	14,29	0,00	0,00	2,00	25,00	0,00	0,00	1,00	9,09	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Conteo de CD4 en células/mL</b>																				
< 200	6,00	35,29	3,00	75,00	4,00	66,67	4,00	57,14	1,00	50,00	1,00	12,50	0,00	0,00	1,00	9,09	2,00	18,18	0,00	0,00
200-500	8,00	47,06	1,00	25,00	1,00	16,67	1,00	14,29	0,00	0,00	2,00	25,00	1,00	100,00	3,00	27,27	4,00	36,36	1,00	100,00
> 500	2,00	11,76	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	14,29	0,00	0,00	4,00	50,00	0,00	0,00	3,00	27,27	2,00	18,18	0,00	0,00
Desconocido	1,00	5,88	0,00	0,00	1,00	16,67	1,00	14,29	1,00	50,00	1,00	12,50	0,00	0,00	4,00	36,36	3,00	27,27	0,00	0,00

### Relación de las variables clínicas (CD4 y CV), para subtipo global, para pacientes tratados y no tratados

Características clínicas	Subtipo global																					
	Tratados											No tratados										
	B	%	C	%	CRF_BG	%	CRF19_cpx	%	URF	%	B	%	C	%	CRF_BG	%	CRF19_cpx	%	CRF18_cpx	%	URF	%
	12	100	4	100	3	100	5	100	5	100	6	100	1	100	7	100	7	100	1	100	7	100
<b>Carga viral en copias/mL</b>																						
< 1000	1,00	8,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
1000-10000	1,00	8,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100,00	2,00	28,57	
> 10000-100000	7,00	58,33	1,00	25,00	1,00	33,33	2,00	40,00	0,00	0,00	3,00	50,00	1,00	100,00	4,00	57,14	1,00	14,29	0,00	0,00	2,00	28,57
> 100000	0,00	0,00	3,00	75,00	2,00	66,67	2,00	40,00	4,00	80,00	1,00	16,67	0,00	0,00	3,00	42,86	6,00	85,71	0,00	0,00	3,00	42,86
Desconocido	3,00	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	20,00	1,00	20,00	2,00	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Conteo de CD4 en células/mL</b>																						
< 200	3,00	25,00	3,00	75,00	3,00	100,00	3,00	60,00	4,00	80,00	1,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	14,29	0,00	0,00	1,00	14,29
200-500	6,00	50,00	1,00	25,00	0,00	0,00	1,00	20,00	0,00	0,00	1,00	16,67	1,00	100,00	1,00	14,29	2,00	28,57	1,00	100,00	3,00	42,86
> 500	2,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	50,00	0,00	0,00	2,00	28,57	1,00	14,29	0,00	0,00	3,00	42,86
Desconocido	1,00	8,33	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	20,00	1,00	20,00	1,00	16,67	0,00	0,00	3,00	42,86	3,00	42,86	0,00	0,00	0,00	0,00

## ANEXO 7

### Alineamiento de la secuencia aminoacídica del lazo V3 de la proteína gp 120 del VIH-1 y predicción del tropismo viral.

