

# **CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA REGIÓN C2-V3 DE LA MOLÉCULA gp120 DEL VIH-1 Y PREDICCIÓN DEL FENOTIPO VIRAL**

**Lic. Dianne Díaz Ramírez**

*Universidad de Matanzas – Sede “Camilo Cienfuegos”*

## Resumen

El virus de la Inmunodeficiencia Humana fue descrito por primera vez en 1981, en la actualidad afecta a alrededor 35,5 millones de personas. El objetivo del estudio fue caracterizar genótipicamente la región C2-V3 de la molécula gp120 del VIH-1 de muestras de pacientes cubanos y realizar la predicción genotípica del fenotipo viral utilizando métodos moleculares y bioinformáticos. Estos resultados a la vez se relacionaron con datos epidemiológicos, clínicos y virales de los pacientes. El 58,3% de las muestras estudiadas mostraron un fenotipo R5, constituyendo este el 83,3% de los pacientes no tratados. El subtipo B representó el 33,33%, las Formas Recombinantes Circulantes BG el 41,66% y el CRF19 el 25%, de las muestras analizadas. Los pacientes no tratados mostraron una carga viral elevada y la mayoría pertenecían al subtipo B con predominio del fenotipo R5; mientras que los pacientes tratados mantenían una carga viral inferior y entre ellos predominaron las CRF y el fenotipo X4. Conocer el fenotipo viral de VIH-1 es útil para determinar la evolución de la progresión a SIDA y decidir si el paciente es elegible para recibir terapia ARV específica.

**Palabras claves:** *molécula gp-120, región C2-V3, fenotipo, subtipo, carga viral*

---

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida, actualmente reconocido como SIDA fue descrito en 1981, por el Centro para el Control de las Enfermedades de los EEUU [ONUSIDA 2013] en la revista Morbidity and Mortality Weekly Report donde se reportaron cinco casos de California con una inmunodeficiencia severa en hombres que tenían sexo con otros hombres y usuarios de drogas endovenosas.

Según datos del 2012 35.5 millones de personas viven con el VIH en el mundo y de estos 3,3 son niños menores de 15 años. En ese año 2,3 millones de personas contrajeron la infección por el VIH y 1,6 millones fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA. Se calcula que alrededor de 6,300 nuevas infecciones ocurren por día. [ONUSIDA 2013]

Existen dos agentes causantes del SIDA, el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), que tiene una distribución mundial y es el responsable de la mayor parte de las infecciones; y el virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), que predomina en el continente africano. [Kuritzkes, D et al. 2013]

La infección por VIH está caracterizada por tres fases fundamentales: una infección primaria o aguda, un período de latencia clínica, y una fase final o de SIDA, donde se manifiestan las enfermedades o eventos oportunistas que llevan a las complicaciones y muerte del paciente. [Kuritzkes, D et al. 2013]

Los individuos infectados exhiben diferentes patrones de progresión a SIDA; del 80% al 90% desarrolla la inmunodeficiencia en un promedio de 8 a 10 años (progresores típicos).

Entre el 5 y 10% de los individuos infectados se consideran progresores lentos o no progresores y se caracterizan porque, en ausencia de terapia antirretroviral (ARV), permanecen asintomáticos por más de 10 años, sin deterioro inmunológico, mientras que aproximadamente el 10% desarrolla SIDA en menos de cinco años (progresores rápidos) [Barre F et al. 1983].

La variabilidad interindividual observada en la progresión a SIDA está relacionada con numerosos factores que pueden determinar la variación en el tiempo de progresión a SIDA. Estos pueden ser agrupados en tres categorías [Barre F et al. 1983]; características del virus, propiedades del huésped infectado y factores ambientales.

