

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

“PEDRO KOURÍ”

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

“EVALUACIÓN DE LA CONSISTENCIA DEL PATRÓN
EPIDEMIOLOGICO DE TRANSMISIÓN EN DOS CADENAS CUBANAS
DE SEROPOSITIVOS AL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1 MEDIANTE ANÁLISIS FILOGENÉTICO”

*Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor
en Ciencias Médicas*

Autor: Dra. Sonia Resik Aguirre, MsC.

Asesor: Lic. Carlos A. Duarte Cano, DrC.

2008

“La aparición del SIDA, del Ébola y de otros agentes originarios del bosque húmedo parece ser consecuencia natural de la destrucción de la biosfera tropical...En cierto modo la Tierra reacciona inmunológicamente contra la especie humana. Está comenzando a reaccionar contra el parásito humano, contra la creciente infección de personas, contra los puntos muertos de cemento que hay por todo el planeta, los cancerosos vertederos de Europa, Japón y Estados Unidos, atiborrados de primates que se replican, colonias que crecen, se extienden y amenazan con producir extinciones masivas de la biosfera. Tal vez a la biosfera no le “guste” que haya cinco mil millones de seres humanos. También podría decirse que la extremada amplificación de la especie humana, acaecida en los últimos cien años, ha producido de repente una inmensa cantidad de carne que está en todas partes; y podría añadirse que tal vez no sea capaz de defenderse por sí sola de una forma de vida que pudiera querer consumirla. La naturaleza tiene formas muy curiosas de recuperar el equilibrio. El bosque húmedo tiene sus propias defensas. El sistema inmunitario de la Tierra, por así decirlo, ha “visto” la presencia de la especie humana y quiere desembarazarse de ella. Tal vez el SIDA sea el primer paso de este ajuste de cuentas natural. Comienzo a preguntarme, con la sensación de tener la coartada, si el SIDA, lejos de ser el final, no será el principio. Sospecho que el SIDA no es una casualidad ni un hecho aislado, sino un paso en el proceso natural de hostigamiento contra mi especie, y que tal vez no sea el SIDA sino la primera manifestación del poder de la naturaleza. Si la especie humana puede mantener verdaderamente a una población de cinco mil millones de personas o más sin que se produzca un encontronazo con un virus caliente es algo que está por ver. Que está por contestar. La respuesta a la pregunta se encuentra oculta en los laberintos de los ecosistemas tropicales. Para un virus del bosque húmedo, cinco mil millones de personas representan una inmensa cantidad de territorio por explorar, indefenso y desprotegido. Si un virus homicida se traslada por el aire, dará la vuelta al mundo en cosa de semanas o meses, sin que haya tiempo para preparar vacunas (se tarda unos diez años en desarrollar cada nueva vacuna). Se diría que la especie humana tiene que esperar a que se desencadene la epidemia. El SIDA es la venganza del bosque húmedo. Pero sólo es el primer acto”.

Richard Preston, “*Zona Caliente*”

SÍNTESIS

El análisis de la relación filogenética de diferentes aislamientos del VIH-1 constituye una importante herramienta en el estudio y seguimiento de la pandemia. Los análisis de secuencias pueden ser usados para evaluar cadenas de transmisión. Aunque algunas cadenas de transmisión de tamaño relativamente limitado, han sido identificadas en pequeñas cohortes mediante una búsqueda de contactos y confirmadas por análisis filogenético, la consistencia entre la supuesta relación epidemiológica y la relación filogenética, no ha sido investigada hasta la fecha en grandes cohortes. La epidemia cubana ofrece una oportunidad única en este sentido. Se examinaron retrospectivamente muestras de suero y plasma de pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 de dos cadenas de transmisión establecidas mediante búsqueda de contactos (38 y 90 individuos, respectivamente). Se amplificaron regiones de los genes *gag* y *env* de VIH-1, a partir de las muestras conservadas en congelación, mediante RT-RCP y se determinó la secuencia de cada producto amplificado. Se encontró que las secuencias nucleotídicas de una de las cadenas de transmisión se agrupaban consistentemente con la relación

epidemiológica reportada. En la otra cadena se detectó la presencia de múltiples subtipos y recombinantes de VIH-1. Los grandes lapsos de tiempo entre el momento de la transmisión y el momento de la toma de la muestra utilizada para la secuenciación, la superinfección y la información epidemiológica incompleta son factores que pueden limitar la concordancia entre la reconstrucción filogenética y la relación epidemiológica reportada.

Por la pureza de su amor,
Por su eterna alegría,
Por ser mi razón de ser:
A mi hijo

Porque aunque pasan los años,
siguen siendo mis más fieles maestros:
A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Para llegar al feliz término de una tesis doctoral, son muchas las personas que a lo largo de la vida merecen nuestro agradecimiento. A cada uno de esos seres que desde la niñez contribuyeron a mi formación – como la maestra de primaria María Fleitas y el profe Carrasco, o la severa “teacher” de la Lenin -, sería imposible nombrarlos sin exponerme a omisiones imperdonables. Por lo tanto: a quienes desde la infancia trazaron esas pautas de mi adultez, eterna gratitud.

La ética y el rigor profesional como médico, me han acompañado en el ejemplo de mi padre, tanto como la vocación. Notables profesores como San Martín, Blanco Rabasa o Riverón, moldearon ese gusto por las ciencias médicas y en su ejemplo de humanistas ajenos al mercadeo, reafirmaron mi voluntad de ayudar al prójimo incondicionalmente.

El Profesor Pedro Más Lago, “Virólogo de virólogos”, me abrió las puertas de un universo científico fascinante que apareció en mi vida - para serle fiel a la verdad -, desde aquellas incursiones por los laboratorios del Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología, cuando la Doctora Miriam Berroa conquistaba mi tranquilidad con las imágenes insospechadas que aparecían bajo el lente de su microscopio. Gracias al tío Pedro, lo que en un principio era lo más parecido a un juego infantil, se transformó en una pasión de vida, que me ha impuesto una gran cantidad de retos, entonces imposibles de

avizorar. Los azares del destino nos colocaron en un mismo camino. Al inicio por vínculos casi familiares, luego como profesor y tutor de la especialidad, y por último, como ese *Alter ego* indispensable para cualquier obra de creación científica.

En el Instituto de Medicina Tropical - el único sitio donde me he desempeñado profesionalmente desde mi graduación en 1987 – crecí como ser humano y como especialista. Cada error – de los cuales se aprende más y mejor – y cada logro científico en este camino de tantos años, lo debo a quienes han confiado en mí y me dieron la posibilidad de desarrollarme, desde los que en sus modestos pero necesarios puestos nos apoyan para consagrarnos a la ciencia, hasta los más eminentes profesores y científicos.

Del gran grupo humano que representa este entrañable colectivo, debo distinguir a todos mis compañeros del Departamento de Virología y en particular, a mis colegas de los laboratorios de Diagnóstico, Enfermedades de Transmisión Sexual y Enterovirus. Ellas y ellos han debido “compartirme” pacientemente – por aquello que repetía Cuca, la inolvidable técnica de nuestro laboratorio, quien confesaba una y otra vez que me prefería, pero compartida. De todas y todos aprendo a diario, pues forman parte de mi familia afectiva.

A Lupe, mi jefa, profesora y amiga de los buenos y malos tiempos, de quien se aprende perseverancia, amor por el trabajo y rigor científico.

A los profesores Clarita, Susana, Goyenechea y Luis Morier, mi eterno agradecimiento por sus consejos y sabiduría.

A la Dra. Alina Llop, quien forma parte de mi querido universo filial mucho antes de decidirme por la Medicina, debo el estímulo que emana de su estirpe de revolucionaria y humanista, de su valentía política y su admirable compromiso con la Ciencia Cubana. Ella también y para mi bien, ha representado esa conciencia crítica tan necesaria para enfrentarnos honestamente a nuestros errores.

Al Profesor Doctor Gustavo Kourí, porque desde su responsabilidad, ejemplo y entrega nos ha permitido integrarnos a este colectivo.

Para la consecución de esta tesis fue decisiva la ayuda de la Dra. Jean Handy, el Dr. Ronald Swanstrom y la Dra. LiHua Ping de la Universidad de Carolina del Norte, en Estados Unidos, quienes han demostrado la viable posibilidad de unas relaciones justas y normales entre nuestros países, así como la naturaleza universal de las ciencias, para las cuales nunca han existido fronteras. También merecen mi agradecimiento los Doctores Philippe Lemey y Anne-Mieke Vanndamme del Instituto Rega para Investigaciones Médicas de Bélgica.

Al Doctor Carlos Duarte, mi asesor y más, mi amigo.

A los doctores Jorge Pérez y José Joanes, por su invaluable ayuda.

Con sus acotaciones y apuntes oportunos, contribuyeron al acabado de esta tesis las doctoras Virginia Capó, Clara Savón, Alina Llop, el Doctor Benito Pérez Maza y la Licenciada Lisette Sánchez.

Los oponentes de la predefensa jugaron un papel fundamental en la redacción definitiva. Por eso, mi gratitud para el Doctor Santiago Dueñas y la Doctora Alina Alerm, quien extremó su revisión al detalle e hizo gala de su magisterio.

A mi cuñado Pedrito, por la asistencia especializada en la edición de los gráficos.

A Vivian, Ariel y Cuca, los de mi laboratorio, por la colaboración y el cuidado de la retaguardia.

A los compañeros de Docencia, especialmente a Maribel, por su dulzura y espíritu de cooperación, y a Lázaro y Armandito, por decir siempre sí.

A Raúl por los sueños compartidos.

A mis amigos, los de siempre y los que hoy me acompañan, el agradecimiento por concederme un espacio importante en sus vidas.

A Celina quien está siempre dispuesta a tenderme una mano, con esa admirable ternura e implacable paciencia.

A mi hermana, quien nació para llenar un espacio vital de mi ser, le agradezco los momentos vividos y el siempre estar ahí, justo cuando se le necesita. Su risa y por qué no, de vez en cuando el enfado. Su amor

incondicional y su ejemplo como profesional y ser humano. La dedicación amorosa a su más preciado tesoro, Pablito.

A mi padre, el principal responsable de mi vocación médica, el ejemplo insuperable de ética, principios revolucionarios y consagración desinteresada a los demás, que me ofrece el amor infinito propio de una paternidad consecuente. Mi papá ha sido el paradigma, el modelo de hombre al cual acercarme todos los días. Un sabio consejero, que con la inteligencia y la justeza ha determinado en mis más importantes decisiones.

A mi madre, cuya inmensa entrega a la familia me permitió crecerme humana y profesionalmente, sin posponer nada, sabiéndola siempre presta a ayudarme. Su propio ejemplo como especialista en las ciencias psicopedagógicas, ha servido de inspiración para una constante búsqueda del conocimiento. Su amor incondicional está presente a diario en los más pequeños detalles, tanto como en este ejercicio académico, por cuyo término batalló a cada instante. Mi gratitud más honda por haber sido sostén de cada paso y abuela amantísima para mi hijo.

A mi hijo, la razón de mi ser y la eterna sonrisa de mis días. El tiempo que no pude dedicarle es el mayor lamento de esta tesis. Pero sé que dada su inteligencia y madurez, ninguna ausencia ha mellado esa especial sensibilidad y entendimiento de cualquier sacrificio. Es casi un adulto ya y espero que en un futuro no muy lejano, sea un profesional consagrado y un hombre de bien: ese será mi más logrado resultado científico.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Antecedentes	2
I.2 Hipótesis de trabajo	7
I.3 Objetivos	7
I.4 Novedad científica	8
I.5 Valor teórico y práctico	9
I.6 Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis	10
I.7 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis	11
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
II.1 Historia	14
II.2 Clasificación	16
II.3 Estructura	18
II.4 Genoma	21
II.5 Ciclo de vida del VIH-1	23
II.6 Historia natural de la enfermedad	28
II.7 Epidemiología molecular del VIH	31
II.7.1 VIH-1	32
II.7.1.1 Recombinantes inter-subtipos del VIH-1	33

	Pág.
II.7.1.2 Recombinantes inter-grupos del VIH-1	35
II.7.1.3 Distribución mundial del VIH-1	35
II.7.2 VIH-2	38
II.7.3 Origen del VIH	39
II.7.4 Procesos evolutivos	45
II.7.5 Recombinación y diversidad del VIH	46
II.8 Epidemiología	51
II.8.1 Epidemiología del VIH en Cuba	52

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Muestras clínicas	54
III.2 Oligonucleótidos	56
III.3 Extracción de ARN	58
III.4 Reverso Transcripción	59
III.4.1 Optimización del paso de Reverso Transcripción en muestras de suero conservadas a -20°C	59
III.4.1.1 Procedimiento de Reverso Transcripción utilizando la enzima Reverse Transcriptase AMV	60
III.4.1.2 Procedimiento de Reverso Transcripción utilizando la enzima RT SensiScript	61
III.4.1.3 Análisis estadístico	61
III.4.2 Procedimiento de Reverso Transcripción utilizado en el estudio de las muestras de suero y plasma de los pacientes de las cadenas epidemiológicas	62
III.5 Reacción en cadena de la polimerasa semi-anidada y anidada	62
III.6 Detección del producto amplificado	62
III.7 Purificación del producto amplificado	63
III.8 Secuenciación nucleotídica automatizada	64

	Pág.
III.9 Electroforesis	65
III.10 Métodos empleados para analizar y comparar secuencias	65
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
IV.1 Obtención de secuencias de ARN de VIH-1	69
IV.2 Reconstrucción filogenética de las Cadenas de Transmisión de VIH-1	75
IV.2.1 Cadena de Transmisión 1	77
IV.2.2 Cadena de Transmisión 2	92
IV.3 Análisis de recombinantes	98
IV.4 Determinación de la influencia del tiempo que media entre la transmisión y el muestreo en análisis de la evolución del VIH-1	110
V. CONCLUSIONES	117
VI. RECOMENDACIONES	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

El VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) es probablemente el causante de la más significativa infección viral en el hombre de los últimos tiempos (Hallet y Garnett, 2006). En correspondencia, ha sido el virus más investigado y trabajado por especialistas de todo el mundo, en un corto período de tiempo.

El VIH es el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y fue descrito por primera vez en 1981, en la ciudad norteamericana de Los Ángeles. Desde entonces, se ha visto cómo una enfermedad que en un principio fue reportada en países desarrollados, en hombres que practican sexo con hombres y usuarios de drogas inyectables, se transformó en una pandemia que afecta a millones de adultos y niños de todos los continentes (Torres y cols., 2000).

Desde el descubrimiento del VIH, 25 millones de personas han muerto de SIDA en todo el orbe (http://www.unaids.org/en/HIV_data/2006GlobalReport/). El pasado año causó 2,9 millones de muertes entre la población adulta e infantil y

se notificaron 4,3 millones de nuevas infecciones. África Subsahariana constituye el área geográfica más afectada con 24,7 millones de seropositivos.

Contener esta pandemia ha sido imposible hasta el momento, entre otras razones, porque el virus evoluciona rápidamente y exhibe una amplia diversidad genética. El VIH experimenta una alta tasa de mutación al carecer su Reverso Transcriptasa (RT) de actividad exonucleasa correctora; tiene una dinámica de replicación incrementada y una alta frecuencia de recombinación y selección natural (Preston y cols., 1988).

A pesar del conocimiento de estas verdades científicas, insistir en el estudio del modo evolutivo del VIH, es una prioridad debido a la voluminosa información filogenética expresada en su diversidad. El análisis de la relación filogenética de diferentes aislamientos de este virus constituye una importante herramienta en el estudio y seguimiento de la pandemia.

Los análisis filogenéticos son empleados generalmente en dos direcciones: para evidenciar relación epidemiológica a través de la relación filogenética y para aplicarlos en casos de transmisiones conocidas en función de valorar la fortaleza de los métodos utilizados.

Ejemplos del primer uso pueden ser, la relación de la transmisión vertical del Virus de Inmunodeficiencia del chimpancé (VIScpz) con el origen del VIH (Hahn

y cols., 2000) y el evento de transmisión que introdujo el grupo M del VIH-1 (Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1), en la población humana, alrededor de 1930 (Korber y cols., 2000; Salemi y cols., 2001). Se ha podido probar a nivel macro, patrones globales de transmisión de subtipos específicos del VIH (Hue y cols., 2005), en grupos de riesgo relacionados epidemiológicamente, como drogadictos endovenosos *vs* hombres que practican sexo con hombres, hombres heterosexuales vs mujeres heterosexuales (Subbarao y cols., 1998, 2000; Yu y cols., 1999; Nguyen y cols., 2002; Herring y cols., 2003; Lim y cols., 2004). Asimismo, en una escala epidemiológica más pequeña, la detección de virus relacionados filogenéticamente nos permite inferir patrones locales de una o unas pocas introducciones de VIH-1 en determinada población, para explicar infecciones relacionadas (Holmes y cols., 1995; Yirrell y cols., 1997; Hayman y cols., 2001). Varios de estos estudios han tenido implicaciones legales directas pues se confirman vínculos epidemiológicos entre individuos, como resultado de transmisión sexual (Albert y cols., 1994; Birch y cols., 2000; Robbins y cols., 2002; Trask y cols., 2002; Pistello y cols., 2004) y de transmisión relacionada con procedimientos médicos (Ou y cols., 1992; Jaffe y cols., 1994; Crandall, 1995; Holmes y cols., 1993; Blanchard y cols., 1998; Katzenstein y cols., 1999; Goujon y cols., 2000; Bredell y cols., 2003; Pistello y cols., 2004). Con estos

análisis ha sido posible descartar una relación epidemiológica directa de transmisión (Holmes y cols., 1993; Yirrell y cols., 1998; Bredell y cols., 2003).

Del segundo uso de los estudios filogenéticos (en función de valorar la fortaleza de los métodos utilizados) se destaca una de las primeras investigaciones donde la metodología empleada consiguió confirmar transmisiones (Burger y cols., 1991). Estudios posteriores utilizaron cadenas epidemiológicas de transmisión conocidas para comparar diferentes metodologías y revelar características de la evolución del VIH-1 (Leitner y cols., 1996; 1997; Leitner y Albert, 1999; Paraskevis y cols., 2004; Mikhail y cols., 2005).

Aunque algunas cadenas de transmisión de tamaño relativamente limitado, han sido identificadas en pequeñas cohortes mediante una búsqueda de contactos y confirmadas por análisis filogenético, la consistencia entre la supuesta relación epidemiológica y la relación filogenética, no ha sido investigada en grandes cohortes. La epidemia cubana ofrece una oportunidad única en este sentido.

El VIH-1 fue introducido en Cuba a inicios de la década de los ochenta, del siglo pasado, fundamentalmente desde África (Pérez y cols., 1993). Hasta el 31 de diciembre de 2007, fueron diagnosticados 9 304 individuos seropositivos al VIH. De ellos, 1 804 son mujeres y 7 500 hombres. El 84,1% de los hombres, son hombres que tienen sexo con hombres. Se reportan 1582 muertes a causa del

SIDA. Estas cifras hablan sobre la dimensión de la epidemia cubana y la sitúa como pequeña. La prevalencia al cierre de 2007 para la población de 15 a 49 años fue de 0,09 %, según datos suministrados por el Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual/VIH/SIDA del Ministerio de Salud Pública de Cuba y la epidemia se caracteriza por la circulación de una diversidad de subtipos y Formas Recombinantes Circulantes (Rolo y cols., 1995; Torres y cols., 2000; Gomez y cols., 2001; Cuevas y cols., 2002; de Arazoza y cols., 2003; Thomson y cols., 2005).

El sistema nacional de salud cubano cuenta con una amplia cobertura para la atención del paciente seropositivo al VIH. La respuesta del Sistema Nacional de Salud a la aparición de la epidemia contempla un tamizaje amplio de la población en base al riesgo, la búsqueda activa de contactos de los pacientes infectados y el tratamiento y cuidado centralizado (Perez y cols., 2004). La información epidemiológica obtenida de la búsqueda de contactos sirve de base para la descripción de varias cadenas de transmisión, algunas de ellas de un tamaño considerable.

El estudio que a continuación exponemos muestra el análisis filogenético de secuencias nucleotídicas parciales, de los genes *gag* y *env*, en dos cadenas grandes de transmisión definidas epidemiológicamente en nuestro país. Nos

proponemos investigar la consistencia entre la supuesta relación epidemiológica y la relación filogenética, que como apuntamos anteriormente, no ha sido investigada en grandes cohortes.

I.2 Hipótesis de trabajo

Las características filogenéticas del VIH-1 evaluadas a partir de las secuencias nucleotídicas de fragmentos de los genes *gag* y *env* permiten confirmar la relación epidemiológica de cadenas de transmisión en infectados cubanos.

I.3 Objetivos

General

Contribuir al conocimiento de la epidemiología molecular del VIH-1 en Cuba.

Específicos

1. Determinar subtipos y formas recombinantes de los virus secuenciados en muestras de suero o plasma de pacientes infectados con el VIH-1 y epidemiológicamente relacionados.
2. Valorar la asociación entre la filogenia del VIH-1 y las cadenas epidemiológicas de transmisión, según las secuencias nucleotídicas de fragmentos de los genes *gag* y *env*.
3. Determinar la influencia del tiempo transcurrido desde la infección hasta el

momento en que se toma la muestra sobre las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de genes de VIH-1 utilizados para evaluar la asociación filogenética.