Posición en gp120	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	Subtipo	C2V3	FPR	G2P	Tropismo	G	Regla 11/25	Carga Neta	Glicosilación	Longitud
Posición lazo V3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35									
Secuencia consenso B	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	X	I	X	I			G	P	G	R	A	F	Y	X	T	G	X	I	I	G	X	I	R	Q	A	H	C									
<b>Subtipo B</b>																																														
IXB2 (cepa referencia)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	R	.	Q	R	.	.	.	.	.	.	V	T	I	.	K	.	.	.	N	M	.	.	.	.	.	B			X4	X4	8	1	37	
CU5204-17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	T	M	.	.	.	.	.	.	.	V	Y	T	.	.	Q	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	B	6,80%	R5X4	R5	5	1	35		
CU5479-17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	Q	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	B	47,60%	R5	R5	5	1	35		
CU5665-17	.	.	.	N/Y	.	N/Y	.	.	.	.	S/R	.	N/H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T/A	.	E	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	1,8%	X4	X4	4	1	35			
CU008-18	.	V	.	.	.	.	.	.	.	R	S	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	E/D	.	.	.	D	.	.	K/Q	.	.	.	B	34,90%	R5	R5	4	1	35			
CU034-18	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	S	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	D	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	78,80%	R5	R5	3	1	35			
CU035-18	.	K/R	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	E	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	30,10%	R5	R5	3	1	35			
CU040-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	H	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	D	.	.	.	D	.	.	.	Y	.	.	B	60,20%	R5	R5	3	1	35			
CU041-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R/S	.	T	.	.	.	.	.	A/V	.	.	.	.	T	.	E	V	.	.	D	.	.	K	.	Y	.	B	1,80%	X4	X4	5	1	35			
CU051-18	.	.	.	.	.	.	.	.	K/R	.	S	.	Q	.	.	.	.	S	.	I	.	.	T	.	S	.	.	.	D	.	.	K	.	Y	.	B	11,50%	R5X4	R5	4	1	35				
CU052-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	H	M	.	.	.	.	S	M	.	.	.	A	.	E	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	B	58,50%	R5	R5	2	1	35			
CU057-18	.	.	L	.	.	.	.	.	R	.	S	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	D	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	56%	R5	R5	3	1	35			
CU065-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S/G	.	H/Y	L	.	.	.	W	.	S	L/V	.	.	A	.	E/D	.	.	.	D	.	.	T/Q	.	.	.	B	17%	R5X4	R5	4	1	35				
CU070-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	E	.	T/I	.	D	.	.	.	.	.	.	B	34,30%	R5	R5	3	1	35			
CU083-18	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	S	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	A	.	D	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	73,70%	R5	R5	3	1	35			
CU091-18	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	S	.	H	.	.	.	.	S	.	.	.	.	F	A	.	D	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	87,80%	R5	R5	2	1	35			
CU108-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	P/S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	E	A	.	.	D	.	.	.	Y	.	.	B	10,20%	R5X4	R5	3	1	35			
CU781-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	H	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	D	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	66,90%	R5	R5	3	1	35			
CU998-18	.	.	I	D	.	.	.	.	.	.	S	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	.	E	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	42,90%	R5	R5	3	1	35			
CU1403-18	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	S	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	A	.	E	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	76%	R5	R5	3	1	35			
CU1706-18	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	R	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	W	R	A	M	.	K	V	.	.	D	.	.	.	Y	.	B	0,20%	X4	X4	7	1	35			
CU2059-18	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	D	.	H	L	.	.	.	.	.	.	.	.	W	F	A	.	D	.	.	.	N	.	.	.	.	.	B	23,90%	R5	R5	4	1	35			
CU3029-18	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	S	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	D	.	.	.	D	.	.	K	.	.	.	B	79,50%	R5	R5	3	1	35			
CU3878-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	D	.	I/V	.	D	.	.	.	.	.	.	B	86,20%	R5	R5	3	1	35			
CU109-19	.	.	.	.	.	.	.	.	K/R	K/R	.	S	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T/A	.	E	I/V	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	31,40%	R5	R5	3	1	35			
CU2463-19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	S	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	D	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	B	82,9%	R5	R5	2	1	35			
CU2484-19	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	Q	.	V	.	D	.	.	.	.	.	B	31,6%	R5	R5	4	1	35				
<b>Subtipo C</b>																																														
CU043-18	.	.	.	.	.	.	R	.	R	.	S	V	R	.	.	.	Q	.	L	F	A	.	.	.	D	.	.	.	N	.	E	.	Y	.	C	87,70%	R5	R5	4	0	35					
CU059-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	Y	R	.	.	.	Q	S	.	.	.	.	A	.	.	D	.	.	.	N	.	E	.	.	.	C	63,50%	R5	R5	3	1	35				
CU1287-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	C	Q	D	.	R	T	R	T	I	I	.	A	.	.	D	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	C	2,60%	X4	X4	4	1	35			
CU3762-18	.	.	.	Y	.	T	R	G	.	.	S	V	R	.	.	I	.	G	Q	S	I	S	A	T	R	N	I	G	G	K	.	.	.	.	C	0,10%	X4	R5	7	0	35					
CU4736-18	.	T/I	.	.	.	.	.	.	.	.	R	V	R	M	G	I	.	.	L	T	.	.	A	S	E	D/G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	C	0,10%	X4	X4	3	1	37				