El VIH pertenece a la familia Retroviridae, género Lentivirus. Se subdivide en VIH tipo 1 y 2. Es una partícula envuelta, con una bicapa lipídica que toma de la célula hospedera, en ella se insertan 72 complejos glicoprotéicos (formados por dímeros de gp41 y trímeros de gp120), los que son necesarios para la unión y penetración del virus a la célula hospedera. La gp120 contiene sitios de unión al receptor celular CD4 y a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. La gp41 es una glicoproteína de transmembrana formada por los dominios alfa hélice HR1 y HR2 en cuyo extremo se localiza un péptido altamente hidrofóbico que interviene en la fusión de la envoltura del virus a la membrana de la célula [Gallo RC et al. 1984] [Clavel F et al. 1986]. La proteína de matriz p17 está anclada en el interior de la membrana lipoprotéica viral. La cápside viral tiene morfología icosaédrica y está constituida por la proteína p24. El genoma viral está constituido por dos moléculas de ARN. El ARN del VIH-1 es parte de un complejo de proteína-ácido nucleico compuesto por la nucleoproteína p7 y la transcriptasa inversa p66. La partícula viral contiene todo el equipo enzimático necesario para la replicación: la transcriptasa inversa, la integrasa p32 y la proteasa p11.

La identificación del papel crucial de algunos receptores de quimiocinas en la entrada del VIH a las células diana, ha permitido el desarrollo de un sistema más preciso para describir las propiedades fenotípicas de las cepas virales. El determinante principal del tropismo del VIH (fenotipo) está determinado por la expresión de los cor-receptores CCR5 y CXCR4 o ambos. [Clavel F et al. 1986], [Chermann JC et al. 1983] and [Langford SE et al. 2007]

Las cepas de VIH que usan el CCR5 pero no CXCR4 se llaman variantes R5 y las cepas que usan CXCR4 pero no CCR5 son designadas X4 y aquellas que utilizan ambos son variantes de tropismo dual o R5/X4. La variante viral R5 se aísla en el 90-95% de las infecciones primarias por el VIH.

Los virus X4 son más citopáticos, in vitro, que las cepas R5, haciéndose la especulación que in vivo también podrían ser más virulentas y citopáticas para las células T CD4+, esto podría explicar el colapso tan rápido de la población de células T CD4+ que ocurre después que los virus X4 empiezan a predominar, lo que conduce a la progresión rápida a SIDA [Hu WS et al. 1992], [Clavel F et al. 1989]. Sin embargo, los mecanismos responsables de la emergencia de virus X4 durante la progresión de enfermedad se desconocen.

La determinación del fenotipo viral es de relevante importancia clínica debido a que ayuda a predecir el tipo de progresión además de ser determinante para una terapia antirretroviral efectiva. Existe una amplia gama de antirretrovirales disponibles en el mercado que bloquean diferentes etapas del ciclo replicativo viral, pero los de última generación están enfocados en inhibir las etapas tempranas de la replicación; la entrada y la fusión, como lo son el Maraviroc y el Enfuvirtide respectivamente.

A pesar de la efectividad de los antirretrovirales existen virus resistentes a estos, en el caso del Maraviroc que es eficiente sólo frente a virus con fenotipo R5 ya que interactúa con gp120, nuestra proteína de estudio. La resistencia puede ser alcanzada por varias vías, la existencia previa de bajos niveles de virus con fenotipo X4 en la población o la selección de mutaciones en el gen *env*, fundamentalmente en la región del lazo C2-V3.

Con la presente investigación nos propusimos determinar el fenotipo de las variantes genéticas virales que se encuentran circulando actualmente en pacientes cubanos además del subtipo al que estos pertenecen.

Materiales y Métodos:

*Universo y muestra:*

El universo estuvo constituido por todas las muestras de VIH-1 de pacientes que se recibieron en el laboratorio de ITS del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) en el período junio-julio 2014, para realizarse estudio de resistencia a los medicamentos antirretrovirales.

La muestra quedó constituida por 25 plasmas de pacientes a los que se les realizó PCR de envoltura para estudio de predicción de fenotipo viral, se analizó solo una muestra por paciente.

Este estudio presenta la aprobación del comité de ética institucional, siguiendo las normas de la declaración de Helsinki.

*Extracción del ARN viral.*

Se tomó 1ml de plasma por cada paciente y se centrifugó a 20000 rpm por 1 hora a 40°C. El sobrenadante se descartó dejando sólo 140 µL, con el que se disolvió el sedimento mediante vórtex por 15 segundos. Una vez disuelto se emplearon los 140 µL para la extracción del ARN viral, siguiendo el protocolo estándar para centrifuga descrito por el fabricante, utilizando el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit, de manera manual o automática (Extractor automático QIAcube, Alemania). El ARN extraído se conservó a -80°C hasta su utilización en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