4. Identificar los factores limitantes de los métodos filogenéticos y de la búsqueda de contactos en el análisis de cadenas de transmisión de VIH-1.

I.4 Novedad científica

- Se estudian mediante técnicas de análisis filogenéticos cadenas de transmisión epidemiológicas de VIH-1 con un mayor número de individuos incluidos y generaciones de transmisión que las reportadas en el mundo hasta la fecha.
- Constituye el primer estudio filogenético de cadenas de transmisión epidemiológicas de VIH-1 en Cuba.
- Se valoran, por primera vez en Cuba, limitaciones de los métodos filogenéticos y la búsqueda de contactos en el análisis de cadenas epidemiológicas de transmisión de VIH-1.
- Por primera vez en Cuba se reportan recombinantes intergen *gag/env* e intragen *gag* mediante estudios de secuenciación y se corrobora circulación de una segunda generación de recombinante.
- Los resultados de esta tesis han contribuido a esclarecer los mecanismos

evolutivos del VIH-1 en Cuba.

I.5 Valor teórico y práctico

Los resultados obtenidos en este trabajo poseen valor teórico y permiten conocer las limitaciones que la búsqueda de contactos y la metodología filogenética que se utiliza en el análisis de secuencias tienen para estudiar cadenas epidemiológicas de transmisión de VIH-1. Desde el punto de vista práctico, permitieron la introducción en el Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" de programas computarizados útiles para realizar análisis de secuencias y tecnologías filogenéticas de última generación para estudios de evolución y recombinación de VIH-1 y que por extensión pueden favorecer el conocimiento de otros virus. Además, se cuenta con las herramientas necesarias para poder establecer patrones de transmisión verificables mediante una tecnología de avanzada.

Los resultados que conforman esta tesis se presentaron en 10 eventos científicos y están publicados en 7 artículos científicos en revistas nacionales y extranjeras y en el capítulo Retrovirus del libro de Microbiología y Parasitología Médica (Premio de la Crítica Científico-Técnica 2001, Premio Provincial del Ministerio de la Salud Pública, Premio Anual de la Salud 2002 y Ponencia Destacada XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica 2003). Esta investigación

forma parte de un Proyecto Ramal del MINSAP denominado "Contribución al conocimiento de la infección por VIH en Cuba" y fue parte de una colaboración científica entre el Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" y la Escuela de Medicina de la Universidad de Carolina del Norte en Estados Unidos específicamente con el Center for AIDS Research.

I.6 Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis

- **Resik S**, Lemey P, Ping LH, Kouri V, Joanes J, Perez J, Vandamme AM, Swanstrom R. Limitations to contact tracing and phylogenetic analysis in establishing HIV transmission networks in Cuba. *AIDS Res and Human Retrov* 2007, 23: 347-356.
- **Resik S**, Ping L, Barrios J, Hoffman N, Pagan M, Kouri V, Joanes J, Perez J, Swanstrom R. Molecular characterization of HIV-1 transmission networks in Cuba. Medimond International Proceedings XV International AIDS Conference, Medimond Publishing Co. Bologna, Italy. ISBN 88-7587-065-9; E710L5866 pages 43-47, 2004.
- **Resik S**, Ping L, Barrios J, Hoffman N, Pagan M, Kouri V, Joanes J, Perez J, Swanstrom R. Molecular Characterization of HIV-1 Transmission Networks in Cuba. *Int J Infect Dis* 2004, 8: 208.
- **Resik S**, Ping LH, Barrios J, Kourí V, Swanstrom R. Aplicación de la Enzima SensiScript a un sistema RT-RCP para la obtención de ARN de VIH-1 a partir de muestras de suero almacenadas a -20°C durante una década. *Rev Cub Med Tropical* 2003, 55: 213-216.
- **Resik S**, Ping LH, Barrios J, González L, Swanstrom R. Obtención de secuencias de ARN de VIH-1 a partir de muestras de suero almacenadas a -

20°C durante una década. 2002. *Rev Latinoam Microbiol* 44 Suplemento.

- **Resik S**, Ping LH, Hoffman N, Joanes J, Barrios J, Pagan M, Kouri V, García S, Perez J, Swanstrom R. Filogenia del VIH-1: Análisis de cadenas de transmisión epidemiológicas cubanas. 2002. *Rev Latinoam Microbiol* 44 Suplemento.

- **Resik S**. Retrovirus. En: *Microbiología y Parasitología Médicas* (Tomo II). Llop A, Vadés-Dapena M, Zuazo J eds. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2001. p: 279-292.

I.7 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis

- *IV Conferencia Internacional sobre el VIH/SIDA en Cuba, Centroamérica y el Caribe. 19-22 Enero de 2000. Molecular Characterization of Transmission Networks in Cuba. Resik S.*

- *Molecular Sentinel Network Meeting, Adjuntas, Puerto Rico, July 22-23, 2000. HIV/AIDS Epidemic in Cuba. Resik S.*

- *Retroviruses. Mayo 21-26, 2002. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, EUA. Molecular Characterization of Transmission Networks in Cuba. Resik S, Hoffman N, Ping LH, Pagan M, Perez J, Swanstrom R.*

- *XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM), V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, III Congreso de Medicina Tropical. 11-15 Noviembre 2002. La Habana, Cuba. Filogenia del VIH-1: Análisis de cadenas de transmisión epidemiológicas cubanas. Resik S, Ping LH, Hoffman N, Joanes J, Barrios J, Pagan M, Kouri V, García S, Perez J, Swanstrom R. y Obtención de secuencias de ARN de VIH-1 a partir de muestras de suero almacenadas a -20°C durante una década. Resik S, Ping LH, Barrios J, González L, Swanstrom R.*

- *16th World Congress of Sexology. Marzo 2003, Habana, Cuba. Characterization of Transmission Networks in Cuba. Resik S, Ping LH, Kouri V,*

Barrios J, García S, Hoffman N, Pagan M, Joanes J, Perez J, Swanstrom R.

• *II Foro en VIH /SIDA/ITS en América Latina y el Caribe. 7-12 Abril 2003.*

Filogenia de VIH-1: Análisis de cadenas de transmisión epidemiológicas cubanas. **Resik S**, Ping LH, Hoffman N, Joanes J, Barrios J, Kouri V, Perez J, Swanstrom R.

• *Biotecnología Habana 2003. Molecular Characterization of Transmission Networks in Cuba.* **Resik S**.

• *XI International Congress of Infectious Diseases. Cancún. México. 2004.*

Molecular Characterization of HIV-1 Transmission Networks in Cuba. **Resik S**, Ping LH, Hoffman N, Joanes J, Barrios J, Pagan M, Kouri V, García S, Pérez J, Swanstrom R.

• *XV Internacional AIDS Conference. 11-16 July, 2004. Bangkok, Thailand.*

Molecular characterization of transmission networks in Cuba. **Resik S**, Ping LH, Barrios J, Kouri V, García S, Hoffman N, Pagan M, Joanes J, Pérez J, Swanstrom R.

• *12th International Bio Informatics Workshop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology. 10–15 September, 2006. National and Kapodistrian University of Athens, Greece.*

Limitations To Contact Tracing and Phylogenetic Analysis In Establishing HIV-1 Transmission Networks In Cuba. **Resik S**, Lemey P, Ping LH, Kouri V, Joanes J, Perez J, Vandamme AM, Swanstrom R.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Historia

A finales de la década del 70 e inicios de los 80, del siglo pasado, en Estados Unidos y Europa, se reportaron casos de individuos previamente saludables que mostraban síntomas de disfunción inmunológica. Este nuevo e inusual síndrome se caracterizaba por linfadenopatías generalizadas, infecciones oportunistas (Neumonía por *Pneumocystis carinii*, Encefalitis por *Toxoplasma gondii*, Retinitis por Citomegalovirus y Meningitis Criptocócica), así como una variedad de neoplasias malignas en edad y frecuencia inusitada (Linfoma No-Hodgkin y Sarcoma de Kaposi) (Essex y cols., 1983; Gallo y cols., 1983; Quinnan y cols., 1984). En los individuos afectados, un hallazgo común de laboratorio, fue la marcada depleción en sangre periférica del conteo de linfocitos TCD4+ (Freed y cols., 2001).

En junio de 1981, por primera vez, la comunidad médica general reparó en la importancia de la enfermedad que emergía, cuando el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (Centers for Diseases Control, CDC) describió la

existencia en California, de cinco hombres con una severa inmunodeficiencia en el Morbidity and Mortality Weekly Report (CDC, 1981). A esta notificación le siguieron varios informes que reportaban a homosexuales masculinos y usuarios de drogas intravenosas con daños en el sistema inmunológico y linfocitos T, y respondían pobremente a antígenos en ensayos funcionales. Pocos meses después se manifestó que una inmunodeficiencia similar estaba afectando a otros grupos de individuos: hemofílicos, receptores de transfusiones de sangre, inmigrantes haitianos, y más significativamente, los compañeros sexuales y/o niños de miembros de los diferentes grupos de riesgo. (Joncas y cols., 1983).

En 1983, científicos del Instituto Pasteur aislaron en ganglios linfáticos de un individuo asintomático que presentaba adenopatías generalizadas de origen desconocido, un agente al que en sus inicios se le denominó *LAV* (Lymphadenopathy-Associated Virus) (Barr-Sinoussi y cols., 1983). En 1984 el grupo de Robert Gallo (Gallo y cols., 1984) reportó, a partir de un paciente con SIDA, el aislamiento de un retrovirus al que denominaron Virus de la Leucemia Humana de Células T-III (HTLV-III), logrando las primeras evidencias serológicas convincentes que relacionaban al *LAV* con la inmunodeficiencia que padecían los individuos de los grupos de riesgo (Popovic y cols., 1984;

Sarngadharan y cols., 1984).

Este nuevo retrovirus asociado al SIDA, presentaba características morfológicas y genéticas típicas del género *Lentivirus*, denominándose VIH (Coffin, 1995), subsecuentemente VIH-1. En 1986 otro retrovirus relacionado con el VIH-1, pero con características inmunológicas propias y menor patogenicidad, fue aislado de individuos residentes en el oeste de África y se denominó VIH-2 (Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2) (Clavel y cols., 1986).

II.2 Clasificación

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*, que incluye virus que presentan un genoma de ácido ribonucleico (ARN). Los integrantes de esta familia se agrupan teniendo en cuenta la morfología del core del virión. Las partículas virales son esféricas y rodeadas por una envoltura lipídica compuesta por proyecciones de glicoproteínas. Los retrovirus también suelen clasificarse de acuerdo con la apariencia de las partículas maduras y sus precursores, estableciéndose tipos que difieren en las estructuras internas, las glicoproteínas (gp) de superficie y el sitio de ensamblaje de la cápside. Los tipos de partículas son cuatro (A, B, C, D) y el VIH se acerca más a las partículas del tipo C; que se caracterizan por ensamblar su cápside al nivel de la membrana

citoplasmática, pero difieren de otros virus de este mismo tipo en el aspecto tubular de dicha cápside (Lueders y cols., 1977; Harrison y cols., 1996).

Esta clasificación basada en la apariencia ha sido útil para definir parcialmente varios géneros de la familia *Retroviridae*. Actualmente, el número de géneros se ha incrementado en base a novedosos criterios. El Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (Goff, 2001) formuló una nueva clasificación en la que se renombran los géneros. Los *alfaretrovirus*, *betaretrovirus* y *gammaretrovirus* son considerados retrovirus "simples", mientras que los *deltaretrovirus*, *epsilonretrovirus*, *lentivirus*, y *spumavirus* son considerados "complejos".

Los virus "simples", codifican sólo los productos de los genes *gag*, *pro*, *pol*, y *env*, mientras que los virus "complejos" codifican además de para estos productos génicos, para un grupo de pequeñas proteínas regulatorias que tienen un amplio rango de funciones.

El VIH pertenece a la subfamilia *Lentivirinae* que proviene del Latín *lentus* que significa lento. Estos virus persisten y continúan replicándose muchos años antes de aparecer signos de la enfermedad (Janeway y cols., 2001). Los *Lentivirus* se distinguen de los demás *Retrovirus* (Holmes, 2002), por varias características, como son:

- ↳ Poseen seis genes accesorios únicos que codifican proteínas no estructurales.
- ↳ La proteína de unión gp120 se une a la molécula CD4+ expresada en la superficie de los linfocitos T y en las células monocitarias (macrófagos, microglías y células dendríticas), determinando el rango de hospedero celular.
- ↳ Son capaces de replicarse bien en células que no están en proceso de división, como en las que lo están, a diferencia de otros *Retrovirus* que lo hacen solamente en células en división. Esto se debe a la capacidad de cruzar la envoltura nuclear, del complejo de preintegración de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) viral reversotranscrito y las proteínas virales.
- ↳ Causan infección de por vida, asociándose con un determinado número de enfermedades crónicas incluyendo el SIDA, pero sin codificar oncogenes.
- ↳ Son virus estrictamente exógenos y el genoma del hospedero no incluye copias de sus secuencias.

II.3 Estructura

La estructura de la partícula viral refleja los requisitos fundamentales impuestos por la necesidad del virión para la propagación dentro del hospedero. Estos requisitos incluyen la incorporación del genoma viral en partículas estables fuera de las células, reconocimiento y entrada a las células

dianas, replicación del genoma, y la traducción del ARN mensajero viral (ARNm) para producir nuevas proteínas virales.

Las partículas virales están compuestas por 1-2 % de ARN, 35 % de lípidos, y alrededor de un 65 % de proteínas, de las cuales $\frac{3}{4}$ del total corresponden a las proteínas estructurales. El resto está compuesto por las proteínas de la envoltura y en menor grado las enzimas virales reversotranscriptasa, integrasa, proteasa y algunas proteínas celulares (Coffin y cols., 1997).

El VIH es un virión envuelto que al microscopio electrónico se observa como una partícula icosaédrica, con un diámetro entre 100 y 120 nm, similar en talla y morfología a otros *Retrovirus*, con un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 600S (Gonda y cols., 1985; Montagnier y cols., 1984). En la estructura general se pueden definir tres capas: la interna o nucleoide, de forma cónica, formada por la proteína p24, que empaqueta el genoma viral y las enzimas virales; la integrada por la proteína p17 que forma la cápside; y la capa más externa compuesta por la envoltura, en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas virales gp120 y gp41, así como otras proteínas celulares como la β -2 microglobulina y las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y II (Baron, 1996).

La envoltura viral deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera al

salir por gemación. Su composición difiere un poco de la misma, puesto que es rica en esfingomielina y colesterol (Aloia y cols., 1993). El lazo V3 de la glicoproteína gp120, considerada una región hipervariable, es el principal determinante del tropismo viral, el fenotipo y el uso del correceptor (Speck y cols., 1997; Wyatt y cols., 1998; Wyatt y Sodroski, 1998; Nelson y cols., 2000, Nájera y cols., 2002).

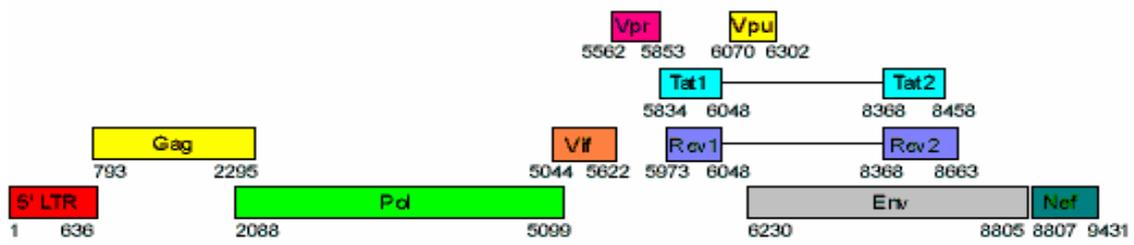
La asociación entre el fenotipo inductor de sincitio y la presencia de aminoácidos cargados positivamente en las posiciones 11 y 25 del lazo V3, se demostró en cepas de los subtipos A, B, C, D, CRF-01 AE y G (Nájera y cols., 2002; Jensen y cols., 2003). Este lazo hipervariable estimula una de las más tempranas respuestas de anticuerpos durante la infección por VIH-1. El dominio central del mismo se identificó como el determinante principal de neutralización de la proteína de envoltura (Javaherian y cols., 1990; Tian y cols., 2002). Se reportó que el escape del VIH-1 a la respuesta del sistema inmune, se asocia con la pérdida *in vivo* de anticuerpos anti-V3 específicos (Tian y cols., 2002; Jensen y cols., 2003). Desafortunadamente, este lazo está sujeto a un amplio rango de mutaciones. Las mutaciones de algunos aminoácidos en esta región pueden afectar la formación de sincitios, la infectividad viral y la neutralización (Nájera y cols., 2002) y la variación de algunos residuos del lazo V3 puede conferir resistencia a los anticuerpos

neutralizantes específicos (Tian y cols., 2002; Jensen y cols., 2003).

II.4 Genoma

El genoma del VIH está formado por dos hebras idénticas de ARN de simple cadena, de polaridad positiva, de aproximadamente 10 kb, a partir de las que se sintetiza el ADN proviral. Cada una de ellas contiene nueve genes flanqueados por regiones LTRs (secuencias terminales largas repetidas, del inglés long terminal repeat sequences), que son de gran importancia para la integración del provirus en el ADN de la célula hospedera y además, contienen sitios de unión para las proteínas de los genes regulatorios que controlan la expresión de los genes virales (Bieniasz y cols., 1998).

Como otros miembros de la familia *Retroviridae*, el VIH posee tres grupos de genes estructurales *gag*, *env* y *pol*, pero durante su evolución, el VIH-1 ha adquirido seis genes adicionales para llevar a cabo funciones que se realizan por proteínas celulares. Algunas de estas proteínas accesorias Vif, Vpr, Vpu y Nef no son necesarias para la replicación en ciertas líneas de células T humanas y la infectividad del virus podría verse afectada, en dependencia de estos genes accesorios y del tipo de célula que infecta (Figura 1). Algunos autores consideran que *in vivo* estos genes podrían ser vitales para la replicación del VIH-1 (Liang y cols., 1997; Kang y cols., 1999).



Fuente: <http://hiv-web.lanl.gov/>

Figura 1. Representación esquemática del genoma del VIH-1

El gen *gag* codifica para las proteínas estructurales del *core*; el *pol* codifica para las enzimas involucradas en la replicación e integración y el *env* codifica para las glicoproteínas de la envoltura (Tabla 1). Los ARNm de *gag* y *pol* son transcritos formando poliproteínas que son escindidas por proteasas virales (codificadas por *pol*) para formar, entonces, proteínas funcionalmente individuales. El producto del gen *env*, gp160, es escindido por una proteasa celular en gp120 y gp41, que son ensambladas en forma de trímero en la envoltura viral (Coffin y cols., 1997).

Tabla 1. Resumen de los genes y proteínas del VIH-1

Gen	Productos Génicos	Descripción	Localización
Gen <i>env</i> (envoltura)	gp160 gp120 gp41	Precursor de gp de envoltura gp externa de envoltura. gp de transmembrana.	Virión
Gen <i>gag</i> (core)	p55 p24 p17 p15, p9, p7	Precursor de proteínas <i>gag</i> . Proteína estructural de la cápside. Proteína matriz. Proteínas <i>gag</i>	Virión
Gen <i>pol</i> (polimerasa)	p66 p51 p31 p15 p11	Reverso transcriptasa. Reverso transcriptasa. Endonucleasa. Proteasa. Integrasa.	Virión
Gen <i>tat</i> (transactivador)	p14	Transactivador de la síntesis del ARN viral	Nucleolo/núcleo
Gen <i>rev</i> (regulador)	p19/20	Regula la expresión del ARNm viral.	Nucleolo/núcleo
Gen <i>vif</i> (factor de infectividad)	p23	Incrementa la infectividad viral.	Golgi?
Gen <i>vpr</i>	p18	Asiste en la replicación viral.	Virión.
Gen <i>nef</i>	p27	Pleitrópico, incluyendo supresión del virus.	Citoplasma/Membrana plasmática
Gen <i>vpu</i>	p16	Involucrado en la liberación del virus.	Membrana.

Fuente: Freed y Martin, 2001

II.5 Ciclo de vida del VIH-1

La entrada del VIH-1 a los linfocitos T CD4+ se produce por una cascada de interacciones moleculares que se suceden entre las glicoproteínas de la envoltura viral y dos receptores celulares específicos (Guillon y cols., 2002; Moulard y cols., 2002). La subunidad externa de la gp120 se une a la molécula

CD4+ (receptor primario) y dicha unión induce cambios conformacionales en la gp120, que exponen o crean determinados sitios específicos de unión (región V3) para receptores de quimoquinas (Wu y cols., 1996; Kwong y cols., 1998; Rizzuto y cols., 1998; Farber y cols., 2002). Se teoriza que la molécula CD4+ concentra los viriones en la superficie de la célula facilitándose la interacción de éstos con los receptores de quimoquinas (Vila-Coro y cols., 2000).