## ANEXO 7

### Alineamiento de la secuencia aminoacídica del lazo V3 de la proteína gp 120 del VIH-1 y predicción del tropismo viral (Cont.)

CRFs_BG (20,23,24)																																												
CU3457-17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	R	F	Q	.	.	.	A	.	.	D	.	.	.	D	V	.	K	.	F	.	CRF_BG	9,30%	RSX4	R5	4	1	35
CU5579-17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	S	.	R	F	Q	.	.	.	A	.	.	D	.	.	.	D	.	K	.	F	.	CRF_BG	21,20%	R5	R5	4	1	35	
CU018-18	.	T/I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	R	F	Q	.	.	.	A	.	D/G	A	I/V	.	D	.	N	.	S	.	CRF_BG	26,20%	R5	R5	4	2	35		
CU066-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	G	F	Q	.	.	.	A	.	D	.	.	.	D	.	K	.	S	.	CRF_BG	65,40%	R5	R5	2	1	35		
CU067-18	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	R	.	Q	.	.	.	A	.	D/A	.	T	.	D	.	K	.	.	.	CRF_BG	17,90%	RSX4	R5	4	1	35		
CU074-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	R	.	S	.	R	.	Q	.	.	.	H	A	.	S	.	.	.	D	.	K	.	F	.	CRF_BG	14,70%	RSX4	R5	4	1	35		
CU082-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	S	.	R/G	.	Q	.	.	.	A	.	D	.	.	.	D	.	Q	.	S	.	CRF_BG	42,30%	R5	R5	3	1	35			
CU092-18	.	.	.	G	Y	.	.	K	K	.	.	.	.	.	S	.	R	.	G	I	.	.	R	Q	S	V	H	A	.	.	.	.	Q	.	CRF_BG	0,20%	X4	R5	7	0	37			
CU100-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	S	.	R	F	.	Q	.	.	.	F	A	.	E	I/V	.	N	.	D	.	S	.	CRF_BG	82,40%	R5	R5	4	1	35		
CU103-18	.	.	H	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	R	.	.	Q	T	.	.	A	.	E	V	.	D	.	K	.	S	.	CRF_BG	76%	R5	R5	4	1	35			
CU2294-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	S	F	.	A	.	Q	T	L	T	.	D	.	.	D	.	.	.	Y	.	CRF_BG	100%	R5	R5	2	1	35		
CU4737-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	R	I/F	.	Q	.	.	.	A	.	D/E	.	.	.	D	.	K	.	Y	.	CRF_BG	21,40%	R5	R5	4	1	35		
CU113-19	.	T/I	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	R	.	.	Q	.	.	.	A	.	D	.	T/I	.	D	.	K	.	.	.	CRF_BG	19,50%	RSX4	R5	4	1	35		
CU116-19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	S	.	R	F	.	Q	.	.	.	A	.	D/E	I/V	.	E	.	.	.	F	.	CRF_BG	39,8%	R5	R5	3	1	35			
CU122-19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	S	.	H/P	F	.	Q	.	.	.	A	.	D	.	.	D	.	K	.	F	.	CRF_BG	86,20%	R5	R5	3	1	35			
CU2357-19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	R	I/F	.	Q	.	.	.	A	.	E	V	.	D	.	E	.	F	.	CRF_BG	28,8%	R5	R5	2	1	35			
CU2483-19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	H	.	.	A	.	Q	.	I	A	P	.	D	.	.	D	.	E	V/F	.	CRF_BG	93,8%	R5	R5	1	1	35		
CRF 19_cpx																																												
CU020-18	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	R	.	Q	V	Y	.	A	R	D/G	A	.	.	D	.	.	.	.	.	CRF19_cpx	1,70%	X4	R5	4	1	35			
CU053-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	R	V	H/R	.	Q	V	.	.	.	.	.	E	.	.	D	.	.	.	.	.	.	CRF19_cpx	2,10%	X4	X4	3	1	35		