- *Síntesis y amplificación del ADN complementario (ADNc).*

*Amplificación de gen env. Transcripción Reversa (RT)-RCP (gp160).*

Se realizó una RCP que amplifica un fragmento de 3876 pb del gen que codifica para la proteína gp160 de VIH-1. La mezcla de reacción estará constituida por: 1X Expand HF Buffer, 2.25mM MgCl<sub>2</sub>, 200uM dNTPs, 0.4uM de los cebadores KVL008 y KVL009 y 2.6U de enzima Expand High Fidelity PCR System (Roche, Alemania). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 95°C por 2 minutos; 10 ciclos de 15 s a 95°C, 30s a 52°C, 4 min a 68°C, 30 ciclos de 15s a 95°C, 30s a 52°C, 4 min a 68°C además un incremento de 5s a cada ciclo de elongación y una extensión final de 10 min a 72°C.

#### *RCP Anidada (gp120).*

La amplificación de los 2346 bp del gen que codifica para la proteína gp120 de VIH-1 se realizó utilizando una mezcla de reacción constituida por: 1X Expand HF Buffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200uM dNTPs, 0.4uM del cebador AV317, 0.4uM del cebador AV323 y 2.6U de la enzima Expand High Fidelity PCR System (Roche, Alemania). En este caso también fue necesario preparar la mezcla de cebadores y dNTP en un vial diferente al que contenía 10X Expand Buffer, MgCl<sub>2</sub> y Expand HF Enzyme, el que se unió inmediatamente después de haber agregado el ADNc al primer vial. Las condiciones de ciclaje fueron: desnaturalización por 2 min a 95°C; 10 ciclos de 15 s a 95°C, 30s a 55°C, 3 min a 68°C, 20 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 55°C, 3 min a 68°C además un incremento de 5s a cada ciclo de elongación y una extensión final de 10 min a 72°C. Este protocolo, incluyendo, la RT-RCP (gp160) y la RCP anidada (gp120) fue descrito por Van Leathem y cols. en el año 2005 [McCutchan FE . 2006],[ Kandathil AJ et al. 2005].

#### *Análisis de los productos de las RCP anidada del gen env.*

Para analizar los productos obtenidos en la RCP anidada se tomaran 10 µL de los mismos más 2 µL del indicador de corrida (Blue/Orange 6 X loading Dye, Promega, EU) y se aplicaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (BDH, 0.1 µg/mL). Este gel se sometió a una electroforesis horizontal utilizando como tampón de corrida TBE 1X (0.4 M de Tris; 0.5 M de ácido bórico y 0.01 M de ácido etilendiaminotetracético (EDTA). La corrida se realizó a 120 V durante 45 min. Las bandas de ADN amplificadas se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision TM). La talla correcta de la amplificación se determinó mediante la comparación con el patrón de migración del marcador de peso molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega, USA). Además se utilizó un control positivo (C+), constituido por una muestra de plasma que contenía VIH y que se probó previamente, así como un control negativo (C-) constituido por agua en vez de ADN. Ambos serán incluidos en cada ensayo desde el paso de extracción del ARN con el objetivo de descartar posibles inhibiciones o contaminaciones en la RCP.

#### *Purificación de los productos de las RCP anidadas del gen env.*

Los productos de RCPs de cada reacción fueron purificados utilizando el estuche comercial QIAquick®PCR Purification Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes.

Para secuenciar el fragmento de 144 pb que codifica para de la región C2-V3 de la gp120, se emplearon dos reacciones de secuencia por cada producto purificado de la RCP anidada. Para las reacciones de secuenciación se prepararon mezclas constituidas por: 1 µL de cada uno de los cebadores AV306, AV309, AV302, AV304 y AV305, 8 µL de la mezcla de reacción de secuencia DTCS Quick Star Master Mix (Dye Terminador Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit, de Beckman Coulter, USA), 5 µL de ADN purificado y 6 µL de H<sub>2</sub>O, hasta completar 20 µL de reacción. Para esta reacción se realizaron 50 ciclos de 96°C por 30s, 50°C durante 20s y 60°C por 4 min.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>
KVL008	5'- GGTCAKGGRGTCTCCATAGAATGGA- 3'
KVL009	5'- GCCAATCAGGGAAGWAGCCTTGTGT - 3'
AV317	5'- TCAAGCAGGACATAAYAAGGTAGG-3'
AV323	5'- CTGCTCCYAAGAACCCAA-3'
AV306	5'-TGTCAGCACAGTACAATGTACACA-3'
AV309	5'-CARTAGAAAAATTCYCCTCYA CA-3'
AV302	5'-CTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGG-3'
AV304	5'-ACATGTGGAAAAATGACATGGT-3'
AV305	5'-GAGTGGGGTTAATTTTACACATGG-3'