CCR5 y CXCR4 son los segundos receptores o correceptores a los que se une la gp120 (uno u otro). Tras la unión con éstos, se disparan cambios conformacionales en la glicoproteína de transmembrana gp41 que culminan con la inserción del péptido de fusión dentro de la membrana de la célula diana (Lee y cols., 2001).

La comprensión de los mecanismos de interacción de las glicoproteínas de la envoltura viral con sus receptores, se ha enriquecido gracias a la cristalización reciente de la molécula de gp120. A través de estos estudios se ha podido dilucidar la existencia de una cavidad en gp120 que se une a CD4+ y que a diferencia de otros procesos de unión virus-receptor, involucra al esqueleto de la gp120 y no a las cadenas laterales. Esto permite al virus cambiar la estructura de las cadenas laterales para evadir la respuesta inmune sin afectar la unión al CD4+ (Kwong y cols., 1998). Los estudios recientes realizados en

macacos infectados con variantes virales clonadas, han demostrado que la fusogeneidad de la glicoproteína de superficie es una determinante crítica para la rápida progresión a SIDA (Etemad-Moghadam y cols., 2000; 2001).

La fusión de la membrana viral con la celular permite la liberación del genoma viral en el citoplasma celular, para dar inicio a la transcripción inversa del genoma viral (Weissenhorn y cols., 1997; Chan y cols., 1998; Kwong y cols., 2000).

La doble cadena parcial de ADN que se obtiene producto de la transcripción, es transportada a través del citoplasma hacia el núcleo, como componente del Complejo de Preintegración (CPI) que contiene un subconjunto de proteínas de los genes *gag* y *pol*. Este proceso pobremente comprendido, es probable que dependa de factores del hospedero que de forma activa intervienen en el transporte del CPI de la membrana plasmática hasta el poro nuclear. Este eslabón temprano en el ciclo de replicación de los retrovirus requiere indudablemente de la participación de múltiples factores celulares para su culminación satisfactoria (Schwartzberg y cols., 1984).

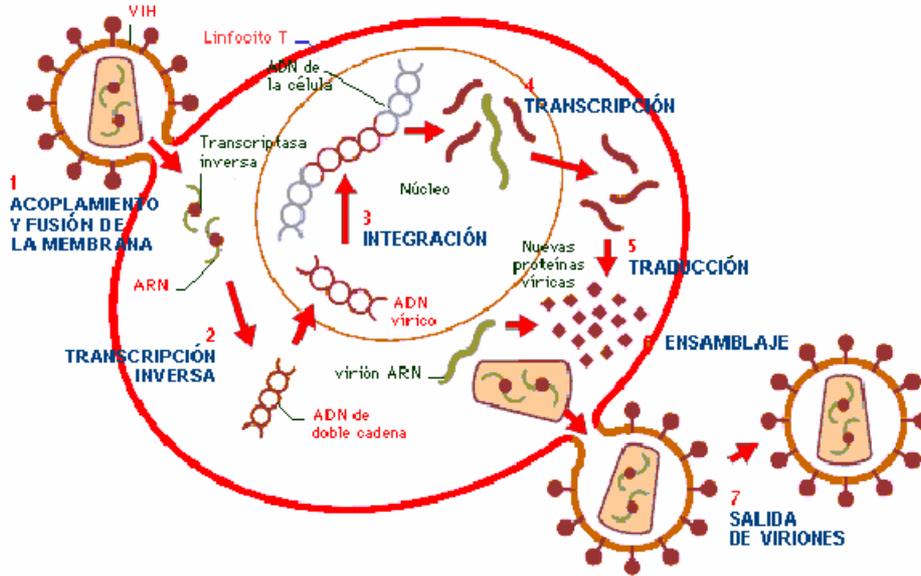
Una vez importado, el CPI es integrado al ADN de la célula infectada, paso importante para la síntesis eficiente del ARN viral y para la producción de la partícula infecciosa. En linfocitos T activados, este CPI sirve como molde para

la ARN polimerasa II, dirigida a la síntesis del ARN viral. La interacción coordinada de las proteínas codificadas por el gen *tat* y las proteínas transactivadoras NF- α B y Sp1, junto con el complejo transcripcional, garantizan la producción de altos niveles de ARN viral. Los transcriptos virales son exportados del núcleo hacia el citoplasma por un mecanismo único de transporte mediado por las proteínas *rev*. La subsiguiente traducción del precursor de *env* gp160 ocurre en el Retículo Endoplasmático, mientras que las poliproteínas *gag* y *gag-pol* son sintetizadas en los ribosomas libres en el citoplasma y son transportadas por una vía independiente a través de la membrana plasmática (Freed y cols., 2001).

En la transcripción del VIH, la proteína viral derivada de *tat* (p14) es un regulador positivo único, favoreciendo la síntesis de transcriptos primarios a partir del promotor del VIH. Subsecuentemente, la maquinaria de procesamiento nucleotídico de la célula hospedera, utiliza como sustrato a estos transcriptos para generar los ARNm completamente procesados, que codifican para las proteínas reguladoras. Otro elemento importante en la transcripción del VIH, es la proteína codificada por *rev* (p19/20), que acciona también sobre secuencias localizadas en el ARN, pero tardíamente durante el ciclo de vida vírico. Ella asegura el balance adecuado entre los mensajeros procesados, parcialmente procesados y no procesados por la maquinaria

celular, de los cuales los dos últimos constituyen el blanco para este factor de regulación post-transcripcional. Antes de que el procesamiento nucleotídico de algunos mensajes primarios proceda en toda su extensión, o bien antes de que se inicie para otros, la proteína p19/20 induce su transporte al citoplasma y a partir de ellos se expresan de forma eficiente las proteínas víricas estructurales (Greene, 1991; Cullen, 1998). La actividad cooperada de las proteínas reguladoras p14 y p19/20 permite el control preciso de la replicación vírica (Chang, y cols., 1990; Cullen, 1990; 1993).

Estas poliproteínas, en asociación con dímeros de ARN genómico, se condensan en la membrana plasmática para formar una zona que se observa al microscopio electrónico como una zona electrón-densa, por la que salen las partículas esféricas inmaduras que contienen las glicoproteínas ya maduras, de envoltura y transmembrana. El proceso proteolítico de las proteínas de *gag* y *pol* por la proteasa viral, tiene lugar durante o inmediatamente después que la partícula viral es liberada al exterior de la célula por un mecanismo de gemación (Pelerson y cols., 1996), adquiriendo las características de virión maduro en el exterior de la misma. En la Figura 2, se resumen en un esquema, los eventos relacionados con la replicación del VIH-1.



Fuente: modificado de www.web-books.com/Infectious/AIDS_HIV.htm

Figura 2. Ciclo de Vida del VIH-1

II.6 Historia natural de la enfermedad

Hace más de una década, existía el criterio de que el período de tiempo entre la infección y la progresión a SIDA, conocido hasta ese momento como *"Período de Latencia Clínica"*, reflejaba un estado subyacente de latencia viral. Se ha corroborado la actividad progresiva del VIH en el tejido linfóide, demostrando que la replicación viral persiste, a un ritmo asombroso, desde el momento exacto de la infección (Wei y cols., 1995; Ho, 1996).

La latencia clínica no se acompaña de una latencia virológica, existiendo una marcada interacción entre el VIH y el sistema inmunológico del paciente durante

este período (Lifson, y cols., 1992; Pantaleo, y cols., 1993).

Las manifestaciones clínicas de la infección por el VIH varían en dependencia del estadio de la enfermedad. En 1993 los Centros para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC, 1992), propuso un sistema de clasificación en estadios de la enfermedad, teniendo en cuenta el conteo de linfocitos T CD4+ y categorías clínicas de la infección (Tabla 2).

Tabla 2. Sistema de clasificación en estadios para la infección por VIH. CDC, 1992.

Conteo de cél. T CD4+	CATEGORÍAS CLÍNICAS		
	A VIH agudo asintomático (primario) ó LPG*	B Sintomático, condiciones no (A) o (C)	C Condiciones indicadoras de SIDA
≥500 µl	A1	B1	C1
200-449 µl	A2	B2	C2
<200 (I conteo de cél. T indicador de SIDA	A3	B3	C3

*LPG: Linfadenopatía Persistente Generalizada

Fuente: CDC, 1992

El conteo de CD4+ es un marcador excelente del grado de inmunodeficiencia y determina el riesgo inmediato de infecciones oportunistas y otras complicaciones relacionadas con la enfermedad (Masur y cols., 1989). La

carga viral es el marcador de más valor pronóstico, no sólo predice la progresión hacia la enfermedad independiente del conteo de CD4+, sino también la trayectoria del conteo de CD4+ (Mellors y cols., 1996; Mellors y cols., 1997).

Durante la infección primaria, se desarrollan altos niveles de viremia que varía desde días hasta semanas (Clark y cols., 1991; Piatak y cols., 1993). Estos eventos a menudo se acompañan de un Síndrome Retroviral Agudo, caracterizado por síntomas inespecíficos como fiebre, fatiga, faringitis, rash, linfadenopatía y frecuentemente meningitis aséptica (Roos y cols., 1992; Kahn y cols., 1998). Una activación vigorosa del sistema inmune proporciona una amplia demanda de linfocitos TCD4+ para soportar la replicación del VIH, aunque datos recientes en animales y humanos sugieren que la activación de células T no es un absoluto requerimiento para la infección (Zhang YJ y cols., 1999; Zhang Z y cols., 1999).

Cuando la viremia alcanza su más alto valor, el conteo de CD4+ disminuye notablemente. En un término de semanas a meses (120 días en una cohorte [Schacker y cols., 1998]) el hospedero logra una vigorosa respuesta inmune, que parcialmente consigue controlar la replicación viral. Existen hipótesis acerca de un balance en la producción y destrucción de viriones, con el

regreso parcial del conteo de 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. De esta forma el hospedero entra en una larga fase asintomática en la que la viremia persiste y billones de virus son producidos y células CD4+ son a diario destruidas. Finalmente, ocurre la progresión de la enfermedad que se caracteriza por un constante aumento de la viremia, la disminución del conteo de CD4+ y por último, una profunda inmunosupresión (Lyles y cols., 2000).

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) (de Wolf, y cols., 1997). Entre un 5%-10% permanecen asintomáticos a los 10-15 años de la infección y mantienen una cifra de linfocitos CD4 por encima de 500/mm³ (enfermos no progresores a largo plazo) (Buchbinder, y cols., 1994). El resto de los pacientes (progresores normales) desarrollan el SIDA alrededor de los 10 años de infectados (Koup, y cols., 1994).

II.7 Epidemiología molecular del VIH

Basado en el análisis filogenético de numerosos aislamientos virales de diferentes áreas geográficas, el VIH se divide en tipos (VIH-1 y VIH-2), grupos, subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (FRC) y formas

recombinantes únicas (FRU) (Robertson y cols., 1995; Jetzt y cols., 2000; Peeters, 2000; Thomson y cols., 2002b).

II.7.1 VIH-1

En la clasificación que se utiliza actualmente (Robertson y cols., 2000) se reconocen tres grupos filogenéticos dentro del VIH-1: M (principal, del inglés main), O (externo, del inglés outlier) y N (no M-noO del inglés non-M non-O). Existen subtipos del VIH-1 del grupo M: A-D, F-H, I y K. Los subtipos forman agrupaciones más o menos equidistantes unas de otras, en un árbol filogenético (McCutchan, 2000; Peeters y Sharp, 2000; Robertson y cols., 2000; Spira y cols., 2003; Stebbing y cols., 2003; Apetrei y cols., 2004a). Apoyándose en esta definición, queda claro que los subtipos B y D deberían ser considerados como sub-subtipos, pero se hace muy difícil cambiar la nomenclatura, sin que medie un consenso, una vez que es aceptada por la comunidad científica y utilizada convencionalmente (Robertson y cols., 2000; Stebbing y cols., 2003). En los subtipos A y F se distinguen sub-subtipos designados como A1 y A2, y F1 y F2. Cada par de sub-subtipos está más estrechamente relacionado entre sí que con otros subtipos (Triques y cols., 1999; Gao y cols., 2001).

Los grupos O y N del VIH-1, los cuales son genéticamente muy divergentes del grupo M, representan menos de un 5 % de las infecciones en el mundo y casi

exclusivamente han sido detectados en África Centro-oeste (Peeters y cols., 1997; Simon y cols., 1998; Lemey y cols., 2004; Roques y cols., 2004). No se han definido subtipos dentro del grupo O tal vez debido a que sólo pocas cepas del grupo N han sido secuenciadas y por tanto, no existen reportes de subtipos hasta la fecha (Kandathil y cols., 2005). El grupo O ha sido identificado principalmente de personas con vínculo epidemiológico, en Camerún y algunos países vecinos (Rayfield y cols., 1996; Peeters y cols., 1997). La infección por el grupo N del VIH-1 ha sido solamente reconocida en Camerún (Robertson y cols., 1995; Bodelle y cols., 2004; Roques y cols., 2004), un país endémico para el VIH-1, con todos los grupos mayores en co-circulación (Fonjungo y cols., 2000; McCutchan, 2000; Peeters y Sharp, 2000).

II.7.1.1 Recombinantes inter-subtipos del VIH-1

Se identifican dos tipos de formas recombinantes: las circulantes (FRC) y las únicas (FRU). Hay al menos 34 FRC identificadas hasta la fecha (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db>). Por definición, el genoma de cada FRC debe parecerse entre cepas con similares puntos de ruptura que reflejen el ancestro común de los mismos eventos de recombinación (Robertson y cols., 2000). Cada FRC es designada por un número identificador, con letras que indican los subtipos involucrados. Las letras son desplazadas por "cpx" (complejo, del inglés complex), que denota complejidad si más de dos subtipos

están involucrados (Peeters, 2000; Robertson y cols., 2000). Una gran mayoría de las FRC son genomas recombinantes inter-subtipos altamente complejos, algunos extremadamente estables y otros que tienen una apariencia de "retazos" debido a los numerosos puntos de entrecruzamiento (Peeters, 2000). Hasta la fecha, las FRC han sido identificadas en casi todas las regiones del mundo en que dos o más subtipos co-circulan y pueden representar más del 10 % de las nuevas infecciones por VIH-1 (McCutchan, 2000; Peeters, 2000; Peeters y Sharp, 2000; Spira y cols., 2003; Apetrei y cols., 2004a).

Conjuntamente con las FRC se han reportado varias cepas de VIH-1 con estructuras de mosaico únicas. Estas formas se conocen como FRU y no han mostrado ninguna evidencia de diseminación epidemiológica. Algunos autores consideran que se desarrollan a partir de recombinaciones secundarias de FRC (Thomson y cols., 2002b; Wilbe y cols., 2002; Yang y cols., 2002; Mamadou y cols., 2003).

Los subtipos de la mayoría de las cepas de VIH-1 pueden ser determinados por el análisis de la secuencia de cualquiera de las regiones genómicas. La divergencia nucleotídica inter-subtipo puede ser de 20, 15 y 25 % para *gag*, *pol* y *env*, respectivamente (Turner y cols., 1999). El subtipaje a partir de una única región del genoma, debe realizarse cautelosamente porque pueden perderse cepas recombinantes. Para definir un nuevo subtipo, sub-subtipo o FRC, deben

identificarse cepas representativas al menos, en tres individuos que no tengan vínculo epidemiológico. La estructura de mosaico tiene que coincidir y la consistencia del agrupamiento filogenético debe caracterizarse. Al menos en dos de las cepas, el genoma debe secuenciarse casi en su totalidad (≥ 8 Kb) (Nájera y cols., 2002).

II.7.1.2 Recombinantes inter-grupos del VIH-1

La recombinación entre cepas de linajes distantes contribuye sustancialmente con la aparición de nuevas variantes de VIH-1 y tiene importantes consecuencias. La recombinación entre los grupos M y O del VIH-1 ha sido reportada en Camerún (Peeters y cols., 1999; Takehisa y cols., 1999).

Los análisis detallados de dos virus del grupo N han sugerido que ellos son el resultado de un evento de recombinación entre un virus parecido al VIScpz y un virus parecido al VIH-1 (Corbet y cols., 2000).

II.7.1.3 Distribución mundial del VIH-1

La distribución geográfica de los subtipos es dinámica e impredecible. La mezcla de variantes del VIH-1 es inevitable. Los virus recombinantes han contribuido sustancialmente con la pandemia y la proporción de generación de virus recombinantes continuará incrementándose, a medida que los diferentes subtipos se diseminen globalmente (Peeters, 2000).

Incluso, los virus recombinantes se recombinan entre ellos, lo cual presupone la

evolución y diseminación de una segunda generación de recombinantes (Yang y cols., 2003). A nivel mundial, los subtipos más prevalentes del VIH-1 son el C (47%), A (27,2%), B (12,3%), D (5,3%) y la FRC CRF01_AE (3,2%) (Osmanov y cols., 2002; Takebe y cols., 2004). (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Distribución geográfica de los grupos y subtipos no recombinantes de VIH-1

Grupo	Subtipo no recombinante	Distribución geográfica
M	A	África Este, Oeste y Central, Europa del Este y Asia Central
	B	América del Norte, América del Sur, África del Norte, Este y Central, Medio Oriente, Europa, Australia, Nueva Zelanda, Japón, China, Corea, Filipina y Península de Malay
	C	India, Brasil, África Este y del Sur, Nepal y China
	D	África Central, Oeste y Este, Europa del Este y Asia Central
	F	África Central y Este, América Latina, Caribe y América del Norte
	G	África Oeste, Central y Norte, Medio Oriente, Europa del Este, Taiwán y Corea
	H	África Central, Europa del Este y Asia Central
O	J	África Central y Oeste
	K	Camerún, República Democrática del Congo
O	-	África Oeste (Camerún, Gabón, Níger, Nigeria, Senegal, Y Togo), Francia y Noruega
N	-	Camerún

Fuente: <http://hiv-web.lanl.gov/>

Tabla 4. Distribución geográfica de las FRC de VIH-1

Nombre	Cepa de Referencia	Subtipos	Distribución geográfica
CRF01_AE	CM240	A, E	Región del Mekong y Península de Malasia, África Central, EUA
CRF02_AG	IbNG	A, G	África Central y Oeste
CRF03_AB	Kal153	A, B	Rusia y Ucrania
CRF04_cpx	94CY032	A, G, H, K, U	Chipre y Grecia
CRF05_DF	VI1310	D, F	Bélgica, República Democrática del Congo
CRF06_cpx	BFP90	A, G, J, K	Burkina Faso, Malí
CRF07_BC	CN54	B', C	China
CRF08_BC	GX-6F	B', C	Sudeste de China
CRF09_cpx	96GH2911	CRF02,A,U	África Oeste, EUA
CRF10_CD	TZBF061	C, D	Tanzania
CRF11_cpx	GR17	A, CRF01, G, J	Camerún, África Central, Gabón, República Democrática del Congo
CRF12_BF	ARMA159	B, F	Argentina, Uruguay
CRF13_cpx	96CM-1849	A, CRF01, G, J,U	Camerún
CRF14_BG	X397	B, G	Europa Oriental
CRF15_01B	99TH.MU2079	CRF01, B	Tailandia
CRF16_A2D	KISII5009	A2, D	Kenya, Corea del Sur y Argentina
CRF17_BF	ARMA038	B,F	Argentina
CRF18_cpx	CU76	A1,F,G,H,K,U	Cuba
CRF19_cpx	CU7	A1,D,G	Cuba
CRF20_BG	CB228	B,G	Cuba
CRF21_A2D	99KE_KER2003	A2,D	Kenya
CRF22_01A1	CM53122	CRF01,A1	Camerún
CRF23_BG	CB118	B,G	Cuba
CRF24_BG	CB378	B,G	Cuba

CRF25_cpx	02CM_1918LE	A,G,U	Camerún
CRF26_AU	Pendiente	A,U	Pendiente
CRF27	Pendiente	Pendiente	Pendiente
CRF28_BF	BREPM12609	B,F	Brasil
CRF29_BF	BREPM16704	B,F	Brasil
CRF30_0206	00NE36	CRF02,CRF06	Niger
CRF31_BC	04BR142	B,C	Brasil
CRF32_06A1	EE0369	CRF06,A1	Estonia
CRF33_01B	DQ366659	CRF01,B	Malasia
CRF34_01B	Pendiente	CRF01,B	Tailandia

Fuente: <http://hiv-web.lanl.gov/>

La más alta diversidad del VIH-1 se encuentra en África Central y Sub-Sahariana, donde todos los subtipos y FRC han sido identificados. Ello sustenta la hipótesis de que África es la fuente de la actual pandemia. Aunque la prevalencia exacta de cepas recombinantes no es conocida, datos preliminares muestran que la proporción de cepas discordantes gag/env varía desde menos de un 10 % a un 40 % en África y de un 10 % a un 30 %, en algunas partes de Asia, incluyendo Myanmar central y la parte oeste de la provincia de Yunán, en China (Kusagawa y cols., 1998; McCutchan y cols., 1999; Motomura y cols., 2000; Vidal y cols., 2000; Yang y cols., 2002; Motomura y cols., 2003; Takebe y cols., 2003).