CU055-18	.	.	.	S/D	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A/G	V	H/P	.	P/S	K	I/V	.	T/A	I	.	D	.	.	D	T/I	.	R	H/Y	.	CRF19_cpx	0,70%	X4	R5	3	1	35			
CU058-18	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	R	.	Q	V	.	.	T	.	.	D	.	.	D	.	K	.	.	.	CRF19_cpx	6,80%	RSX4	R5	4	1	35			
CU060-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	R	.	Q	V	.	.	A	.	.	D	.	.	D	.	.	H/Y	.	.	.	CRF19_cpx	27,50%	R5	R5	3	1	35		
CU064-18	.	A/V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	S	.	H	.	Q	.	Q	.	.	A	.	E	.	.	D	.	K/R	.	.	.	CRF19_cpx	98%	R5	R5	2	1	35			
CU072-18	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	S	V	R	.	Q	V	.	.	T	V	.	E	.	.	N	.	K	.	.	.	CRF19_cpx	1,80%	X4	R5	5	1	35			
CU076-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	R	.	Q	V	.	.	A	.	.	D	.	.	D	.	K	.	Y	.	CRF19_cpx	15%	RSX4	R5	4	1	35			
CU096-18	.	.	.	N/S	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	S	V	R	.	Q	V	.	.	A/G	.	.	D	.	.	D	.	.	.	.	.	CRF19_cpx	30,70%	R5	R5	2	1	35			
CU782-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	H	.	Q	V	.	.	K	.	.	Q	.	.	D	.	K	.	.	.	CRF19_cpx	6,80%	RSX4	R5	4	1	35			
CU2010-18	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S/G	V	H	.	A/G	.	.	P/R	V	.	A	.	E	.	.	N	.	.	.	.	CRF19_cpx	6,60%	RSX4	R5	4	1	35			
CU2452-18	.	T/S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	R	.	Q	V	.	.	A	.	.	E	.	.	D	.	.	.	.	.	CRF19_cpx	24,90%	R5	R5	3	1	35			
CU4485-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	H	L	.	Q	.	.	Q	A	.	E	.	.	D	.	K	.	Y	.	CRF19_cpx	24,60%	R5	R5	3	1	35			
CU4513-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	S	V	H	.	Q	V	.	.	G	.	.	D	.	.	N	.	.	.	.	.	CRF19_cpx	77,20%	R5	R5	3	1	35			
CU4739-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	S	V	H	.	Q	V	.	.	A	.	.	A	V	.	D	.	R	.	Y	.	CRF19_cpx	19,40%	RSX4	R5	3	1	35			
CU111-19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	H	.	Q	V	W	.	A	.	.	D	.	.	N	.	.	.	.	.	CRF19_cpx	82,40%	R5	R5	3	1	35			
CU115-19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	V	R	.	Q	V	.	.	A	.	.	D	.	.	D	.	K	.	.	.	CRF19_cpx	17,1%	RSX4	R5	4	1	35			
CU2462-19	.	I	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	S	I/V	S	.	.	Q	.	.	.	K	L	.	D	.	.	D	.	E	.	.	CRF19_cpx	46%	R5	R5	1	1	35			
CRF 18_cpx																																												
CU024-18	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	S	.	H	L	.	P/S	Q	.	.	T	.	A	.	.	D	.	A	.	Y	.	CRF18_cpx	85,9%	R5	R5	2	1	35			
CU069-18	.	.	.	N/S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S/G	.	H/R	.	.	Q	T	.	P/A	.	.	E	I/V	T/I	.	D	.	.	H/Y	.	CRF18_cpx	85,80%	R5	R5	3	1	35			
CU46-18	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	H	.	A	.	Q	.	I	T	.	D	.	.	D	.	.	.	.	.	CRF18_cpx	79,70%	R5	R5	2	1	35			