Una vez concluida la reacción de secuencia, se realizó la purificación de la misma siguiendo el protocolo descrito en el estuche comercial DTCS Quick Star Master Mix (Beckman Coulter, EU). La separación de los productos obtenidos en la reacción de secuencia se realizó en un secuenciador automático Beckman Coulter modelo CEQ<sup>TM</sup>8800 utilizando el procedimiento de análisis de datos crudos para productos de RCP. Los cebadores y

protocolos de la región de la envoltura fueron reportados por Van Leatham y cols. en el 2005 [Kandathil AJ et al. 2005].

#### *Edición de las secuencias.*

Las secuencias obtenidas de la región C2-V3 del gen *env* de cada ADN se ensamblaron y editaron utilizando el programa Sequencher™ Version 4.9 (Genes Codes Corporation, USA), usando como referencia la secuencia nucleotídica de la cepa de VIH-1 B.FR.83.HXB2\_LAI\_IIIB\_BRU.K03455. Al final se obtuvieron secuencias consensos de cada muestra de paciente analizado.

#### *Predicción del fenotipo y subtipo viral.*

A partir de la secuencia nucleotídica que se obtuvo de la región C2-V3 de la gp120 del gen *env* se realizó la predicción del fenotipo viral (uso de correceptores de entrada) a partir del genotipo, para lo que se utilizó el programa geno2pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>) con un rango de falso positivo del 20%.

Mientras que el subtipo viral se pudo determinar al introducir estas secuencias obtenidas en el programa COMET HIV-1 (del inglés, COntext based MOdeling for EXpeditious TYping), herramienta de bioinformática que clasifica de manera rápida las secuencias nucleotídicas de VIH-1 en subtipos. La versión 1.0 es capaz de detectar formas recombinantes aún en secuencias cortas.

Se realizó análisis filogenético manual mediante el programa MEGA versión 5. Se construyó un árbol filogenético utilizando el modelo de máxima verosimilitud con 1000 réplicas (bootstraps).

#### *Análisis de los resultados*

Se compararon los resultados del fenotipo viral y el subtipo con variables demográficas (sexo, edad, preferencia sexual, fecha de diagnóstico e infección), con variables virológicas (carga viral, y el subtipo detectado en el gen *pol.*). Para lo que se utilizó estadística descriptiva de frecuencias. Los datos se muestran tablas y figuras.

#### *Resultados y discusión:*

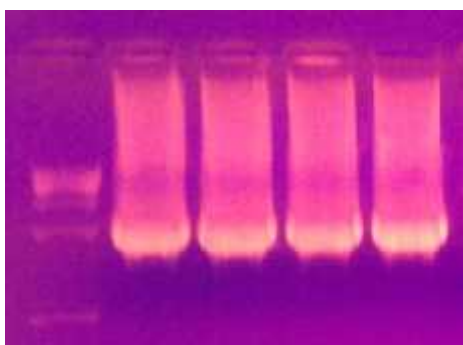
##### *Descripción de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de VIH-1 obtenidas.*

Con el objetivo de predecir el fenotipo de VIH-1 (R5, R5/X4 o X4) a partir de la secuenciación nucleotídica de las muestras de plasma y relacionar el mismo con determinadas variables clínicas y virológicas, se estudiaron 25 muestras de pacientes.

Se obtuvo amplificación, mediante RT-PCR del gen *env* en 12 de las muestras estudiadas (48%) (Figura 1). Los ADN obtenidos fueron posteriormente secuenciados, obteniéndose la

secuencia de la región C2-V3 en el 100%. (Tabla 1). La región secuenciada mostró variabilidad extrema, no existiendo ninguna secuencia similar, lo cuál ha sido reportado previamente por varios autores para esta región del VIH-1, particularmente para el lazo V3. [Van Laethema K et al. 2005] La distribución del porcentaje de bases en las secuencias estudiadas se muestra en la Tabla 2.