II.7.2 VIH-2

Tanto la epidemiología como la filogenia molecular del VIH-2 se conocen menos que la del grupo M del VIH-1 (de Cock y cols., 1993; Kanki y cols., 1997; Lemey

y cols., 2003; Apetrei y cols., 2004 a y b). Se han descrito siete subtipos (A-G) del VIH-2, siendo los predominantes el A y el B (Peeters, 2000; Damond y cols., 2004). El subtipo A es más frecuente en la parte oeste de África del Este (Senegal y Guinea Bissau) y el subtipo B predomina en Costa de Marfil (Kanki y cols., 1997; Schim van der Loeff y cols., 1999; Pieniazek y cols., 1999; Reeves y cols., 2002; Lemey y cols., 2003; Damond y cols., 2004). Los otros subtipos han sido documentados solamente en pocos individuos. Los subtipos C, D, E y F se encontraron en áreas rurales de Sierra Leona y Liberia, y el subtipo G en Costa de Marfil (Kanki y cols., 1997; Schim van der Loeff y cols., 1999; Damond y cols., 2004). Las infecciones duales con VIH-1 y VIH-2 han sido frecuentemente reportadas en regiones donde ambos virus circulan (de Cock y cols., 1993; Kanki y cols., 1997; Peeters, 2000), pero no se han descrito recombinantes entre ellos.

II.7.3 Origen del VIH

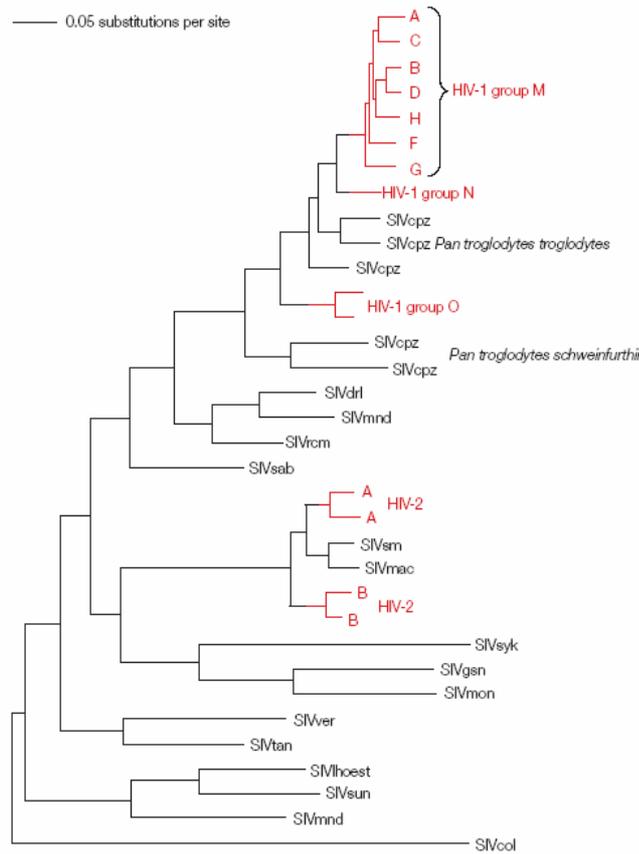
La clave para entender el origen del VIH fue el descubrimiento de que virus estrechamente relacionados –Virus de la Inmunodeficiencia de los Simios (VIS) - estaban presentes en una gran variedad de primates africanos (Hahn y cols., 2000; Sharp y cols., 2001). VIH y VIS son miembros de los Lentivirus. El VIS ha sido aislado de más de veinte especies de primates africanos.

La historia evolutiva del VIH-1 y el VIH-2 ha sido reconstruida al detalle, a través

de la inferencia que aportan los árboles filogenéticos de los lentivirus de primates. Los dos virus humanos están relacionados con diferentes VIS y por tanto, tienen diferentes orígenes. Específicamente, el VIH-1 está más estrechamente relacionado con el VIScpz (homología de secuencia del orden del 84 %), 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) (Gao y cols., 1999; Santiago y cols., 2002). El VIScpz de *P. t. troglodytes* es más interesante debido a que comparte las relaciones filogenéticas más estrechas con el grupo M del VIH-1. El rango geográfico de *P. t. troglodytes* también abarca la región de África con mayor diversidad genética del VIH-1, donde predominan los grupos M, O y N y donde se sospecha que el VIH emergió por primera vez. En contraste, el VIH-2 está más estrechamente relacionado con VISsm (Virus de la Inmunodeficiencia de los mangabey tiznados) (Gao y cols., 1992), el cual se encuentra con una alta prevalencia en los monos mangabey tiznados (*Cercocebus atys*) (82-89 % de homología). Como sucede con el VIH-1, los mangabeys tiznados están localizados más frecuentemente en África del Este donde se piensa que el VIH-2 emergió (Gao y cols., 1992; 1999; Santiago y cols., 2002).

La filogenia molecular también muestra que hubo varios eventos de transmisión

de monos a humanos, debido a que existe una mezcla de linajes entre VIH-1 y VIS (Figura 3) (Hahn y cols., 2000).



Fuente: Hahn y cols., 2000

Figura 3. Árbol filogenético ML que representa la historia evolutiva de los
Lentivirus de primates

Se hace difícil determinar exactamente cuántos eventos de transmisión inter-especie han ocurrido, pero para el VIH-2, el número tiene que ser al menos de cuatro (Hahn y cols., 2000). Tres saltos de chimpancé a humano explican la actual divergencia del VIH-1, sugiriendo orígenes independientes para cada uno

de los grupos de VIH-1: M, O y N (Gao y cols., 1992; Gao y cols., 1999; Santiago y cols., 2002). Sin embargo, la recombinación inter-especie, la cual debió ser entre los *lentivirus* de primates, complica grandemente este análisis (Salemi y cols., 2003). Por ejemplo, el grupo N del VIH-1, parece haber derivado de una recombinación entre cepas de VIScpz y un virus relacionado con un ancestro del grupo M (Gao y cols., 1999), pero este evento ocurrió antes del establecimiento de los grupos M y N en humanos.

La aplicación de métodos moleculares sugiere que el grupo M del VIH-1 se originó en la década del 30, del siglo pasado, con un rango aproximado de diez años (Korber y cols., 2000; Salemi y cols., 2000; Yusim y cols., 2001). Una escala amplia de tiempo evolutivo fue propuesta también para el VIH-2 (Lemey y cols., 2003).

La recombinación tiene consecuencias complejas sobre la estimación del tiempo de divergencia, debido a un incremento aparente en los rangos de variación entre los sitios nucleotídicos, y reduce la distancia genética entre las secuencias (Schierup y Hein, 2000a; Worobey, 2001). Bajo estas circunstancias, posiblemente los únicos indicadores reales de tiempo de evolución del VIH son las muestras almacenadas en laboratorio que todavía contienen virus. La primera secuencia de VIH-1 del grupo M que está disponible, fue procesada a partir de una muestra tomada en la República

Democrática del Congo, en 1959 (Zhu y cols., 1998). Que esta secuencia se ubique algo distante de la raíz del árbol filogenético del grupo M, es una fuerte evidencia de que la diversificación de estos virus ocurrió antes de esta fecha. El estudio preciso de la evolución del VIH requerirá del análisis de más cantidad de virus "fósiles".

Hay teorías que proponen una explicación de los mecanismos mediante los cuales el VIH saltó a los humanos. Determinadas evidencias sugieren que sólo un proceso natural es responsable de esta emergencia (Hahn y cols., 2000). Especialmente, observando la frecuencia con que la carne de mono infectada con VIS es vendida en los mercados africanos (Peeters y cols., 2002), es fácil dilucidar cómo los individuos involucrados en el sacrificio de animales o la preparación de dicho alimento, adquirieron la infección. Es probable que el VIS saltara a los humanos varias veces antes de que se estableciera la vía actual de diseminación de la epidemia de SIDA y que aquellas incipientes infecciones ocurrieran en comunidades rurales aisladas, donde rápidamente se agotaron los susceptibles, cortando la transmisión (Hahn y cols., 2000).

Es también importante explicar por qué el VIH-1 forma subtipos y por qué las secuencias virales tienden a reunirse en grupos distintos, con una distancia genética entre ellos, aproximadamente igual (10 a 30 % dependiendo de los genes comparados) (Kusagawa y cols., 1998; McCutchan y cols., 1999;

Motomura y cols., 2000; 2003; Vidal y cols., 2000; Yang y cols., 2002; Takebe y cols., 2003).

La gran colección viral con que se cuenta procedente de África del Este y central, muestra secuencias que se ubican entre los subtipos previamente descritos (Vidal y cols., 2000). Esto indica que esas regiones africanas fueron la fuente de las cepas que iniciaron exitosamente la epidemia en otras localidades, tanto en África como fuera de ella. La estructura de subtipos del árbol filogenético del VIH-1, a largo alcance, refleja la influencia del muestreo (Rambaut y cols., 2001).

Bajo la escala evolutiva de tiempo propuesta para el grupo M, los subtipos individuales probablemente se diversificaron en los últimos cuarenta años o más (Korber y cols., 2000; Robbins y cols., 2003), aunque está vigente un debate acerca del surgimiento del subtipo B, entre las décadas del 60 y 70, del siglo pasado (Smith y cols., 2003).

La filogenia del VIH-1 es, por tanto, un proceso dinámico, en el cual algunos subtipos desaparecerán y otros nuevos subtipos epidémicos surgirán. Más importante aún es el fenómeno de recombinación entre los subtipos actualmente reconocidos. La divergencia genética promedio entre los genomas de los subtipos A, B, C y D de cepas aisladas en 1999 (9,8; 10; 7,9 y 8,5%, respectivamente), es igual a la de todo el grupo M epidémico, en 1985 (8,8%).

La divergencia genética del grupo M se ha incrementado a un 14,9 % desde esa fecha hasta 1999 (Rambaut y cols., 2004).

Aunque algunos incrementos pueden deberse al gran número de secuencias virales con que se cuenta en la actualidad, el rango de sustituciones que esto implica (aproximadamente 0,002 sustituciones por sitio por año) coincide con el rango calculado previamente para los genes virales *env* y *gag* (0,0028 y 0,0019; respectivamente) (Korber y cols., 2000).

II.7.4 Procesos evolutivos

Una de las más tempranas e impresionantes observaciones acerca del VIH, fue la gran variabilidad genética que el virus experimenta dentro del hospedero, particularmente en la región hipervariable del gen *env* (Holmes y cols., 1992). Esta variabilidad hace del VIH uno de los organismos que evolucionan más rápidamente. Semejante rapidez es el resultado de una combinación de factores.

Primero, el virus experimenta una alta tasa de mutación: su RT produce 0,2 errores por genoma durante cada ciclo de replicación; carece de actividad exonucleasa correctora y otros errores posteriores ocurren durante la transcripción del ADN por la enzima ARN Pol II (Preston y cols., 1988).

Segundo, el VIH tiene una dinámica de replicación incrementada, un tiempo de generación viral de aproximadamente 2,5 días y una producción de entre 10^{10} a

10^{12} nuevos viriones diarios (Preston y cols., 1988).

Por último, la frecuencia de recombinación y la selección natural posterior elevan la tasa de cambios evolutivos. El VIH muestra más fuerte selección positiva que cualquier otro microorganismo estudiado (los cambios no sinónimos son mayores que los sinónimos). Se demostró que el promedio de eventos de fijación adaptativa para la envoltura, es de uno cada aproximadamente 2,5 meses (Preston y cols., 1988).

La persistente naturaleza de la infección por VIH condiciona que los eventos evolutivos ocurran intra e interpacientes (Goodreau, 2006; Lemey y cols., 2006; Shriner y cols., 2006). Dichos eventos parecen ser procesos muy diferentes, con un mecanismo de selección dominando el primero; pero no el segundo (Rousseau y cols., 2006). Esto se hace evidente en la estructura de los árboles filogenéticos. Las filogenias del VIH intrapacientes tienen una estructura temporal fuerte, reflejando los eventos de fijación de mutaciones ventajosas y la extinción de linajes no favorables. En contraste, aquellos árboles que siguen la trayectoria de la evolución entre pacientes, muestran pocas evidencias de selección positiva continua (Rambaut y cols., 2004).

II.7.5 Recombinación y diversidad del VIH

Además de la rápida acumulación de cambios genotípicos menores, el VIH-1 se recombina en grandes proporciones, generando un cúmulo de alteraciones

(Robertson y cols., 1995; Jetzt y cols., 2000; Spira y cols., 2003; Apetrei y cols., 2004a; Lal y cols., 2005). La recombinación genética es una parte integral del ciclo de vida del VIH, que ocurre cuando la RT cambia alternativamente de molde genómico durante la replicación. El nivel de recombinación del VIH es uno de los más altos de todos los organismos conocidos, con un estimado de tres eventos de recombinación que ocurren por genoma, por ciclo de replicación (Zhuang y cols., 2002), excediendo el nivel de mutaciones por replicación. El descubrimiento de que la mayoría de las células infectadas albergan dos o más provirus diferentes (Jung y cols., 2002), y la evidencia de infección dual (Jost y cols., 2002; Koelsch y cols., 2003), confieren a la recombinación un papel fundamental en la generación de la diversidad del VIH. La recombinación se ha detectado a todos los niveles filogenéticos: entre *lentivirus* de primates (Bailes y cols., 2003; Salemi y cols., 2003), entre grupos del VIH-1 (Takehisa y cols., 1999), entre subtipos (Robertson y cols., 1995) e intra-subtipos (Crandall y cols., 1999; Brander y cols., 2007).

La recombinación requiere de la infección simultánea de una célula con dos diferentes provirus, seguido de la encapsidación de un transcripto de ARN de cada provirus, en un virión heterocigótico. La infección dual puede ser simultánea o secuencial. En general, cuando una infección dual ocurre como consecuencia de un único evento de transmisión, se designa como co-infección.

Por otra parte, el término superinfección ha sido usado, generalmente, para infecciones secuenciales que involucran, al menos, dos eventos de transmisión (Nájera y cols., 2002). En humanos, la superinfección potencial con cepas de diferentes subtipos puede emerger en drogadictos endovenosos que comparten equipos de inyección, con inoculación endovenosa directa de grandes dosis de virus o en personas que practican sexo desprotegido (Nájera y cols., 2002).

Después de la subsiguiente infección de una nueva célula, la RT genera una nueva secuencia de ADN retroviral que es recombinante entre los dos genomas parentales (Robertson y cols., 1995; Peeters y Sharp, 2000). El virus mosaico muestra puntos de ruptura entre las regiones genómicas con diferentes asociaciones filogenéticas (Robertson y cols., 1995; Peeters y Sharp, 2000). El hecho de que existan un gran número de virus recombinantes implica claramente que la co-infección con cepas divergentes de VIH-1, es más frecuente de lo que se pensó (McCutchan y cols., 2000; Peeters, 2000; Spira y cols., 2003; Apetrei y cols., 2004a). De hecho, se han reportado infecciones duales con diferentes subtipos, en regiones donde múltiples cepas co-circulan (Hoelscher y cols., 2002). Estudios recientes documentan casos de superinfección con un virus de otro subtipo (Altfeld y cols., 2002; Ramos y cols., 2002) y muestran evidencias de recombinación a punto de partida de la superinfección (Blackard y cols., 2002; Fang y cols., 2004). La superinfección

puede ocurrir en el escenario de una fuerte respuesta de células T CD8+ virus-específica, sugiriendo que la respuesta inmune del hospedero no es eficiente contra cepas divergentes (Altfeld y cols., 2002; Jost y cols., 2002; Takebe y cols., 2004). Las infecciones duales por VIH-1 y VIH-2 se reportan frecuentemente en regiones donde ambos tipos circulan, pero no se han descrito recombinantes entre ellos (Peeters, 2000).

Los virus resultantes de la recombinación pueden ser más virulentos que los virus no recombinantes, debido a las alteraciones fenotípicas o del tropismo celular y su susceptibilidad a las drogas antirretrovirales que puede ser diferente (Heeney y cols., 2006; Carvajal-Rodriguez y cols., 2007; Johnston y cols., 2007; Nora y cols., 2007). Los recombinantes pueden acelerar la progresión de la enfermedad e incrementar la probabilidad de transmisión madre-hijo y la transmisión sexual, por incremento de la carga viral en la sangre y en el tracto genital, posiblemente mucho más que las cepas circulantes pre-existentes (Thomson y cols., 2002b).

Dentro de un individuo infectado, la recombinación interactúa con la selección y la deriva antigénica, produciendo dinámicas de población complejas, y por tanto, provee de eficientes mecanismos para que el virus escape de la acumulación de mutaciones deletéreas o para saltar entre picos adaptativos y proveer mecanismos efectivos (conjuntamente con las mutaciones) para evadir

la presión inmune (Kellam y cols., 1995; Morris y cols., 1999; Charpentier y cols., 2006). La generación de FRU incrementa la posibilidad de que reinfecciones con virus de diferentes formas genéticas no sean un evento tan raro (Thomson y cols., 2002b).

La recombinación tiene una importante implicación en la comprensión de la epidemia del VIH. En particular, muchas inferencias evolutivas que se han realizado a partir de reconstrucciones de filogenias, están considerablemente afectadas por la recombinación. Así, el análisis de las relaciones filogenéticas, de los eventos en el tiempo, de los procesos demográficos o de la selección natural, está potencialmente afectado por la recombinación (Schierup y Hein, 2000 a y b; McVean y cols., 2002; Posada y cols., 2002b).

La mayoría de los estudios filogenéticos ignoran la ocurrencia de la recombinación, la que puede convertirse en un serio factor de confusión en la estimación e inferencia filogenética. El efecto de un simple evento de recombinación en la reconstrucción filogenética es a menudo ligero en el sentido de que los árboles adecuados para la mayoría de los alineamientos, son recuperados. Algunos estudios muestran que la reconstrucción filogenética obtenida a partir de secuencias recombinantes, difiere en mucho de la historia epidemiológica real (Weins y cols., 1998). Las inferencias basadas en tales filogenias podrían ser muy engañosas (Schierup y Hein, 2000a; Posada y cols.,

2002a). Se requiere de mucha precaución a la hora de hacer inferencias filogenéticas en los casos donde se cree que la recombinación está presente. Las secuencias nucleotídicas deben ser analizadas para detectar la presencia de recombinación, previo a la realización de la reconstrucción filogenética.

Por ejemplo, aunque de los datos acumulados que se utilizaron para fechar el origen del grupo M del VIH-1, hacia los años 30, del pasado siglo, fueron eliminados los recombinantes conocidos antes del análisis (Korber y cols., 2000), la presencia de recombinación sigue evidenciándose, lo cual incrementa las dudas acerca de la exactitud de este estimado (Rambaut y cols., 2004). Como la recombinación es tan frecuente, no puede eliminarse por la simple identificación de los recombinantes y su exclusión de los análisis. El VIH, por tanto, debe ser estudiado con métodos robustos que tomen en cuenta la recombinación (Carvajal-Rodriguez y cols., 2006).

II.8 Epidemiología

A nivel mundial, existen actualmente 39,5 millones de personas infectadas con el VIH (http://www.unaids.org/en/HIV_data/2006GlobalReport/). Los grupos y factores de riesgo poseen diferentes patrones de distribución geográfica. En Europa occidental, Estados Unidos y Oceanía, la mayor incidencia es en hombres que realizan sexo con hombres y drogadictos. En Asia, África del Norte y zonas del Pacífico los más afectados son las prostitutas y los

drogadictos. En África Sub-sahariana, América Latina y el Caribe, el grupo de mayor riesgo es el heterosexual y es de gran importancia la transmisión perinatal.

II.8.1 Epidemiología del VIH en Cuba

De los 9 304 casos de seropositivos al VIH detectados, 3 492 han evolucionado a SIDA. El factor de riesgo más importante es la transmisión sexual, al que corresponde el 99,4 % de los casos reportados. El resto se reparte entre los grupos de transmisión parenteral (0,2 %), transmisión vertical (0,3 %) y exposición ocupacional (0,1 %). En el sexo masculino es donde se reporta el mayor número de casos: 7 500 (80,6 %) y respecto a la transmisión sexual de este sexo, el 84,1 % son homo-bisexuales. Las edades de mayor incidencia corresponden a grupos entre 24 y 49 años según datos suministrados por el Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual/VIH/SIDA del Ministerio de Salud Pública de Cuba.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Muestras clínicas

Se estudiaron muestras clínicas de dos grupos de individuos infectados con el VIH-1, relacionados epidemiológicamente. Las entrevistas detalladas para determinar la relación epidemiológica entre los pacientes y reconstruir las cadenas epidemiológicas de transmisión (Figura 4), se realizaron al momento del diagnóstico por personal médico y de enfermería con entrenamiento especial en la búsqueda de contactos del Sanatorio para la atención de pacientes viviendo con el VIH, de Santiago de las Vegas. Para la mayoría de los individuos se definió el límite de tiempo estimado en el cual la infección ocurrió. Se consideró cadena de transmisión de VIH-1 a un conjunto de individuos infectados con el VIH-1 que guardaron relación epidemiológica de transmisión entre sí, estableciéndose una secuencia de transmisión a punto de partida de un caso índice que hizo función de primer donante para uno o más casos receptores, que al transmitir posteriormente la infección, a su vez, se convirtieron en donantes para otros receptores y así sucesivamente.