## ANEXO 8

### Alineamiento de la secuencia aminoacídica del lazo V2 de la proteína gp 120 del VIH-1.

Posición en gp 120	158	159	160	161	162	163	164	###	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	###	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	Subtipo	Carga Neta	Glicosilación	Longitud	Tropismo							
Posición en lazo V2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39												
Secuencia HXB2	S	F	N	I	S	T	S	I	R	G	K	V	Q	K	E	Y	A	F	F	Y	K	L	D	I	I	P	I	D	N	D	T	T	S	Y	K	L	T	S	C												
<b>Subtipo B</b>																																																			
CU5479-17-ENV	D	V	.	.	R	G	W	.	.	.	.	A	K	.	G	.	V	Y	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	G	.	.	N	N	T	.	R	.	I	N	.	B	3	1	39	R5					
CU008-18-ENV	.	.	.	.	T	E	V	.	D	.	M	R/Q	.	A	.	L	.	S	.	.	V	V	.	.	.	.	.	.	S	K	N	.	N	.	.	.	R	.	I	.	B	1	2	41	R5						
CU034-18-ENV	.	.	.	.	T	E	L	.	D	.	.	.	T	.	V	.	H	A	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	N	.	D	.	S	D	N	.	S	.	R	.	I	.	B	-1	3	40	R5				
CU035-18-ENV	.	.	.	V	T	.	N	R	K	D	.	M	R	R	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	L	E	Q	.	.	G	.	G	N	N	N	.	P	.	T	M	S	.	B	1	2	40	R5				
CU040-18-ENV	.	.	.	.	T	.	G	.	.	D	.	.	.	.	Q	.	L	.	.	T	N	.	.	V	S	.	.	E	.	G	N	N	Y	R	.	L	.	I	.	.	R	.	I	.	B	2	1	42	R5		
CU051-18-ENV	.	.	.	.	T	.	M	V	G	E	.	K	K	.	.	.	L	.	H	S	.	.	V	V	Q	N	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	R	.	I	.	B	-1	2	37	RSX4					
CU052-18-ENV	.	.	.	.	I	.	N	G	G	Y	.	K	E	Q	T	M	H	.	L	I	D	.	.	V	V	Q	.	.	.	.	S	T	N	.	Y	.	N	.	.	W	I	.	B	-1	2	41	R5				
CU065-18-ENV	.	.	.	.	T	.	G	.	G	N	.	.	.	E	G	N/Y	.	I	.	D	.	.	.	V	M	.	.	.	.	K	.	.	K/N	N	D	N/T	T	.	I/K	.	I	H	.	B	0	2	40	RSX4			
CU070-18-ENV	.	.	.	V	T	G	G	.	K	D	.	R	.	.	.	.	L	.	.	T	.	.	L	A	K	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	R	M	I	H	.	B	2	2	38	R5				
CU083-18-ENV	.	.	.	V	T	.	E	R	.	D	.	.	K	.	H	.	L	.	.	T	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	S	.	K	K	.	.	.	I	.	S	B	2	2	39	R5					
CU781-18-ENV	.	.	.	.	T	.	.	.	D	.	R	T	.	.	L	.	.	.	Y	.	V	V	.	.	.	.	.	E	N	S	K	N	N/D	N	S	.	E	.	I	.	N/S	.	B	-1	2	43	R5				
CU998-18-ENV	.	.	.	V	T	.	G	V	.	D	.	M	.	.	Q	.	L	.	.	T	S	.	.	V	V	.	.	.	.	S	.	.	N	.	.	.	.	R	.	I	N	.	B	0	2	40	R5				
CU1403-18-ENV	T	.	.	.	T	.	E	V	K	D	.	M	K	.	R	.	L	.	N	I	.	.	V	.	.	.	.	.	.	K	.	N	N	.	.	.	.	R	.	I	.	B	2	2	39	R5					