PM 155 1209 1332 1504



**Fig1. Electroforesis del producto de la amplificación por RT-PCR del gen env.**

**Tabla2. Distribución del porcentaje de bases secuenciadas en cada muestra.**

	U%	C%	A%	G%
<b>Referencia</b>	<b>22.0</b>	<b>16.5</b>	<b>42.2</b>	<b>19.3</b>
<b>1155</b>	<b>20.2</b>	<b>17.8</b>	<b>41.8</b>	<b>20.2</b>
<b>1209</b>	<b>23.0</b>	<b>16.1</b>	<b>41.5</b>	<b>19.4</b>
<b>1332</b>	<b>24.3</b>	<b>14.7</b>	<b>41.7</b>	<b>19.3</b>
<b>1504</b>	<b>23.2</b>	<b>16.9</b>	<b>38.6</b>	<b>21.3</b>
<b>1508</b>	<b>21.1</b>	<b>16.5</b>	<b>44.0</b>	<b>18.3</b>
<b>1511</b>	<b>23.4</b>	<b>15.6</b>	<b>45.4</b>	<b>15.6</b>
<b>LH107</b>	<b>33.5</b>	<b>22.9</b>	<b>23.4</b>	<b>20.2</b>
<b>LH173</b>	<b>23.9</b>	<b>16.5</b>	<b>38.5</b>	<b>21.1</b>
<b>LH268</b>	<b>20.6</b>	<b>15.6</b>	<b>45.4</b>	<b>18.3</b>



<b>LH275</b>	<b>23.4</b>	<b>14.7</b>	<b>39.9</b>	<b>22.0</b>
<b>MT25</b>	<b>23.1</b>	<b>15.3</b>	<b>41.7</b>	<b>19.9</b>
<b>SC29</b>	<b>22.9</b>	<b>17.0</b>	<b>39.0</b>	<b>21.1</b>
<b>Total</b>	<b>23.4</b>	<b>16.6</b>	<b>40.2</b>	<b>19.7</b>

#### *Determinación del fenotipo viral*

Al secuenciar la región C2-V3 de las 12 muestras analizadas se observó que siete mostraron fenotipo R5 (58,3%), mientras que el 41,7% fueron clasificados como virus X4. Se ha reconocido que la variante viral R5 se aísla en la mayoría de las infecciones primarias por el VIH, mientras que la variante X4 es típica de aquellos pacientes que llevan mayor tiempo de evolución [Pérez L et al. 2013].

Muchos autores coinciden en cuanto a la predicción del tipo de progresión a SIDA según el fenotipo viral. Se ha visto que los individuos infectados con virus R5 progresan más lento a SIDA que aquellos que poseen fenotipo X4. Además estudios recientes han probado que el tiempo que se pase bajo ARV influye en la selección del fenotipo X4 dentro de la población viral, quedando un grupo con un gran número de mutaciones que confieren resistencia a antirretrovirales de distintos tipos y con mayor patogenicidad.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman estas afirmaciones. Las secuencias que muestran un fenotipo X4 poseen una mayor variabilidad con respecto a la secuencia de referencia, siendo así mayormente en las muestras de aquellos individuos que se encuentran bajo tratamiento ARV.

#### *Determinación del subtipo viral*

El análisis del subtipo viral en la región env de VIH-1 de las muestras reveló una amplia variedad de subtipos genéticos, siendo el subtipo B el (33,33%), las CRFsBG (41,66%) y el CRF19 (25%), de las variantes detectadas. Esta gran variabilidad ha sido reportada en varios estudios cubanos previos, y se debe en parte al origen de la epidemia cubana en África [PEREZ, L et al. 2006]. Las variantes CRF19 y CRF BGs (20, 23 y 24) son recombinantes originados en Cuba que han sido reportados previamente y que muestran tendencia a la expansión [ PEREZ, L et al. 2006] .

Al realizar el análisis filogenético con el programa MEGA 5 (Fig3) se confirma el subtipo reportado por el programa automático COMET versión 1.

Los subtipos determinados utilizando la región del lazo C2-V3 de la secuencia génica de gp120 mediante métodos bioinformáticos fueron consecuentes con los que se habían determinado en investigaciones anteriores en estos mismos pacientes utilizando la secuencia del gen pol, excepto para la muestra LH107, que resultó subtipo B en el gen env y CRF19\_cpx en el gen pol, evidenciado la presencia de una forma recombinante única (URF) B/CRF19\_cpx, que puede haber ocurrido por re-infección del paciente con dos variantes de VIH-1 (Tabla 2).