El número de individuos pertenecientes a la cadena dependió del momento en que la transmisión se controló e interrumpió.

Las muestras de suero y plasma se conservaron a -20°C y -70°C respectivamente, en el Laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual, del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), entre los años 1989 y 2002, y pertenecen a la seroteca de dicho laboratorio. Se analizaron todas las muestras disponibles de cada cadena: 37 muestras procedentes de 27 individuos seropositivos y pacientes de la Cadena 1 (12 muestras de suero y 25 de plasma) y 66 muestras obtenidas de 59 individuos seropositivos y pacientes de la Cadena 2 (33 muestras de suero y 33 de plasma). En el caso de 17 individuos, se dispuso de más de una muestra. En todos los casos se pudo constatar la fecha exacta de la toma de la muestra. Se contó con el permiso del Comité de Ética del IPK para el uso de las muestras almacenadas en la seroteca y los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a los estándares éticos válidos para Cuba en la fecha de realización del estudio y la Declaración de Helsinki de 1975. En todo momento se mantuvo la confidencialidad con respecto a la identidad de los individuos de donde procedían las muestras biológicas.

III.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en las RCP (Reacción en Cadena de la

Polimerasa) anidada y semi-anidada y en la secuenciación nucleotídica de los diferentes genes utilizados en este estudio, se diseñaron y donaron gentilmente, por el Laboratorio de Retrovirus de la Universidad de Carolina del Norte, en Estados Unidos (EUA) (Tabla 5 y Figura 5).

Los cebadores ED5 y ED12 se sintetizaron según describieron Delwart y colaboradores, en 1994 (Delwart y cols., 1994).

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos empleados. La numeración concuerda con la secuencia de la cepa de referencia HXB2 (<http://hiv-web.lanl.gov/>)

Oligonucleótido	Posición (nucleótidos)	Secuencia 5'→ 3'
gag1up	536-565	TGCCTTGACTGCAAGTAGTGTGTGCC
gag1down	1309-1332	TGGGGTGGCTCCTTCTGATAATGC
gag1Nup	790-813	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTA
gag2up	1231-1255	TCACCTAGRACYTTRAATGCATGGG
gag2down	1826-1844	CCCTGRCATGCTGTCATCA
gag2Nup	1237-1256	AGRACYTTRAAYGCATGGGT
gag2Ndown	1703-1721	TGTGWAGCTTGYTCRGCTC
ED5	5956-5985	TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
ED12	7960-7931	TCTTGCCTGGAGCTGTTTGTATGCCCCAGAC
envNup	6859-6880	CAATCCCATACATTATTGTG
envNdown	7332-7357	CAATTAACACTATGTGTTGTAATTC

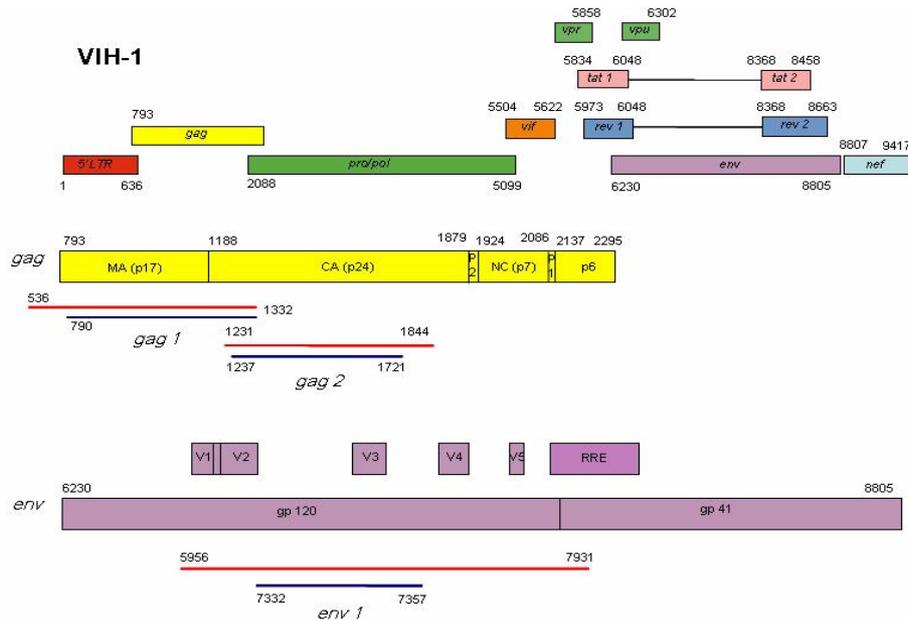


Figura 5. Numeración de los cebadores utilizados en correspondencia con la secuencia de la cepa de referencia HXB2 (<http://hiv-web.lanl.gov/>)

III.3 Extracción de ARN

La extracción de ARN de las muestras de suero y plasma empleadas, se realizó utilizando el estuche comercial QIAamp viral RNA (QIAGEN, Heidelberg, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos se tomó un volumen inicial de 140 μ L de muestra que se añadieron a 560 μ L del tampón AVL (Tampón de lisis viral, del inglés Assay Virus Lysis). Se mezcló mediante vórtex (Stuart SA8, Bibby Sterling Ltd, Nottinghamshire, Inglaterra) durante 15 segundos y se incubó luego 10 minutos, a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó (Eppendorf 5417R, Hamburgo, Alemania) brevemente para recoger las gotas de la tapa y se añadieron 560 μ L de etanol absoluto, se

mezclaron mediante vórtex, por 15 segundos y se centrifugaron nuevamente para recoger las gotas de la tapa del tubo. Se añadieron 630 μL de la mezcla anterior en la columna de purificación que provee el estuche y se centrifugó a 6000 x g, durante un minuto. Se descartó el filtrado y se volvió a repetir el paso anterior. Posteriormente, se procedió a lavar la columna con 500 μL de tampón AW1 (Tampón de lavado 1, del inglés Assay Wash 1), se centrifugó a 6000 g por 1 minuto y se descartó el filtrado. Se volvió a lavar la columna, esta vez utilizando 500 μL del tampón AW2 (Tampón de lavado 2, del inglés Assay Wash 2) y se centrifugó durante 3 minutos a 20 000 g. Se descartó el filtrado y se realizó una centrifugación adicional a 20 000 g durante 1 minuto para garantizar que la columna quedase libre de tampón de lavado. Se añadieron 30 μL de tampón de elusión en el centro de la columna, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente se colectó el ARN extraído en un tubo estéril, mediante centrifugación a 6000 g, durante 1 minuto. El ARN extraído se dividió en alícuotas y se conservó a -70°C hasta su utilización.

III.4 Reverso Transcripción

III.4.1 Optimización del paso de Reverso Transcripción en muestras de suero conservadas a -20°C

Se estudiaron un total de 74 muestras de suero de pacientes infectados con el VIH-1, pertenecientes a la seroteca del Laboratorio de Infecciones de

Transmisión Sexual, del Departamento de Virología, del IPK. Estas muestras fueron seleccionadas al azar, de sueros colectados entre los años 1989 a 1998 y que habían sido conservados a -20°C.

El ADNc (Ácido Desoxirribonucleico complementario) se sintetizó, utilizando dos enzimas RT diferentes: Reverse Transcriptase AMV (Transcriptasa Reversa del Virus de la Mieloblastosis Aviar) (Boeringer-Mannheim GMBH, Ingelheim, Alemania) y RT SensiScript (QIAGEN).

III.4.1.1 Procedimiento de Reverso Transcripción (RT) utilizando la enzima Reverse Transcriptase AMV

Para este procedimiento de RT se siguió el protocolo descrito por Nelson y colaboradores, en 1997 (Nelson y cols., 1997), con las modificaciones descritas por Ping y colaboradores, en 1999 (Ping y cols., 1999). La mezcla de reacción consistió de 5 µL del ARN extraído, 1X Expand HF Buffer (Boeringer-Mannheim), 2,5 mM de MgCl₂, 1 µL de la mezcla 10 mM de dNTP (deoxinucleótidos) (Invitrogen Life Technologies, Frederick, Maryland, EUA), 10 U de inhibidor de RNAsa (Ribonucleasa) (Boeringer-Mannheim), 50 ng/µL de cebador random (Invitrogen) y 10 U de la Reverse Transcriptase AMV y se completó con agua bidestilada estéril, libre de RNAsa, para un volumen final de 20 µL. El cebador random se incubó con el ARN durante 5 minutos, a 65°C, previo a la preparación de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se

colocó en un Termociclador (MJ Research PTC-150, Watertown, Massachusset, EUA) y se sometió a 42°C por 30 minutos, seguido de 2 minutos a 95°C, para inactivar la enzima. El ADNc se conservó a -20°C hasta su utilización.

III.4.1.2 Procedimiento de Reverso Transcripción utilizando la enzima RT SensiScript

La mezcla de reacción consistió de 5 µL de ARN extraído, Tampón de RT 1X, 0,5 mM de cada dNTP; 10 U del inhibidor de RNAsa; 50 ng/µL de cebador random (Invitrogen), 10 U de RT SensiScript y se completó con agua bidestilada estéril, libre de RNAsa, para un volumen final de 20 µL. El cebador random se incubó con el ARN durante 5 minutos, a 65°C, previo a la preparación de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se colocó en un Termociclador (MJ Research) y se sometió a 37°C por una hora, seguido de 5 minutos a 93°C, para inactivar la enzima. El ADNc se conservó a -20°C hasta su utilización.

III.4.1.3 Análisis estadístico

Para comparar la capacidad de amplificación de VIH-1 utilizando ambos sistemas enzimáticos en el paso de Reverso Transcripción y validar estadísticamente los resultados se utilizó una prueba de comparación de proporciones usando el Programa de computación Statgraphics plus version 5.0 (StatPoint, Inc., Herdon, Virginia, EUA) sobre plataforma Windows XP con un

nivel de significación del 95%.

III.4.2 Procedimiento de Reverso Transcripción utilizado en el estudio de las muestras de suero y plasma de los pacientes de las cadenas epidemiológicas

Se empleó el procedimiento de RT utilizando la enzima RT SensiScript descrito en el acápite III.4.1.2.

III.5 Reacción en cadena de la polimerasa semi-anidada y anidada

Para todos los genes estudiados se utilizó RCP anidada, excepto para *gag1* en que se empleó RCP semi-anidada. Para la RCP se añadieron 2 µL de la reacción de RT a la mezcla de reacción constituida por 0,5 µL de Platinum Taq DNA Polimerase (2,5U) (Invitrogen), 5 µL de Tampón RCP (10X), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM); 1,5 µL de cada oligonucleótido (10 µM); 1 µL de la mezcla de los dNTP 10 mM (0,2 mM de cada uno), y agua bidestilada estéril libre de RNAsa, para un volumen final de 50 µL. La mezcla de la RCP se colocó en un Termociclador (MJ Research). El ADNc fue desnaturalizado a 94°C por 2 minutos y seguidamente se efectuaron 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 45 segundos), con una extensión final de 72°C por 10 minutos.

III.6 Detección del producto amplificado

Una vez concluida la RCP, se tomaron 8 µL de cada uno de los productos de la

reacción de amplificación y se mezclaron con 2 μ L de tampón estabilizador de muestra 6X (EDTA 500 mM, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%). Estos productos se detectaron en geles de agarosa al 1,5 %, en TBE 1X (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0.002M) mediante tinción de bromuro de etidio (10mg/mL) a una concentración final de 0,1-0,2 μ g/mL. La corrida se realizó a 120V durante 30 minutos (Cámara de electroforesis MBI HU10 y fuente de poder PAC 300, BioRad Laboratories, Foster City, California, EUA) empleando como marcador de peso molecular 1Kb (kilobases) DNA Ladder de Invitrogen, con un rango entre 500 pares de bases (pb) a 12 Kb. La visualización de las bandas se realizó por exposición del gel a la luz ultravioleta en transiluminador (Spectroline Bi-O-Vision™, Spectronics Corporation, Westbury, New York, EUA). La talla de los fragmentos amplificados fue de 542 pb para *gag1*, 484 pb para *gag2* y 468 pb para *env*.

III.7 Purificación del producto amplificado

El ADN amplificado por la RCP se purificó para realizar la secuenciación nucleotídica siguiendo el protocolo descrito en el estuche comercial Qiaquick (QIAGEN). Para cada ADN amplificado se añadieron 5 volúmenes del tampón PB (tampón de inicio, del inglés previous buffer) al producto de RCP y se mezclaron mediante pipeteo. Esta mezcla se colocó en la columna de purificación que provee el estuche y para garantizar la unión del ADN a la

membrana de la columna, ésta se centrifugó a 10 000 *g* durante 1 minuto. Se descartó el filtrado y la columna se lavó con 750 μ L de tampón PE (tampón de elución previa, del inglés previous elusion) seguido de una centrifugación a 10 000 *g*, durante 1 minuto. Se descartó el filtrado y se centrifugó adicionalmente bajo las mismas condiciones de la anterior, para garantizar que la columna quedara libre de tampón de lavado. Se añadieron 30 μ L de tampón EB (Tampón de elución, del inglés elusion buffer) (10mM de Tris-Cl, pH 8,5) para eluir el ADN de la membrana, mediante centrifugación a 10 000 *g* por 1 minuto. El ADN eluído se conservó a -20°C hasta su utilización.

III.8 Secuenciación nucleotídica automatizada

La reacción de secuenciación se llevó a cabo con la enzima AmpliTaTM DNA Polymerase FS, empleando el estuche comercial ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, California, EUA) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Este estuche contiene los cuatro ddNTPs (dideoxinucleótidos) con diferentes marcadores fluorescentes. Se utilizaron alrededor de 3-10 ng del producto de RCP purificado y 3 pmol de cebadores en 20 μ L de reacción. La mezcla de reacción de secuencia se sometió a 25 ciclos en un termociclador 9600/9700 (Perkin Elmer). Cada ciclo fue de 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C.

III.9 Electroforesis

Se utilizó el secuenciador automático 3100 Genetic Analyser (Perkin Elmer Applied Biosystems). Los productos de secuenciación se separaron en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 5 % (acrilamida/bisacrilamida 29:1) y Urea 7 M [composición del gel: 21,0 g de urea; 8,4 ml de acrilamida 30 %; 6,0 ml tampón de TBE 1X (10x tampón TBE: 108,0 g tris base; 55,0 g ácido bórico; 7,4 g Na₂EDTA), 15 µL TEMED, 360 µl Persulfato de Amonio al 10% (0,1 g Persulfato de Amonio en 1 ml de agua bidestilada)]. La electroforesis se corrió a 48 watt durante 8 horas. La lectura de la secuencia se realizó a través de una computadora.

III.10 Métodos empleados para analizar y comparar secuencias

Las secuencias obtenidas se editaron primariamente, utilizando el programa Sequencher versión 4.0 (GeneCodes, Inc., Ann Arbor, Michigan, EUA). Los alineamientos se realizaron empleando ClustalW (Thompson y cols., 1994) y se re-editaron manualmente de acuerdo a su marco de lectura en Se-AL (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>). Los números de acceso al GenBank se muestran en el Anexo 1. Los árboles filogenéticos fueron reconstruidos utilizando una investigación heurística de máxima verosimilitud (ML), mediante el programa PAUPv4.0b10 (inferencia filogenética utilizando parsimonia, del inglés Phylogenetic inference using parsimony) (Swofford, 1998). Se recurrió al

modelo General Time-Reversible con sitios de proporción invariantes y una distribución gamma para acomodar los rangos de heterogeneidad entre sitios. Los árboles se evaluaron estadísticamente, calculando el bootstrap con 500 réplicas aplicando el programa PhyML (Guindon y cols., 2003).

Se subtiparon los genomas utilizando secuencias de referencia obtenidas de la base de secuencias de VIH de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>), para las regiones de los genes *gag* y *env*. Los análisis de bootscanning y de puntos de similitud de las cepas recombinantes, se realizaron con el programa SimPlot v3.5 (Lole, y cols., 1999).

Para probar la compatibilidad entre la historia de la evolución viral y la historia epidemiológica de transmisión, se forzaron los árboles filogenéticos a ser compatibles con la historia epidemiológica de transmisión y se compararon los resultados de la topología forzada con la de la no forzada mediante las pruebas estadísticas de Kishino-Hasegawa (Kishino y cols., 1989) y Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira y cols., 1999). Con la prueba de Kishino-Hasegawa se compararon los resultados de la topología de un árbol forzado con el no forzado y con la Shimodaira-Hasegawa se compararon los resultados de diferentes variantes de árboles forzados con el no forzado. Para estas pruebas estadísticas de comparación de topologías no paramétricas de dos colas se

definieron tres regiones: apoyo, no rechazo y rechazo. Se consideró hipótesis de compatibilidad rechazada para valores $p < 0,05$. El apoyo se consideró para una probabilidad de compatibilidad mayor de 0,8 ($p > 0,8$). Los valores intermedios ($0,05 \leq p \leq 0,8$) se consideraron de duda y se clasificaron como no rechazo (Goldman y cols., 2000). Los árboles forzados se construyeron empleando la misma investigación heurística de máxima verosimilitud del programa PAUPv4.0b10 (Swofford, 1998) descrita arriba, y se aplicaron las fuerzas monofiléticas particulares. Se analizó la compatibilidad desde el receptor viral más reciente al más temprano donante de la cepa viral, según la historia de transmisión descrita en la Figura 4.

Se reconstruyeron también árboles filogenéticos mediante una investigación de similitud para verificar si las secuencias clasificadas como subtipo G obtenidas de las cadenas de transmisión se agrupaban monofiléticamente, aún en presencia de secuencias controles (Anexos 2 y 3) altamente similares y epidemiológicamente no relacionadas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Obtención de secuencias de ARN de VIH-1

La aplicación de la RCP en la Biología Molecular ha tenido un impacto sorprendente. El proceso de RT-RCP (Reverso Transcripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa) es altamente sensible y ha sido utilizado para detectar moléculas de ARN, obtener material útil para secuenciación de ácidos nucleicos y como un paso en el clonaje de copias de ADNc a partir de ARN. La amplificación exitosa por RT-RCP requiere de la confluencia de una serie de factores, entre los cuales la calidad de la muestra y la extracción del ARN juegan un papel fundamental (Niubo y cols., 2000; Villahermosa y cols., 2000).

En el caso del VIH-1, por ser un virus ARN, el uso de la RT-RCP está bien difundido, y se aplica al diagnóstico y la investigación. La capacidad para analizar ARN de VIH a partir de muestras con bajos niveles del virus reviste una gran importancia, ya sea por la aplicación a estudios en pacientes que reciben terapia antirretroviral y la detección temprana en ellos de variantes resistentes, para analizar la evolución del virus a partir de muestras conservadas por mucho

tiempo en los laboratorios, o como se ha publicado, para realizar estudios dirigidos a conocer el origen de la epidemia, mediante secuencia y análisis genético del VIH obtenido de muestras de suero colectadas en décadas pasadas (Natarajan y cols., 1998; Zhu y cols., 1998).

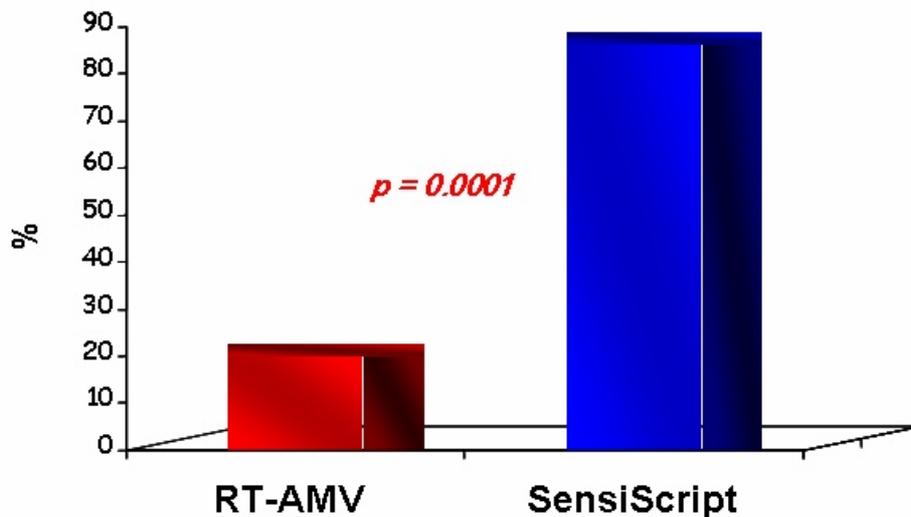


Figura 6. Porcentaje de recobrado del material genético según el sistema enzimático empleado.

De las 74 muestras de suero estudiadas, con el empleo de la enzima RT SensiScript se amplificó el ARN del VIH-1 en el 86,4 % de ellas (64 muestras), comparado con un 20,2 % al utilizar la enzima AMV-RT (15 muestras) ($p=0,0001$) (Figura 6). Para el 13,5 % de las muestras (10 muestras) no se obtuvo amplificación con ninguna de las dos enzimas comparadas. El 100 % de las secuencias obtenidas a partir de los productos de RCP fueron útiles y

homologaron con VIH-1, al compararse con las secuencias de referencia de la base de datos de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>).