CU1706-18-ENV	.	.	.	.	T	S	N	M	.	D	.	.	.	T	Q	H	.	A	.	S	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	B	0	1	37	X4						
CU2059-18-ENV	.	.	.	.	T	.	D	L	.	D	.	.	R	.	.	.	L	L	.	.	.	.	V	.	Q	.	K	E	K	E	.	.	.	N	.	.	.	.	R	.	I	.	B	1	2	42	R5				
CU3029-18-ENV	L	S	.	C	T	.	G	V	.	D	.	V	K	.	H	.	I	.	.	I	.	.	V	.	D	.	.	.	D	.	N	S	.	.	.	.	.	V	.	B	-1	2	39	R5							
CU3878-18-ENV	.	.	.	.	T	.	E	.	D	.	.	.	.	T	Y/S	.	L	.	.	.	.	.	V	V	.	.	.	.	N/D	.	N/D	N	N/T	.	.	.	R	.	I	.	B	0	2	39	R5						
CU109-19-ENV	T	.	I	.	T	N	R	.	W	V	.	.	L	.	E	V	I	K	L	I	S	S	.	K	V	.	.	.	.	S	Y	N	.	.	.	R	.	I	.	B	2	0	39	R5							
CU2484-19-ENV	.	.	.	V	E	.	E	V	K	D	.	M	R	.	A	.	L	.	.	T	.	.	V	V	.	.	.	.	.	S	G	T	N	.	N	.	.	.	R	.	I	.	B	-1	2	41	R5				
<b>Subtipo C</b>																																																			
CU1287-18-ENV	.	.	.	M	T	.	R	.	.	D	.	N	.	R	.	.	L	.	.	.	.	.	V	Q	L	N	G	.	.	.	.	N	N	N	T	.	.	M	.	I	N	.	C	1	2	42	X4				
CU3762-18-ENV	.	.	.	T	T	.	G	V	.	D	R	N	K	.	D	.	L	.	.	D	.	.	L	A	.	L	.	K	.	E	.	N	N	S	T	.	F	I	.	I	.	C	1	2	39	X4					
CU4736-18-ENV	.	.	.	V	T	.	E	.	I	D	.	H	R	.	.	F	.	L	.	.	.	.	.	V	.	L	.	K	.	R	.	.	G	G	D	.	T	S	N	N	T	D	C	-1	2	39	X4				
<b>CRFs_BG (20,23,24)</b>																																																			
CU3457-17-ENV	.	.	.	T	T	.	R	.	.	D	R	Q	E	.	L	G	S	.	.	C	P	E	L	T	R	.	.	T	.	.	.	N	S	S	D	.	.	R	.	V	N	.	BG	1	2	39	RSX4				
CU018-18-ENV	.	.	.	.	T	.	E	L	.	D	.	Q	K	Q	.	.	L	.	.	R	.	.	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	N	N	.	.	.	R	.	I	N	.	BG	0	2	39	R5				
CU066-18-ENV	.	.	.	.	T	.	E	.	K	D	.	K	K	Q	.	.	L	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	N	N	K	N	.	D	G	N	N	Y	S	D	.	R	.	I	N	.	BG	1	2	46	R5
CU082-18-ENV	.	.	.	.	T	.	E	.	G	D	.	R	R	Q	.	.	L	.	.	.	.	.	V	.	.	S	.	.	G	.	S	.	.	S	Y	.	.	.	R	.	I	N	.	BG	0	1	40	R5			
CU100-18-ENV	.	.	.	.	.	E	L	R	D	.	Q	K	.	.	.	L	.	.	R	.	.	.	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	I	N	.	BG	1	2	39	R5				
CU2294-18-ENV	.	.	.	M	T	.	E	L	Q	D	.	K	T	.	H	.	L	.	.	.	.	.	M	.	N	I	.	.	.	E	S	D	K	N	Y	S	D	.	R	.	I	N	.	BG	-1	2	44	R5			
CU4737-18-ENV	.	.	.	.	T	.	E	.	D	R	K	R	Q	.	.	I	.	.	.	P	.	.	M	H	.	N	.	.	E	.	N/S	N	S	S	.	.	.	R	.	I	N	.	BG	0	2	41	R5				
CU122-19-ENV	.	.	.	.	T	.	E	L	Q	D	.	K	K	.	.	.	L	.	.	R	.	.	V	M	.	.	D	.	.	K	.	.	A	N	G	.	.	.	R	.	I	N	.	BG	1	2	40	R5			