El estimado del promedio global de divergencia evolutiva entre todas las secuencias analizadas, calculado con el programa MEGA 5, fue de 67,08. El número de diferencias de bases entre las secuencias estuvo en el rango de 2.30 hasta 149. El análisis incluyó 32 secuencias nucleotídicas (incluidas las 12 secuenciadas en este estudio y 20 de referencia). Las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del análisis.

#### *Datos clínicos, epidemiológicos y virológicos de los pacientes estudiados.*

En la Tabla 3 se muestran los datos clínicos, epidemiológicos y virales de los pacientes estudiados, la mitad de estos ya habían recibido terapia ARV al momento del estudio.

Los pacientes no tratados tenían una edad promedio de 38,1 años, el 33% eran mujeres y el 75% eran hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH). Estos casos fueron diagnosticados alrededor de 22 meses después de la probable fecha de infección y mostraban altos valores de carga viral, lo cual es típico de los periodos iniciales de la infección que se caracteriza por una viremia masiva con altas tasas de replicación viral. [PEREZ L et al.2013]

Los pacientes que estaban bajo tratamiento ARV tenían una edad promedio de 34,6 años y todos eran hombres HSH. Aunque se desconoce el tiempo que medió entre la probable fecha de infección y el diagnóstico de VIH, se puede observar que 2 de 6 habían sido diagnosticados con VIH desde hacía más de 10 años, dos tenían más de 6 años de diagnóstico y dos habían sido diagnosticados hacía menos de tres años. La carga viral de estos pacientes se encontraba más baja que la de no tratados, probablemente porque se encontraban bajo terapia ARV donde, aún en presencia de resistencia, las variantes virales mutadas que se seleccionan tienen baja capacidad replicativa y por tanto muestran menores valores de carga viral [ PEREZ L et al. 2007].

Los datos recopilados confirman que el grupo de HSH tiene mayor incidencia dentro de la población de seropositivos al VIH en Cuba, lo cuál ha sido reportado en múltiples estudios cubanos previos [ PEREZ L et al.2007].

#### *Relación entre fenotipo viral y variables analizadas*

Los pacientes no tratados, que habían sido diagnosticados recientemente en su mayoría mostraban un fenotipo R5 con elevada carga viral al momento de la toma de la muestra, que coincidió con el momento del diagnóstico. Llama la atención el paciente LH268, que a pesar de haber sido diagnosticado con VIH en el año 2013, tenía una fecha probable de infección de hacía cinco años y ya tiene un fenotipo viral X4, indicando que en breve tiempo este paciente evolucionará a SIDA, y que por tanto necesita una vigilancia estrecha para iniciar terapia ARV antes de que progrese a SIDA.

Para los pacientes tratados se observó que el fenotipo viral en cuatro de los seis casos (66,7%) era X4, a pesar de que mostraban menores niveles de carga viral. Para el caso de los dos pacientes en etapa SIDA que mostraron fenotipo R5, uno era un paciente con diagnóstico del año 2012 y otro era un paciente diagnosticado con VIH en el año 1999 y que había iniciado

terapia ARV hacía menos de un año, indicando que se trataba de un paciente con lenta progresión a SIDA.

Estos resultados muestran cómo los pacientes que ya han evolucionado a etapa SIDA, y que por tanto se encuentran bajo terapia ARV, poseen en su mayoría virus con fenotipo X4 al encontrarse en etapas más avanzadas de la infección.

Al comparar el fenotipo viral con el subtipo de VIH-1, no se encontró relación entre estas dos variables ya que las diferentes variantes virales detectadas mostraron tanto fenotipo R5 como X4, esto coincide con la mayoría de los reportes de la literatura que no encuentran asociación entre subtipo viral y evolución a SIDA [ LANGFORD, S. E et al. 2007], sin embargo se ha reportado que el subtipo D se asocia con rápida progresión a SIDA y con la presencia de fenotipo X4. Recientemente, el grupo de Kourí y cols. Ha reportado la asociación de la variante viral cubana CRF19\_cpx con rápida progresión a SIDA (comunicación personal, datos no publicados), aunque este resultado no pudo ser confirmado en el presente estudio.