Múltiples son los parámetros a tener en cuenta para poder amplificar ARN de VIH-1 a partir de muestras clínicas. Se han estudiado el uso de diferentes anticoagulantes, disímiles procesos de extracción del material genético, el tiempo que media entre la toma de la muestra y el procesamiento, la homología de los cebadores utilizados y la temperatura de conservación, entre otros (Verhofstede y cols., 1996; Ginocchio y cols., 1997; Fransen y cols., 1998). Estos tres últimos factores pudieron influenciar los resultados encontrados en este estudio.

En la Figura 7 se compara la eficacia de recobrado del material genético del VIH-1 utilizando las enzimas RT-AMV y RT SensiScript en el paso de Reverso Transcripción en las 74 muestras de suero estudiadas según el año de toma de la muestra. Como es de esperar, para ambos sistemas se logró una mayor recuperación de ARN de las muestras que menos tiempo estuvieron conservadas a -20°C, aunque con el sistema RT SensiScript el recobrado fue ostensiblemente mayor.

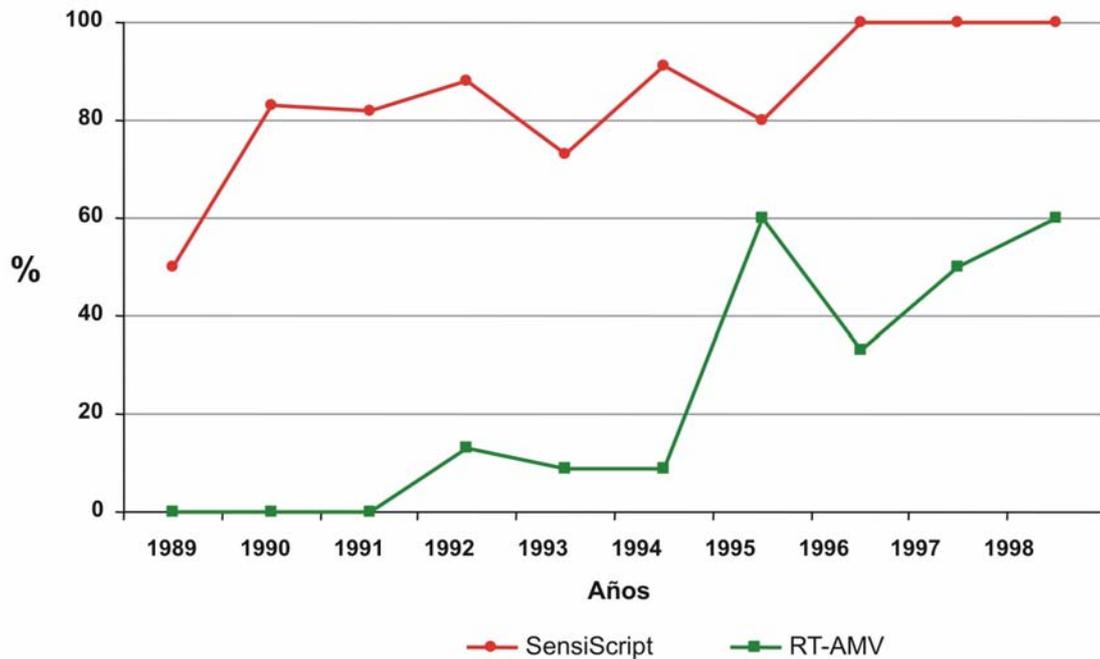


Figura 7. Porcentaje de obtención de secuencias de VIH-1 teniendo en cuenta el año de colección de las muestras de suero y el empleo de las enzimas RT SensiScript y RT-AMV.

Para el estudio de secuenciación de las cadenas de transmisión, se contaba tanto con muestras de suero que habían sido colectadas antes del año 1998 y de plasma colectadas posterior a esta fecha. En el 82,2 % de las muestras de suero y en el 94,8 % de las de plasma, se obtuvo amplificación y secuenciación de los 3 fragmentos del genoma de VIH-1 estudiados.

Con respecto a los sueros, debido a la limitada cantidad de muestra disponible, con la certeza de que las condiciones de almacenamiento no fueron las idóneas y habiendo obtenido solamente un 20,2 % de positividad con la enzima AMV

durante la optimización del paso de Reverso Transcripción en muestras de suero conservadas a -20°C , es que se decide utilizar la enzima RT SensiScript y garantizar un incremento del recobrado de ARN, que además de degradado, debía estar en su mayoría, en muy bajas concentraciones. El mismo procedimiento se utilizó para las muestras de plasma. Hasta el momento de la realización de nuestro estudio, la enzima RT SensiScript había sido empleada en la técnica de Expresión Diferencial para el estudio de ARNm. Era una enzima nueva, única, heterodimérica recombinante (expresada en *E.coli*), diferente de la Reverso Transcriptasa del virus Maloney de la Leucemia murina (MMLV) o de la del virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV) y se recomendaba su uso para muestras que contenían menos de 50ng de ARN (Bosch y cols., 2000). Teniendo en cuenta las condiciones de nuestras muestras se decidió la utilización de la misma.

Más recientemente, la enzima RT SensiScript se ha utilizado en técnicas como RT-RCP en tiempo real (Ullmann y cols., 2001; Bustin, 2002), análisis seriado de expresión de genes (Ginsberg, 2005) y amplificación exponencial de ARN (Fournier y cols., 2001).

Los ensayos que incrementan la sensibilidad para la obtención y cuantificación de ARN de VIH, están ganando cada vez más en importancia, con la

introducción de técnicas de medición de la carga viral, empleadas en el monitoreo de la terapia antirretroviral, y el elevado número de investigaciones moleculares que se están realizando para conocer la evolución del virus, la aparición y circulación de nuevos subtipos y recombinantes, y dilucidar el origen de la epidemia (Rodrigo, 1999).

La mayoría de los autores, recomiendan el uso de plasma libre de células para la obtención de ARN de VIH, que se utiliza en los estudios moleculares. No obstante, existen reportes que reflejan un coeficiente de variación en la cantidad de copias de ARN/100 μ L de muestra de entre un 0,09 a 0,8; al comparar el recobrado del plasma con el del suero (Holodniy y cols., 1995; Ginocchio y cols., 1997). Los niveles menores en suero pueden deberse al atrapamiento de virus durante el proceso de coagulación.

Contrariamente, muestras de suero sometidas a ciclos de congelación y descongelación revelan un incremento en el número de copias de ARN (+ 0,073 unidades log) (Moudgil y cols., 1993; Ginocchio y cols., 1997).

La mayoría de las muestras de sangre utilizadas para estudiar carga viral de VIH, se transportan en congelación y se mantienen hasta su estudio a -70°C , como plasma libre de células. Ginocchio y colaboradores (Ginocchio y cols., 1997) demostraron que la disminución de la carga viral en este tipo de

muestras, al cabo de los meses, no fue significativa, pero observaron un decrecimiento de 0,3 unidades log al realizar la comparación con el suero. Estas variaciones logarítmicas en la concentración de ARN, en las muestras sometidas a diferentes condiciones, son cruciales a la hora de obtener un resultado positivo y favorable.

La enzima RT SensiScript constituyó una herramienta valiosa en función de recobrar ARN del VIH-1 para el análisis genotípico, a partir de sueros conservados a -20°C. Ello resulta de vital importancia, no sólo para el VIH, sino para otros virus ARN y nos brinda la posibilidad de utilizar hasta por una década, muestras de suero mantenidas en los laboratorios, bajo estas condiciones de temperatura.

IV.2 Reconstrucción filogenética de las Cadenas de Transmisión de VIH-1

El nivel elevado de cambios evolutivos del VIH-1 ha conllevado a la aplicación exitosa de una variedad de herramientas filogenéticas (Lemey y cols., 2005d). Los métodos filogenéticos han reconstruido la historia evolutiva del VIH con gran precisión tanto intra como interpacientes (Akashi, 1999). A nivel epidemiológico, la filogenia molecular ha aportado revelaciones acerca del origen del VIH (Altschul y cols., 1997; Colonna y cols., 2003), su historia epidemiológica (DeBry y cols., 1993; Crandall y cols., 1999; Drummond y cols.,

2001), la migración del VIH y las rutas de infección (Endo y cols., 1996) y la transmisión del VIH entre pacientes relacionados epidemiológicamente (González y cols., 2002; 2003).

El conocimiento de la historia de la propagación del VIH entre individuos, nos aporta modelos valiosos para investigar la dinámica de transmisión del virus y para demostrar la fortaleza de los métodos empleados, al determinar la precisión de las relaciones filogenéticas, por lo cual los análisis filogenéticos no pueden ser reducidos a reconstruir simplemente una topología en un árbol. La filogenia provee un marco poderoso en el cual un grupo de hipótesis pueden ser evaluadas (Leitner y cols., 1997; Lemey y cols., 2005a).

Hay tres aspectos a tener en cuenta en los análisis epidemiológicos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas altamente variables. Primero, la elección de la región genómica tiene que estar basada en los niveles de divergencia evolutiva para el problema en consideración. Segundo, es necesario incluir muestras controles. Tercero, es importante el tiempo que media entre la toma de la muestra objeto del análisis y el momento en que ocurrió la infección (González-Candelas y cols., 2003).

Nuestro estudio devela, por primera vez, datos de secuencias nucleotídicas de cadenas de transmisión conocidas de considerable tamaño, y abre nuevas

interrogantes en un área de investigación tan necesaria para el estudio del VIH. El análisis demuestra claramente que tanto los métodos que se emplean para la reconstrucción filogenética como la búsqueda de contactos, son dos fuentes de incertidumbre a la hora de corroborar filogenéticamente cadenas epidemiológicas de transmisión.

IV.2.1 Cadena de Transmisión 1

En la Cadena de Transmisión 1 primó un subtipo de VIH-1. Los resultados del análisis de los subtipos para *gag* y *env* se muestran en la Figura 8. Basados en las 31 secuencias de *gag* obtenidas de 23 pacientes, 17 fueron clasificados como subtipo G y 6 como mosaicos. Las 30 secuencias de *env* obtenidas de 22 pacientes fueron clasificadas como subtipo G.

Teniendo en cuenta el análisis filogenético más detallado de *gag* y *env*, y de *gagenv* concatenados, 9 de 15 transmisiones analizadas fueron rechazadas, 4 de ellas basadas en el análisis de subtipos y 5 basadas en los análisis filogenéticos.

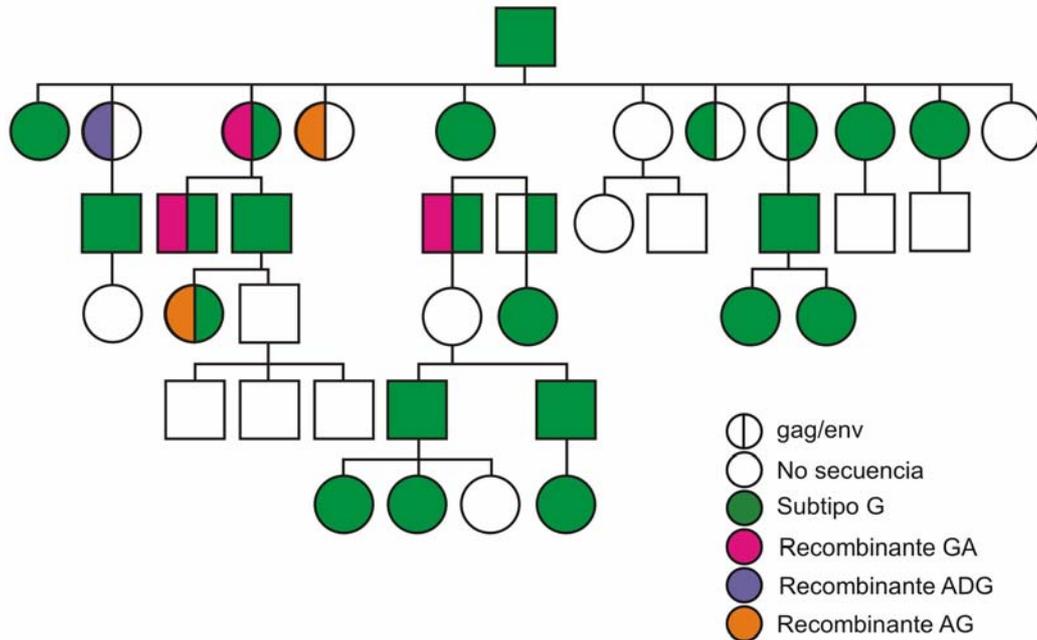


Figura 8. Representación esquemática de la clasificación de los subtipos para los genes *gag* y *env* en la Cadena de Transmisión 1

Los estudios que han explorado la recombinación antes de la realización de los análisis filogenéticos, arrojan un impacto significativo en las conclusiones que se obtienen (Sanderson y Doyle, 1992; Robertson y cols., 1995; Zhou y cols., 1997; Drounin y cols., 1999; Holmes y cols., 2002; Posada y Crandall 2002b). En la práctica, la recombinación es ignorada y sus posibles consecuencias descuidadas. Solamente unos pocos estudios han corroborado los efectos de la recombinación en el contexto filogenético. Weins (Weins, 1998) llevó a cabo

una simulación computarizada para comprender los efectos de un grupo de cepas recombinantes con diferentes historias sobre la topología de los árboles filogenéticos. Él concluyó que el análisis de los genes recombinados disminuye la oportunidad de recobrar el verdadero árbol filogenético, en dependencia de la historia epidemiológica.

Recientemente, otros autores (Schierup y Hein, 2000 a y b) caracterizaron algunas consecuencias resultantes de ignorar la recombinación, cuando emplearon filogenias para hacer inferencias demográficas, cronológicas o sustitucionales.

Los métodos de estimación filogenética son "confundidos" cuando se emplean cepas recombinantes. La recombinación conlleva a la estimación de árboles filogenéticos que no reflejan ninguna de las historias epidemiológicas reales, por lo cual los datos de las secuencias deben ser analizados previamente, para detectar la presencia de recombinación antes de realizar un análisis filogenético (Posada y Crandall 2002a).

Fundados en estas observaciones y en nuestros resultados, e ignorando la posibilidad de superinfecciones, algunos eventos de transmisión en *gag* pueden rechazarse de inmediato en los siguientes casos de esta Cadena: 3→13, 4→15→24, 6→16, 16→ [26] →33 y 16→ [26] →34. Existe la posibilidad de que

determinados pacientes (por ejemplo, el paciente 16) adquirieran una superinfección después de la transmisión, y eventualmente terminarían portando una cepa recombinante. Sin embargo, los recombinantes GA o AG tienen el mismo patrón de mosaico, sugiriendo una forma circulante en esta población y no un evento de recombinación independiente. Entre los recombinantes GA, los pacientes 4 y 14 se relacionan más estrechamente, apoyando el evento de transmisión sugerido.

Los métodos filogenéticos y la región del gen a estudiar han estado en disputa desde que la filogenia fue aplicada por primera vez en el caso del dentista de La Florida que transmitió el VIH a sus pacientes (Ou y cols., 1992).

El análisis ML es actualmente el mejor método estadístico para evaluar hipótesis de transmisión y puede ser fácilmente aplicado a análisis forenses (González-Candelas y cols., 2003; Kosiol y cols., 2006). Idealmente, ML debe ser usado durante todo el procesamiento, comenzando con la elección del modelo de sustitución nucleotídica más adecuado (Posada y Crandall, 1998 y 2001) y luego usando éste en el programa PAUP (Swofford, 1998), por ejemplo, para inferir el árbol filogenético más adecuado.

La reconstrucción del árbol ML basada en la identificación de subtipos puros para el gen *gag* se muestra en la Figura 9.

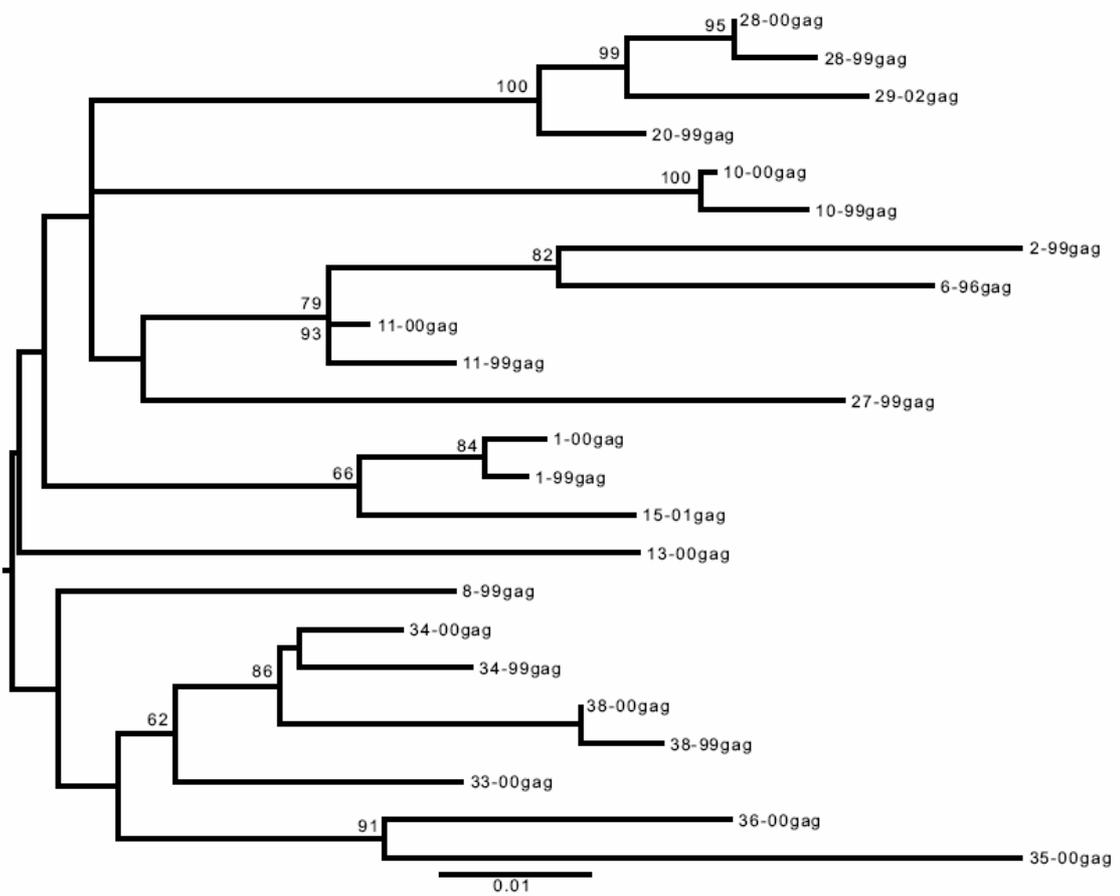


Figura 9. Árbol filogenético ML de las secuencias de *gag* de las muestras de la Cadena de Transmisión 1

Como es de esperar, todas las secuencias de un mismo paciente, obtenidas en diferentes momentos, se agrupan filogenéticamente en el árbol ML. Este árbol apoya algunos de los supuestos eventos de transmisión: 20→28, 20→29, 34→38. Debemos resaltar que el análisis de bootstrap aporta poca confiabilidad al analizar las ramas más profundas del árbol, lo cual implica que cualquier agrupamiento localizado cercano a la raíz es poco apoyado por los datos.

No obstante, el análisis ML puede conducir a resultados inciertos cuando, debido a la extrema variabilidad de los virus ARN, algunas secuencias o secuencias aisladas procedentes de un paciente o de diferentes pacientes, fallan para agruparse monofiléticamente con el resto de las secuencias consideradas como parte de un brote común. En este caso, los procedimientos usuales para la evaluación estadística de ancestros comunes, tales como el apoyo del bootstrap definiendo nodos monofiléticos, resulta inútil (González-Candelas, 2003).

En consecuencia, se analizó si las hipótesis de transmisión - que no fueron apoyadas por el árbol ML -, fueron significativamente rechazadas, comparando los árboles ML, con los árboles forzados a ser consistentes con la hipótesis de transmisión, empleando las pruebas de Kishino-Hasegawa (Kishino y cols., 1989) y Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira y cols., 1999). Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 6.

Aparte de los cuatro eventos de transmisión apoyados, los datos del gen *gag* no rechazan significativamente otros dos eventos de transmisión. Las restantes transmisiones fueron rechazadas desde un inicio por el análisis de subtipos/recombinantes.

Tabla 6. Comparación del árbol ML de la Cadena de Transmisión 1, con los árboles forzados a ser consistentes con la hipótesis de transmisión, empleando las pruebas de Kishino-Hasegawa y Shimodaira-Hasegawa.