## ANEXO 8

### Alineamiento de la secuencia aminoacídica del lazo V2 de la proteína gp 120 del VIH-1. (Cont.)

Posición en gp 120	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	Subtipo	Carga Neta	Glicosilación	Longitud	Tropismo		
Posición en lazo V2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39							
Secuencia HXB2	S	F	N	I	S	T	S	I	R	G	K	V	Q	K	E	Y	A	F	F	Y	K	L	D	I	I	P	I	D	N	D	T	T	S	Y	K	L	T	S	C							
CU060-18-ENV	.	.	.	T	E	L	.	D	.	K	.	.	.	S	L	.	.	.	.	V	.	.	.	G	K	.	N	T	E	E	.	.	R	.	I	N	.	CRF19_cpx	1	2	41	R5				
CU072-18-ENV	.	Y	.	M	T	E	L	.	D	.	K	.	R	I	F	S	L	.	.	R	.	.	V	.	.	E	E	E	.	G	S	S	H	.	R	.	I	N	.	CRF19_cpx	0	2	41	X4		
CU076-18-ENV	.	.	.	M	T	E	L	.	D	.	K	.	R	I	H	S	L	.	.	.	.	V	.	.	E	E	.	N	N	N	.	.	R	.	I	N	.	CRF19_cpx	1	2	40	R5X4				
CU782-18-ENV	.	.	.	A	T	E	Y	.	D	.	K	K	E	.	.	I	.	.	.	.	L	A	Q	.	K	.	.	.	S	H	.	.	R	.	I	N	.	CRF19_cpx	1	2	38	R5X4				
CU4513-18-ENV	.	.	.	T	E	.	.	.	.	K	.	Q	.	.	L	.	.	.	.	M	Y	A	L	Y	.	V	.	V	.	P	L	.	G	.	N	N	N	.	G	N	CRF19_cpx	2	2	38	R5	
CU4739-18-ENV	.	.	K	T	T	E	L	K	D	.	G	.	T	V	.	S	L	.	.	.	.	V	.	.	G	Q	.	S	N/S	S	A	Q	.	.	R	.	I	N	.	CRF19_cpx	0	1	41	R5X4		
CU111-19-ENV	.	.	.	M	T	E	.	.	D	.	K	.	.	T	H	.	L	.	.	R	.	.	V	.	L	E	E	N	.	N	S	S	K	S	K	.	R	.	I	N	.	CRF19_cpx	3	2	43	R5
CU2462-19-ENV	.	.	.	M	T	T/R	T	L	.	D	.	K	.	.	V	F	S	L	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	N	S	S	Q	.	.	S	.	I	N	.	CRF19_cpx	3	2	39	R5		
<b>CRF 18_cpx</b>																																														
CU46-18-ENV	.	.	.	V	T	I	E	L	.	D	.	Q	K	T	.	.	R	.	S	.	.	T	.	.	V	E	.	K	.	G	.	.	N	.	.	.	R	.	I	N	.	CRF18_cpx	0	2	39	R5