Como limitante principal del estudio está el pequeño tamaño de la muestra, lo que impide arribar a resultados definitivos.

## Conclusiones

Esta investigación reviste gran importancia ya que poder contar con la información del fenotipo viral de VIH-1 del paciente posibilita al médico de asistencia predecir su evolución a SIDA así como le permite decidir la factibilidad de instaurar tratamiento usando inhibidores de los co-receptores. Por otro lado desde el punto de vista epidemiológico ayuda a las autoridades de salud a determinar el comportamiento de la epidemia en el país.

## Bibliografía

BARRE-SINOUSI F, CHERMANN JC, REY F, NUGEYRE MT, CHAMARET S, GRUEST J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20; 220(4599):868-71.

CHERMANN JC, BARRE-SINOUSI F, DAUGUET C, Brun-Vezinet F, ROUZIOUX C, ROZENBAUM W, et al. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother*. 1983; 32:48-53.

CLAVEL F, GUETARD D, BRUN-VEZINETF, CHAMARET S, REY MA, SANTOS-FERREIRA MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 1986 Jul 18; 233(4761):343-6.

CLAVEL F, HOGGAN MD, WILLEY RL, STREBEL K, MARTIN MA, REPASKE R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol*. 1989 Mar; 63(3):1455-9.

GALLO RC, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M, SHEARER GM, KAPLAN M, HAYNES BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984 May 4; 224(4648):500-3.

Hu WS, TEMIN HM. Effect of gamma radiation on retroviral recombination. *J Virol*. 1992 Jul; 66(7):4457-63.

Informe ONUSIDA 2013

KURITZKES, D and KOUP, R. 2013. Chapter 50: HIV-1: Pathogenesis, Clinical and Manifestations, and Treatment. *Fields Virology*. 6th Ed. (1): 1561-1583.

KANDATHIL AJ, RAMALINGAM S, KANNANGAI R, DAVID S, SRIDHARAN G. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res*. 2005 Apr; 121(4):333-44.

KRISTEL VAN LAETHEMA, YOERI SCHROOTENA, PHILIPPE LEMEYA, ERIC VAN WIJNGAERDENA, STÉPHANE De WITB, MARC VAN RANSTA, ANNE-MIEKE VANDAMMEA. A genotypic resistance assay for the detection of drug resistance in the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene. *Journal of Virological Methods* 123 (2005) 25–34

LANGFORD SE, ANANWORANICH J, COOPER DA. Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Res Ther*. 2007; 4:11.