Transmisión	<i>gag</i>	<i>env</i>	<i>gag/env</i>
3 → 13	Rechazada *	ND	ND
15 → 24	Rechazada *	No rechazada p=0,539; p=0,270	ND
4 → 15	Rechazada *	No rechazada p=0,155; p=0,077	ND
4 → 14	Apoyada	No rechazada p=0,092; p=0,052	ND
20 → 29	Apoyada	Apoyada	Apoyada
20 → 28	Apoyada	No rechazada p=0,480; p=0,236	Apoyada
9 → 20	ND	Rechazada p=0.024, p=0.023	ND
33 → 35	No rechazada p=0.372, p=0.184	No rechazada p=0,116; p=0,059	No rechazada p=0,712; p=0,348
33 → 36	No rechazada p=0,372; p=0,184	No rechazada p=0,216; p=0,107	No rechazada p=0,712; p=0,348
34 → 38	Apoyada	Apoyada	Apoyada
16 → [26] → 33	Rechazada *	No rechazada p=0,268; p=0,400	ND
16 → [26] → 34	Rechazada *	No rechazada p=0,399; p=0,195	ND
6 → 16	Rechazada *	No rechazada p=0,608; p=0,298	ND
17 → 27	ND	Rechazada p<0,001; p<0,001	ND
6 → 17	ND	Rechazada p=0,020; p=0,010	ND

Los valores p se muestran para las pruebas Kishino-Hasegawa y Shimodaira-Hasegawa respectivamente.

Las transmisiones se agrupan de acuerdo a las subcadenas de los receptores del paciente 1. Las muestras de los pacientes que no estuvieron disponibles se indican entre corchetes. En tales casos se estudian los eventos de transmisión sobre estos pacientes. Algunos análisis no pudieron ser realizados (no disponibles, ND) debido a la ausencia de una muestra o a la presencia de recombinación en el gen *gag* y por lo tanto no pudieron ser concatenados con la región del gen *env*. * transmisiones rechazadas basadas en el análisis de subtipos (Figura 8).

El procedimiento de análisis por sí mismo y la interpretación de las pruebas de transmisión del paciente 1 a los supuestos receptores, se complejizan. Para que el evento de transmisión pueda ser apoyado el único requerimiento es que el paciente 1 se agrupe monofiléticamente con uno de sus receptores, lo cual no se evidencia en la topología del árbol ML. Esto puede deberse a que el paciente 15 es también un receptor del paciente 1, o a que el paciente 1 no es el primer donante.

El árbol ML que se basa en las secuencias del gen *env* se muestra en la Figura 10. En este árbol, todas las secuencias obtenidas de un mismo paciente en diferentes tiempos de muestreo, se agrupan filogenéticamente, la mayoría con un valor de bootstrap convincente. Este árbol sólo apoya dos eventos de transmisión (20→29, 34→38), los cuales están igualmente apoyados en *gag*. El paciente 28, también se agrupa cerca de los pacientes 20 y 29, pero no se reconstruyó una relación monofilética.

Los resultados del análisis (Tabla 6) indican que las secuencias del gen *env*

evolutivos (Lemey 2005b). Por ejemplo, el uso de la región C2-V3 de *env* ha sido criticado debido a la posible evolución convergente, mientras que la región *pol* pudiese no conferir la variabilidad suficiente (Holmes y cols., 1993). El análisis de cadenas de transmisión conocidas ha demostrado que debemos considerar fundamentalmente el contenido informativo de los marcadores genéticos, que están tanto en función de la longitud del fragmento como de su variabilidad (Leitner y cols., 1996; Leitner y Fitch, 1999; Leitner y Albert, 2000).

Stümer y colaboradores (Stümer y cols., 2005) favorecen el uso de la región V3 de la envoltura para establecer una relación epidemiológica, mientras que Jenwitheesuk y Liu (Jenwitheesuk y Liu, 2005), en un estudio posterior, cuestionan el uso de esta región.

Lemey y Vandamme en 2005 (Lemey y Vandamme, 2005d) evaluaron tres cadenas epidemiológicas pequeñas de transmisión de VIH-1, secuenciando casi completamente el genoma de las muestras y encontraron que mientras mayor es el fragmento de gen que se estudió (≥ 800 pb) se incrementó el apoyo filogenético de la transmisión epidemiológica. No encontraron que *gag* y *env* apoyaran todas las transmisiones. Una de las cadenas fue apoyada filogenéticamente al estudiar la región V1-V5 de la gp 120 en *env* y el análisis del gen *gag* apoyó solamente una de las transmisiones. En otro estudio, los

mismos autores observaron que el apoyo filogenético de cadenas de transmisión a través del genoma puede ser caso específico y no parece estar grandemente moderado por una fuerza funcional a través del genoma (Lemey y cols., 2005c).

González-Candelas y colaboradores, también en 2005 (González-Candelas y cols., 2005), al estudiar cadenas epidemiológicas describieron que cuando los fragmentos de secuencias nucleotídicas analizados fueron de aproximadamente 800 pb, las relaciones epidemiológicas fueron más apoyadas desde el punto de vista filogenético y para uno de los grupos estudiados (transmisión madre-hijo) el bootstrap apoyó significativamente la transmisión al estudiar el fragmento V1-V5 del gen *env*.

Leitner y colaboradores (Leitner y cols., 1996) hallaron que la exactitud en la reconstrucción de los árboles filogenéticos se incrementa al aumentar la cantidad de información genética utilizada en el análisis.

El árbol ML basado en las secuencias concatenadas *gag* y *env* se muestra en la Figura 11. Este árbol apoya los mismos eventos de transmisión que el árbol ML de *gag*. Si los eventos de transmisión supuestos no ocurrieron en realidad, incrementar la información de secuencia conllevaría una probabilidad mayor de rechazo de la transmisión. No es el caso de la transmisión del paciente 33 al 35

y al 36. Este evento de transmisión pudiese ser real pero no existe suficiente información filogenética para apoyarlo.

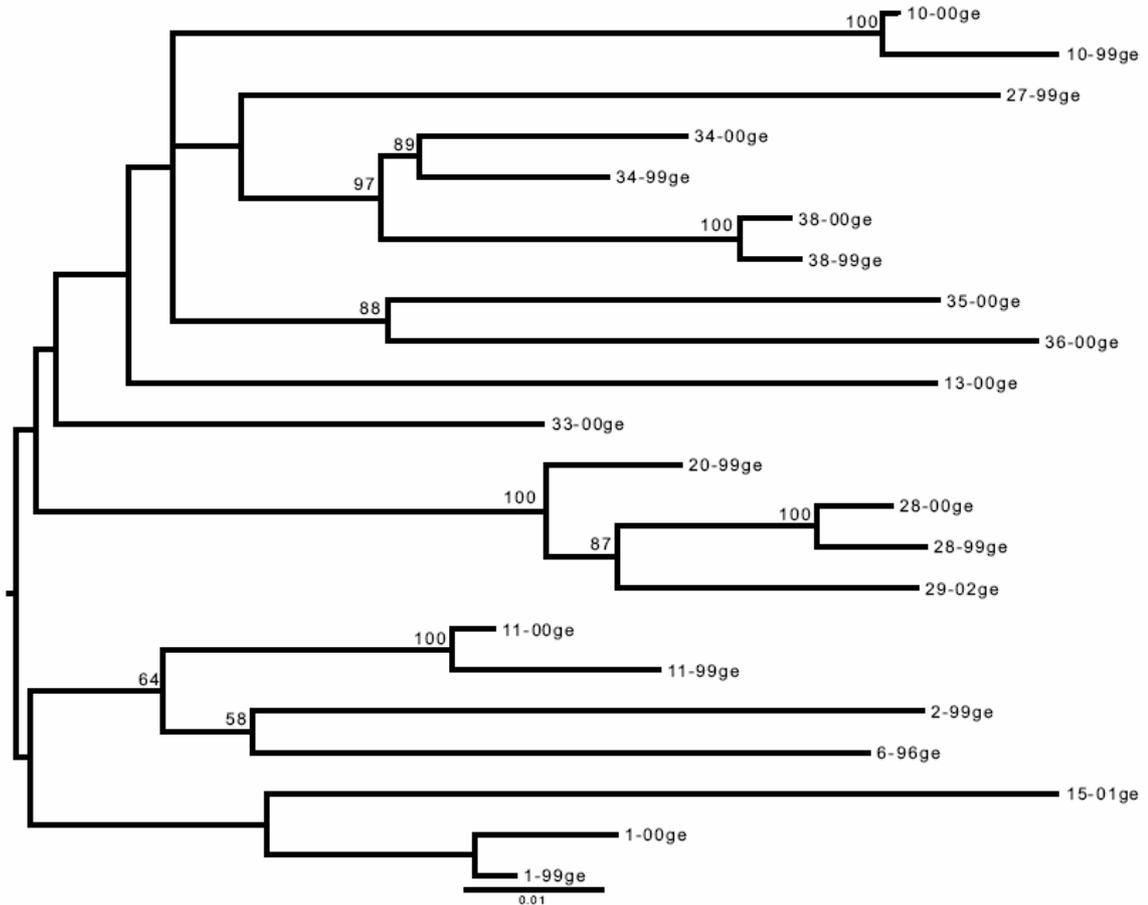


Figura 11. Árbol filogenético ML de las secuencias concatenadas de *gag* y *env* de las muestras de la Cadena de Transmisión 1

Tenemos alguna información adicional obtenida de este árbol que favorece la credibilidad de este evento de transmisión: cuando se forzó una relación monofilética para los pacientes 33, 35 y 36 en la región concatenada *gagenv*, estas secuencias también se agruparon monofiléticamente con las secuencias

de los pacientes 34 y 38, como es de esperar, para la historia de transmisión supuesta.

Adicionalmente, se investigó si las transmisiones apoyadas aún se mantenían en presencia de secuencias controles epidemiológicamente no relacionadas y procedentes de otras áreas geográficas. Se reconstruyeron árboles filogenéticos mediante una investigación de similitud para verificar si las secuencias obtenidas de las cadenas de transmisión se agrupaban monofiléticamente, aún en presencia de secuencias controles altamente similares.

Moya y colaboradores, en 2004 (Moya y cols., 2004), ya habían reportado que la topología de los árboles filogenéticos utilizando ML, refleja grupos monofiléticos al comparar las secuencias de VIH-1 de pacientes relacionados epidemiológicamente con las de la población no relacionada. Bracho y colaboradores, en 2005 (Bracho y cols., 2005), demuestran la necesidad de incorporar secuencias controles para estudiar transmisión entre casos o brotes, lo cual es importante para apoyar grupos monofiléticos. Sólo debemos tomar en cuenta que si se emplean secuencias procedentes de un mismo grupo poblacional, pueden finalmente derivar de un ancestro común y falsear los resultados.

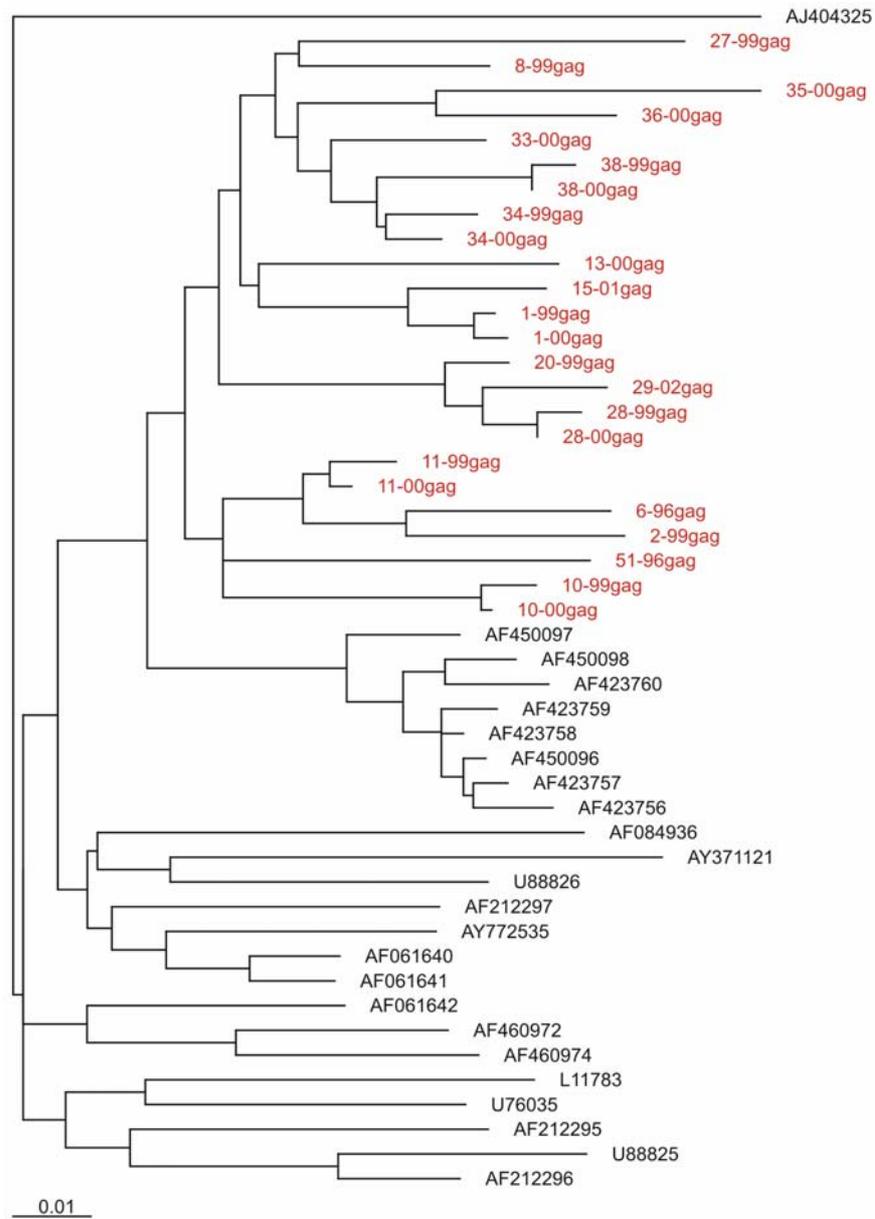


Figura 12. Árbol filogenético ML de las secuencias del gen *gag* de las muestras de la Cadena de Transmisión 1 clasificadas como subtipo G y de secuencias controles altamente similares y epidemiológicamente no relacionadas

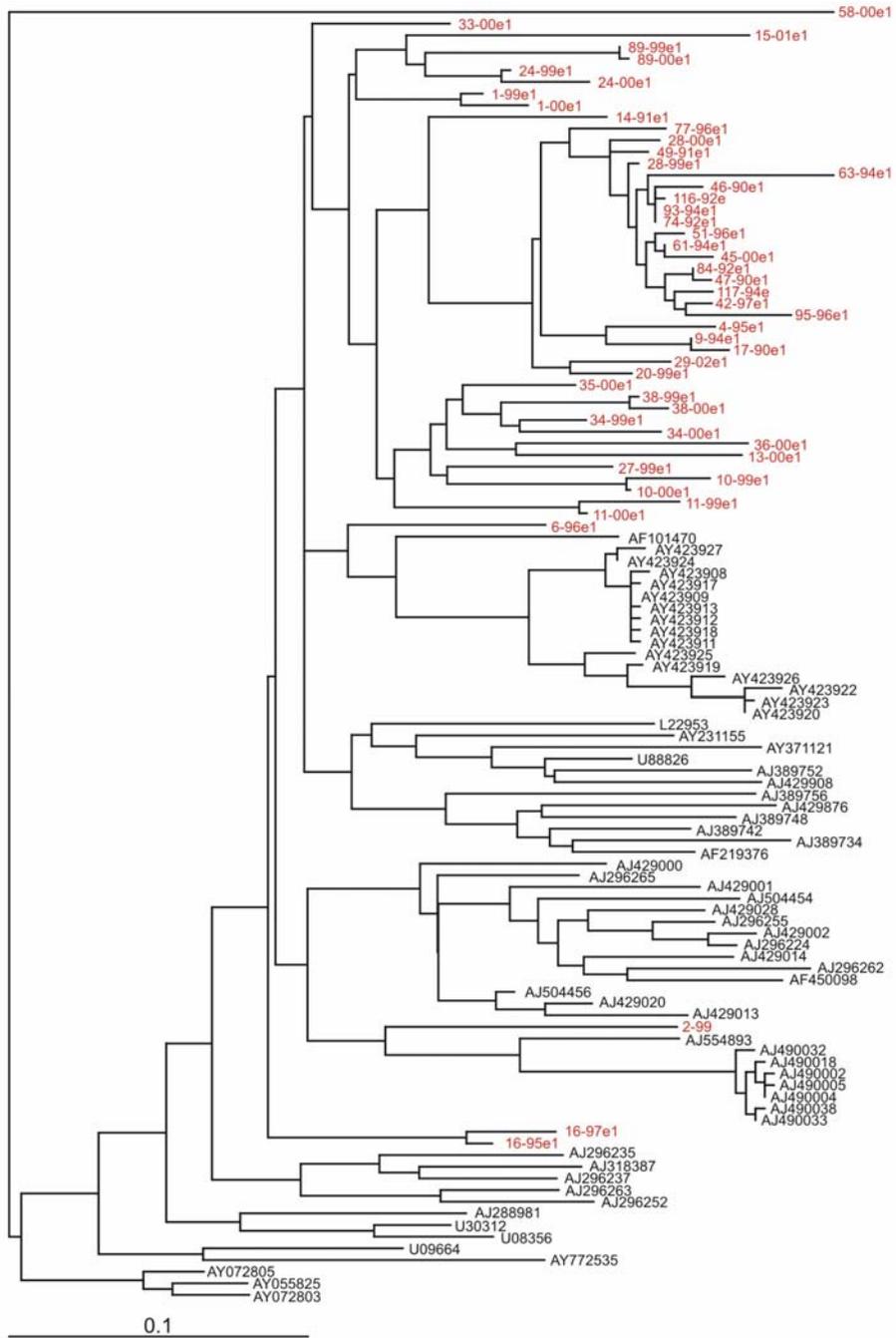


Figura 13. Árbol filogenético ML de las secuencias del gen *env* de las muestras de las Cadenas de Transmisión 1 y 2 clasificadas como subtipo G y de secuencias controles altamente similares y epidemiológicamente no relacionadas

Las cepas no recombinantes en *gag* forman un grupo distinto con respecto a la mayoría de las secuencias similares analizadas (Figura 12), confirmando que las transmisiones no fueron rechazadas en el contexto de secuencias similares del subtipo G, epidemiológicamente no relacionadas.

Para la región analizada del gen *env*, las secuencias cubanas del subtipo G no formaron un grupo monofilético, reflejando la poca señal filogenética de este corto segmento (Figura 13). Sin embargo, las transmisiones apoyadas con las pruebas filogenéticas realizadas previamente, tampoco fueron rechazadas en el contexto de secuencias similares del subtipo G, epidemiológicamente no relacionadas.

IV.2.2 Cadena de Transmisión 2

La Cadena de Transmisión 2 fue considerablemente más grande e incluyó más eventos de transmisión. Dieciocho de 26 transmisiones analizadas fueron rechazadas basadas en el subtipaje para *gag* y *env*. Solamente una pequeña cantidad de transmisiones pudieron ser apoyadas filogenéticamente. Los resultados indican que la búsqueda de contactos, incluso cuando la realiza el personal médico y de enfermería experimentado, debe ser utilizada con cautela. Para una población sexualmente más activa, como la que incluye esta cadena, la búsqueda de contactos será menos realista a la hora de identificar eventos

de transmisión específicos, aunque continúa siendo útil en la identificación de personas con riesgo de infección.

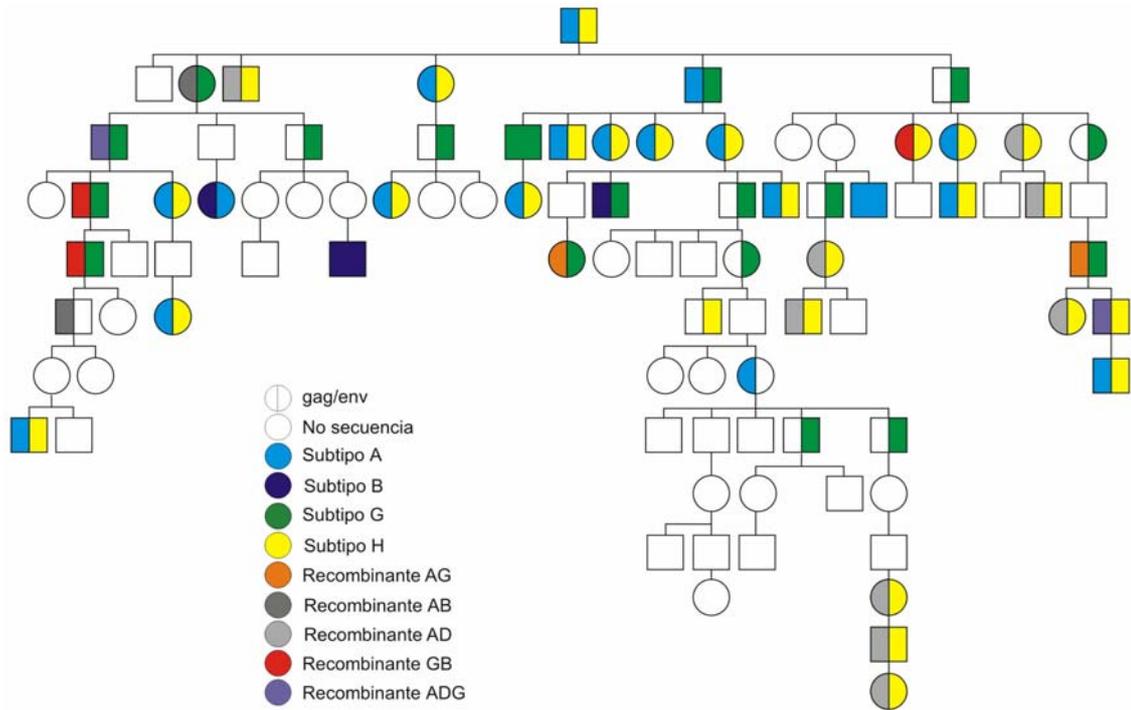


Figura 14. Representación esquemática de clasificación de los subtipos para los genes *gag* y *env* en la Cadena de Transmisión 2

Los resultados de los análisis de subtipos de *gag* y *env* se muestran en la Figura 14. De las 45 secuencias de *gag* obtenidas de 40 pacientes, el subtipo mayoritariamente prevalente es A (n=18), seguido de B (n=3) y un G. Además, se identificaron 18 recombinantes intragen. Para la región de *env*, de 53 secuencias obtenidas de 48 pacientes, 18 fueron clasificados como subtipo G, 18 subtipos H, 11 subtipos A y una secuencia subtipo B.