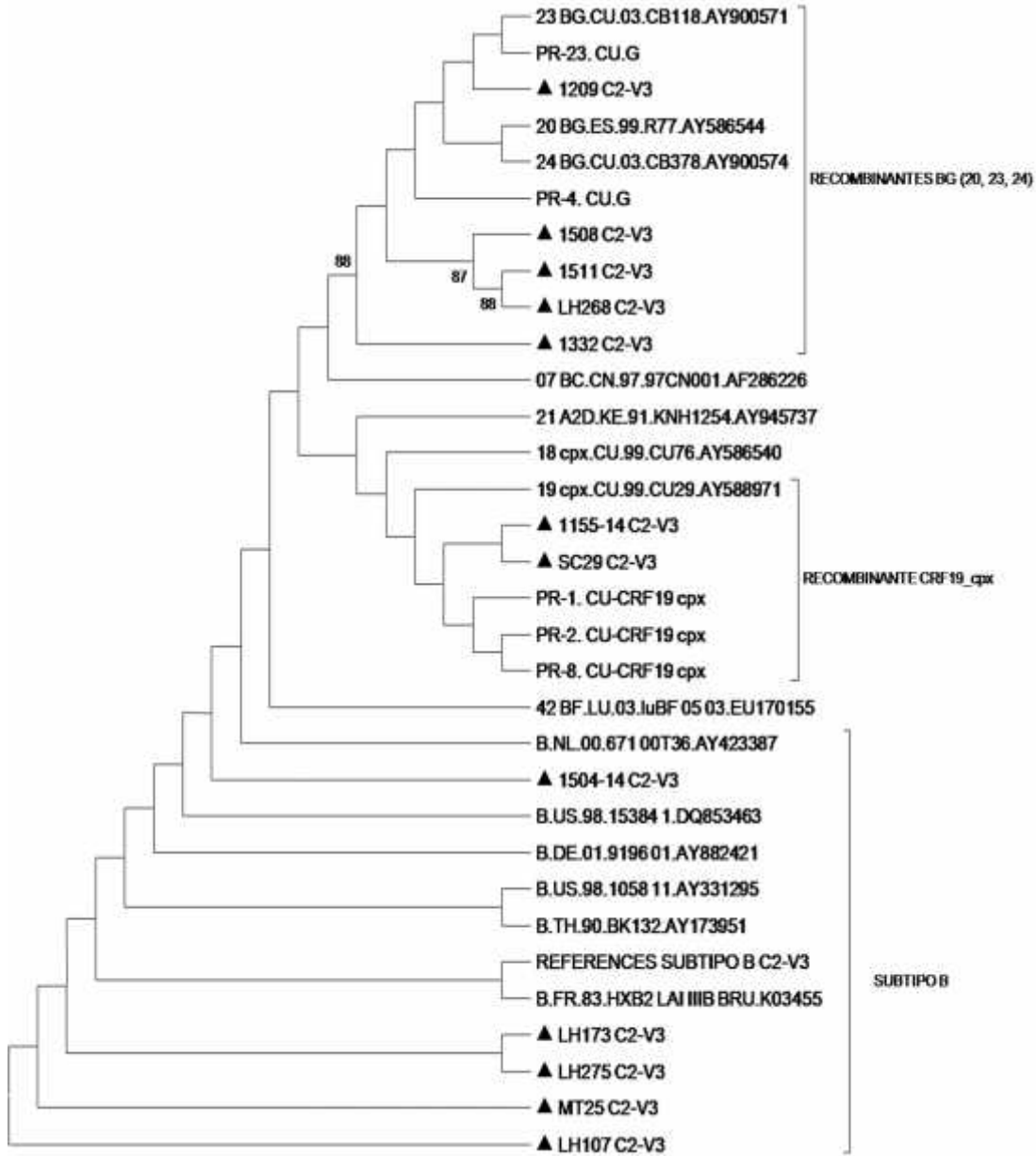
LISSETTE PÉREZ, VIVIA KOURÍ , YOAN ALEMÁN, YEISEL ABRAHANTES, CONSUELO CORREA , CARLOS ARAGONÉS, ORLANDO MARTÍNEZ, JORGE CARLOS PÉREZ, CARLOS FONSECA, JORGE CAMPOS, DELMIS ÁLVAREZ, YOERI SCHROOTEN, NATHALIE DEKEERSMAEKER, STIJN IMBRECHTS GERTJAN BEHEYDT, LORE VINKEN, YUDIRA SOTO, ALINA ÁLVAREZ, ANNE-MIEKE VANDAMME, KRISTELVAN LAETHEM. Antiretroviral drug resistance in HIV-1 therapy-naive patients in CubaLi. *Infection, Genetics and Evolution* 16 (2013) 144–150

PEREZ, L., THOMSON, M. M., BLEDA, M. J., ARAGONES, C., GONZALEZ, Z., PEREZ, J., SIERRA, M., CASADO, G., DELGADO, E. & NAJERA, R. HIV Type 1 molecular epidemiology in cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006, 22, 724-33.

LISSETTE PÉREZ, LUCÍA PÉREZ ÁLVAREZ, ROCÍO CARMONA, CARLOS ARAGONÉS, ELENA DELGADO, MICHAEL M. THOMSON, 2 ZOILA GONZÁLEZ, GERARDO CONTRERAS, JORGE PÉREZ,<sup>1</sup> and RAFAEL NÁJERA. Genotypic Resistance to Antiretroviral Drugs in Patients Infected with Several HIV Type 1 Genetic Forms in Cuba. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES*. Volume 23, Number 3, 2007, pp. 407–414.

McCUTCHAN FE. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol*. 2006; 78 Suppl 1:S7-S12.





**Figura 2.** La historia evolutiva fue inferida empleando el método de máxima verosimilitud (**Maximum Likelihood**), basado en el modelo de Kimura 2-parámetros. El análisis incluyó 32 secuencias nucleotídicas. Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del análisis. Hubo un total de 186 posiciones en los datos analizados. Las muestras cubanas analizadas se encuentran identificadas con un triángulo negro. El análisis evolutivo se realizó con el programa MEGA 5.