La epidemia cubana de VIH se caracteriza por la circulación de una variedad de subtipos y FRC (Pérez y cols., 1993; Rolo y cols., 1995; Torres y cols., 2000; Gómez y cols., 2001; Cuevas y cols., 2002; de Arazoza y cols., 2003; Thomson y cols., 2005) y es interesante apuntar, que una población sexualmente más activa porta múltiples recombinantes intersubtipos (Herbinger y cols., 2006), lo cual constituye un fenómeno esperado para dinámicas de transmisión complejas en el contexto de una gran diversidad genética viral, como la existente en Cuba (Pérez y cols., 1993; Rolo y cols., 1995; Torres y cols., 2000; Gómez y cols., 2001; Cuevas y cols., 2002; de Arazoza y cols., 2003; Thomson y cols., 2005).

En la República del Congo, un análisis realizado en paralelo de secuencias de los genes *gag* y *env* de individuos infectados con el VIH-1 entre los años 1999 y 2000, reveló un 53% de infecciones con subtipos concordantes en ambos genes, mientras que el 47% de las muestras analizadas mostraron subtipos discordantes (Yang y cols., 2005). La alta prevalencia de subtipos discordantes se corresponde con las áreas donde cocirculan múltiples subtipos. En Kenia, en un estudio de análisis de secuencias de genoma completo de cepas de VIH-1, se encontró que el 39 % de las muestras examinadas resultaron ser FRU (Dowling y cols., 2002).

La superinfección con cepas de diferentes subtipos emerge con más frecuencia entre drogadictos endovenosos que comparten jeringuillas inoculándose altas dosis de virus y en personas que practican sexo no protegido (Nájera y cols., 2002). Evidencias crecientes sugieren que relaciones sexuales no protegidas continúan ocurriendo entre individuos seropositivos al VIH-1 (Kelly y cols., 1998; Kravcik y cols., 1998; Blackard y cols., 2002), particularmente entre hombres que realizan sexo con hombres (Ekstrand y cols., 1999; Waldo y cols., 2000). Muchos de ellos no perciben el riesgo que esto conlleva, al aumentar la prevalencia de superinfecciones y la aparición de nuevos recombinantes que aceleran y alteran la historia natural de la enfermedad.

Fang y colaboradores (Fang y cols., 2004), demostraron que individuos infectados con VIH-1, altamente expuestos, pueden tener más riesgo de superinfección que conlleva a recombinación que aquellos con exposición limitada. No ha sido demostrado que la recombinación ocurra solamente durante el período de infección primaria o que pudiese ser el resultado de superinfección durante la infección crónica no tratada.

El subtipaje en *gag* y *env* ya indica que la mayoría de las supuestas transmisiones deben ser rechazadas. No obstante, se investigaron los eventos de transmisión entre sujetos que portaban cepas con el mismo subtipo genético

en *gag* y *env*. En la Figura 15 A y B se muestran los árboles ML para las cepas A^{gag}/H^{env} y AD^{gag}/A^{env} , respectivamente.

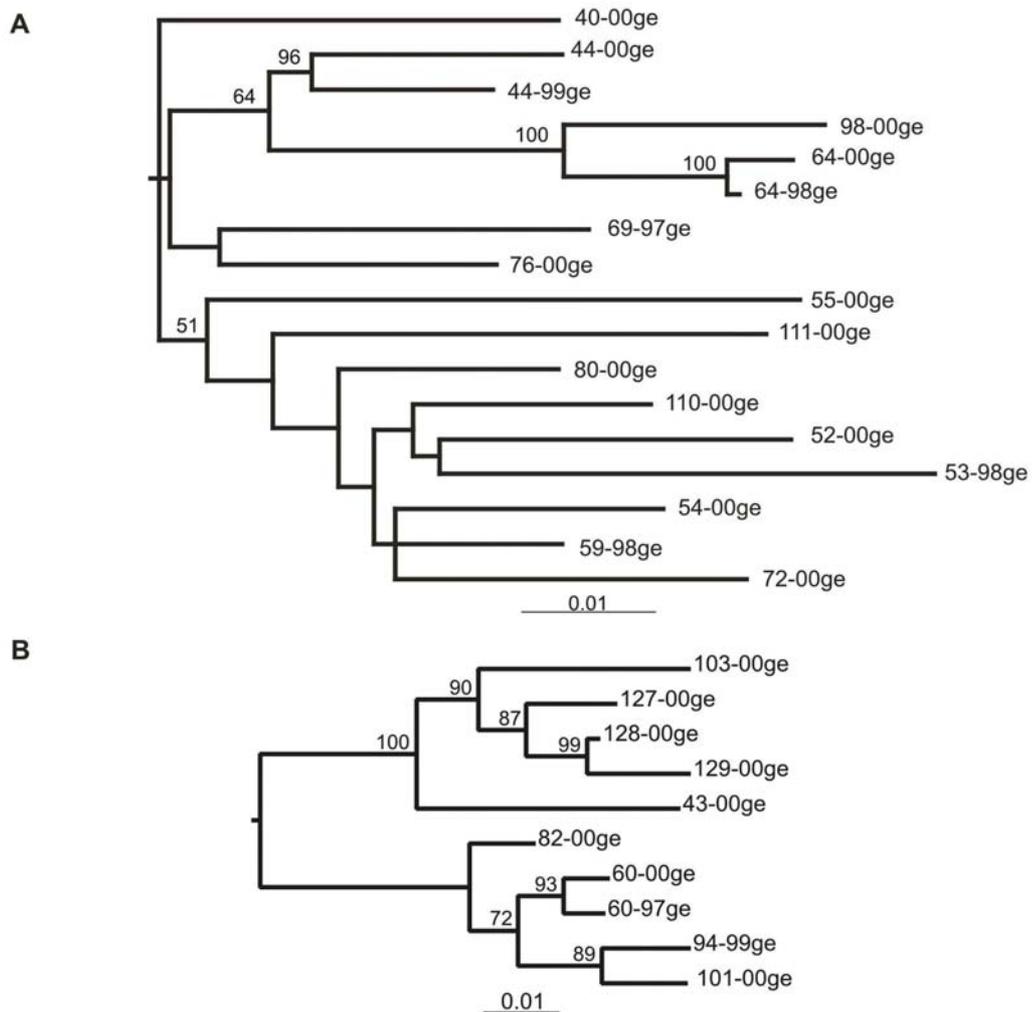


Figura 15. Árbol filogenético ML de las secuencias concatenadas de *gag* y *env* de las muestras de la Cadena de Transmisión 2 (A: recombinantes A^{gag}/H^{env} , B: recombinantes AD^{gag}/A^{env})

El árbol ML, basado en las secuencias AD^{gag}/A^{env} , apoya las transmisiones

94→101 y 127→128→129. Las secuencias de los pacientes 60 y 82, también se agrupan cercanas, pero no monofiléticamente. Sin embargo, la relación no es significativamente rechazada (Tabla 7). Incluso, si ellos no se agrupan monofiléticamente, el evento de transmisión pudiera ser verdadero si uno de los dos pacientes fuese el donante del paciente 94. La transmisión 63→84 es apoyada como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación del árbol ML de la Cadena de Transmisión 2 con los árboles forzados a ser consistentes con la hipótesis de transmisión, empleando las pruebas de Kishino-Hasegawa y Shimodaira-Hasegawa.

Transmisión	<i>gagenv</i>
64 → [86] → 98	Apoyada
59 → 80	No rechazada p=0,740; p=0,360
60 → 82	No rechazada p=0,891; p=0,441
44 → [50] → 69	No rechazada p=0,500; p=0,250
94 → 101	Apoyada
127 → 128	Apoyada
128 → 129	Apoyada
63 → 84	Apoyada

Los valores p se muestran para las pruebas Kishino-Hasegawa y Shimodaira-Hasegawa respectivamente. Las transmisiones se agrupan de acuerdo a que las cepas muestren el mismo subtipo en el gen gag y en el env. Las muestras de los pacientes que no estuvieron disponibles se indican entre corchetes. En tales casos se estudian los eventos de transmisión sobre estos pacientes.

Para las cepas A^{gag}/H^{env} , el evento de transmisión 64→ [86] →98 se apoya por la estructura del árbol filogenético (Figura 15A). Otros dos eventos de transmisión, 59→80 y 44→ [50] →69, no son apoyados pero tampoco rechazados (Tabla 7).

IV.3 Análisis de recombinantes

La distribución geográfica de los subtipos es un proceso dinámico e impredecible ya que la mezcla de diferentes variantes de VIH-1 es inevitable. Los virus recombinantes ya están contribuyendo sustancialmente a la pandemia y la posibilidad de generación de virus recombinantes continuará incrementándose a medida que los diferentes subtipos se diseminen globalmente (Peeters, 2000; Takabe y cols., 2004). Incluso, virus recombinantes conllevan evolutivamente a una segunda generación de recombinantes (Yang y cols., 2003; Konings y cols., 2006).

El patrón de mosaico de los recombinantes, en ambas cadenas, es revelado por el análisis de trazados de similitud y bootscan (Figura 16A-H). Algunos de los recombinantes intragen *gag* (AG y ADG) tienen el mismo patrón mosaico para ambas cadenas.

El recombinante AG, identificado en ambas cadenas, tiene un punto de ruptura alrededor de la posición nucleotídica 1235 en *gag*, de acuerdo con la numeración de HXB2 (<http://hiv-web.lanl.gov/>) (Figura 16A). Aunque es similar

al patrón AG recombinante de CRF04_cpx (Gao y cols., 1998) las partes separadas A y G de la recombinante identificada, exhiben mayor similitud con los subtipos de referencia que con CRF04_cpx.

El recombinante AD, identificado en los pacientes de la Cadena 2, tiene un punto de ruptura alrededor de la posición nucleotídica 1130 en *gag* (Figura 16B).

La secuencia de *gag* se concatenó a partir de los productos de amplificación de dos RCP (*gag1* y *gag2*) que se solapaban en aproximadamente 100 pb (1231-1332). Hay dos puntos de ruptura que están cercanos a la zona de solapamiento: en el recombinante AG (1235) y en el AD (1130). Sin embargo, estos recombinantes fueron confirmados en ambos casos usando una segunda muestra: AG fue confirmado en el paciente 89 y AD en el 60.

El recombinante ADG, que infecta a pacientes de ambas cadenas, tiene solamente una pequeña porción del subtipo D antes del punto de cambio al subtipo G (Figura 16C).

Para investigar este recombinante con más detalle, se desarrollaron trazados de similitud que incluyeron los otros recombinantes cubanos y los subtipos puros A y G, identificados en ambas cadenas (Figura 16D).

Para más claridad, las secuencias cubanas del subtipo A y G, se incluyeron por

separado y como un grupo, respectivamente. Es interesante cómo se nos revela que la recombinante ADG, al parecer, deviene una segunda generación de recombinante, del recombinante AD y del subtipo G, e incluso del recombinante AG (Figura 16E).

En la Figura 16F se muestra el patrón de mosaico del recombinante AB que tiene un punto de ruptura alrededor de la posición nucleotídica 1265 en *gag*.

Se pudo identificar el recombinante GA en la Cadena 1 (Figura 16G) y el GB en la Cadena 2 (Figura 16H).

Los países con un número elevado de tipos, subtipos y formas circulantes de VIH, constituyen las llamadas "zonas calientes" donde generaciones de formas recombinantes emergen en individuos portadores de infecciones duales o múltiples debido a la cocirculación de diversas variantes del virus (Allen y Altfeld, 2003).

Como ya habíamos señalado, la epidemia cubana de VIH se caracteriza por la circulación de una variedad de subtipos y FRC (Pérez y cols., 1993; Rolo y cols., 1995; Torres y cols., 2000; Gómez y cols., 2001; Cuevas y cols., 2002; de Arazoza y cols., 2003; Thomson y cols., 2005) por lo cual puede ser definida como una "zona geográfica caliente" para la emergencia de cepas recombinantes. Se han identificado otras áreas como Myanmar central (Takebe

y cols., 2003), el sudeste de China (Yang y cols., 2002), África del Este (Dowling y cols., 2002; Harris y cols., 2002), Argentina (Thomson y cols., 2002a; Sierra y cols., 2005) y Brasil (Thomson y cols., 2004). En algunos casos, los recombinantes generados se convierten en circulantes y se propagan a áreas cercanas (Yang y cols., 2002; Thomson y cols., 2002a).

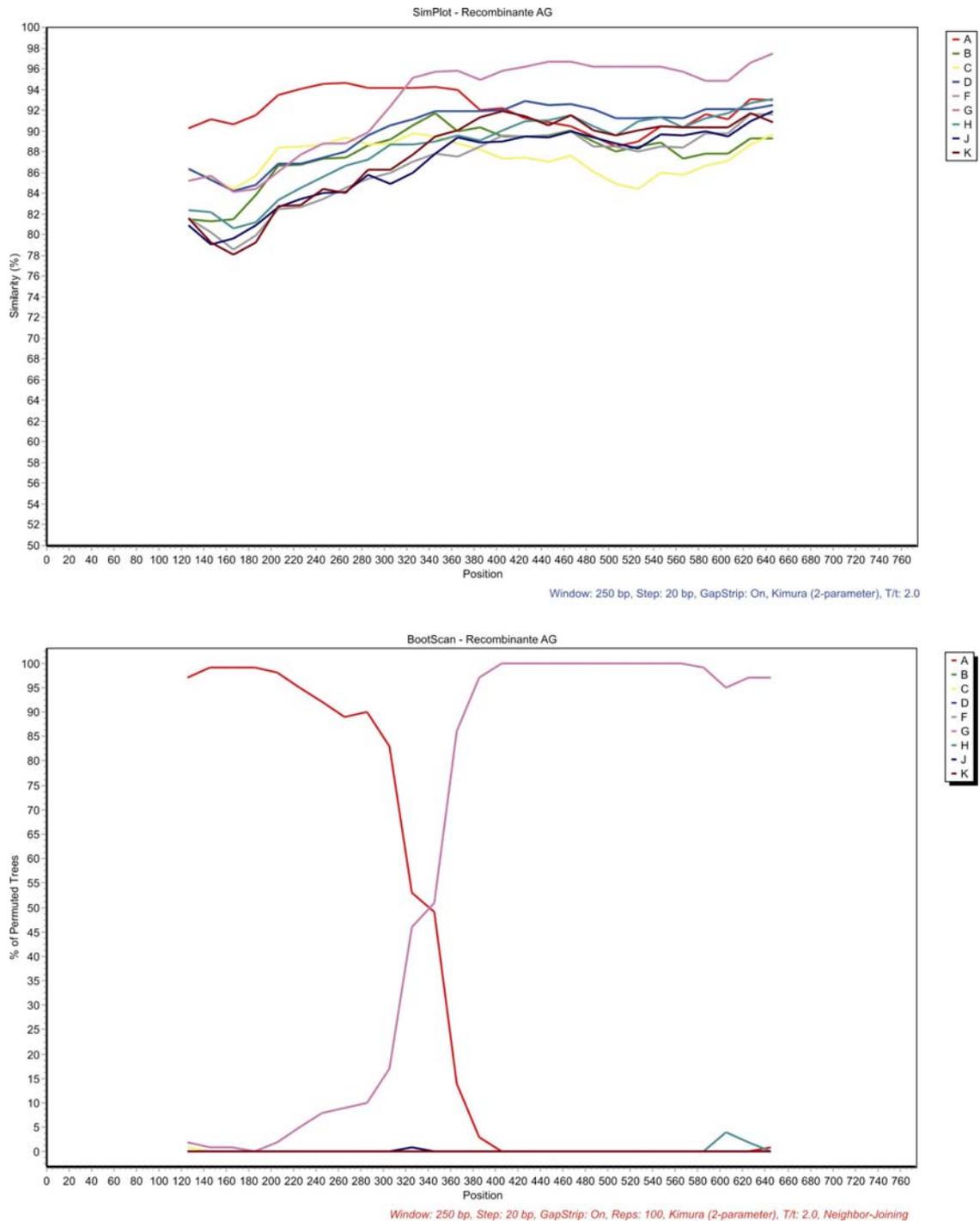


Figura 16A. Análisis mediante trazado de similitud y BootScan del recombinante AG en *gag*.

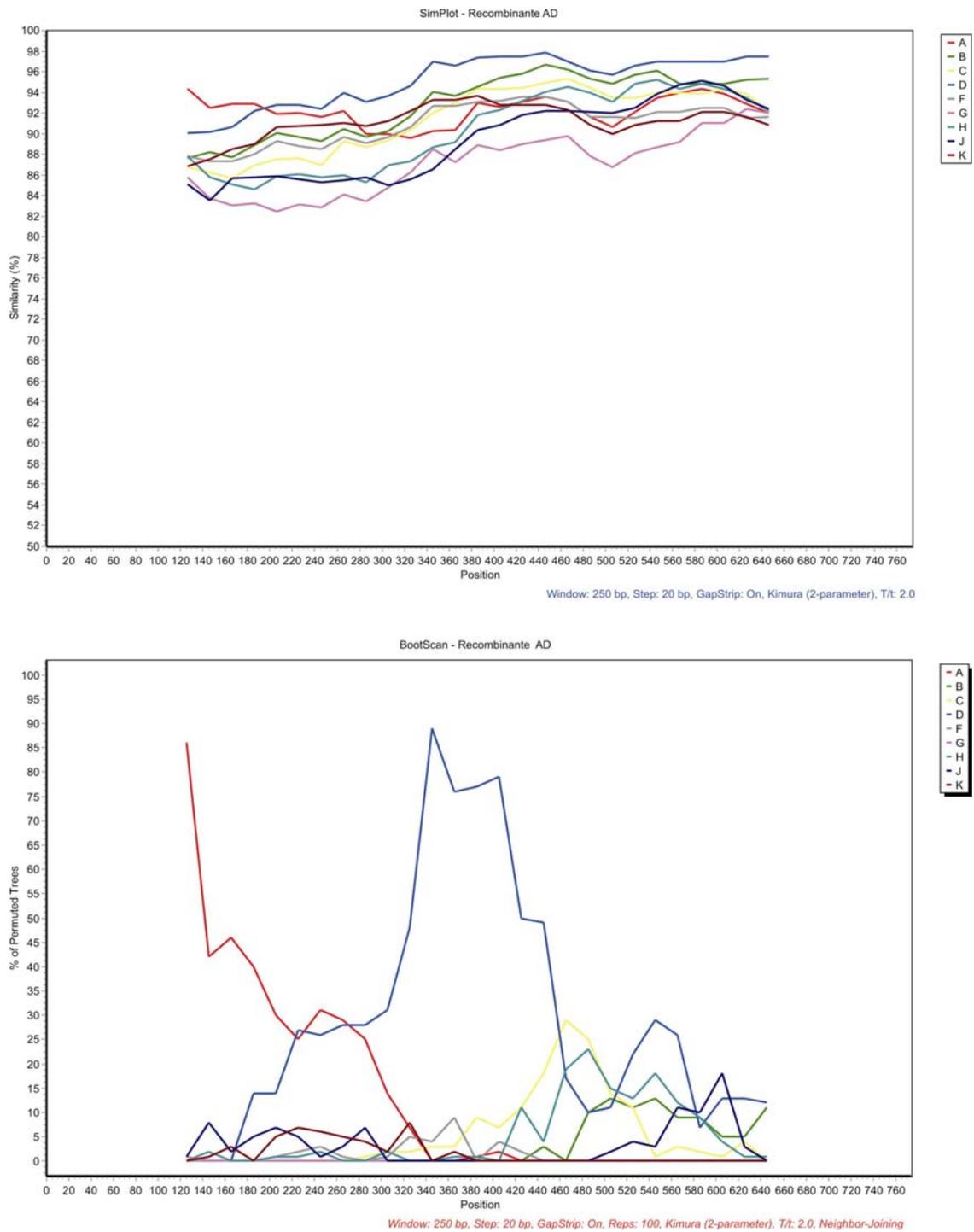


Figura 16B. Análisis mediante trazado de similitud y BootScan del recombinante AD en *gag*.

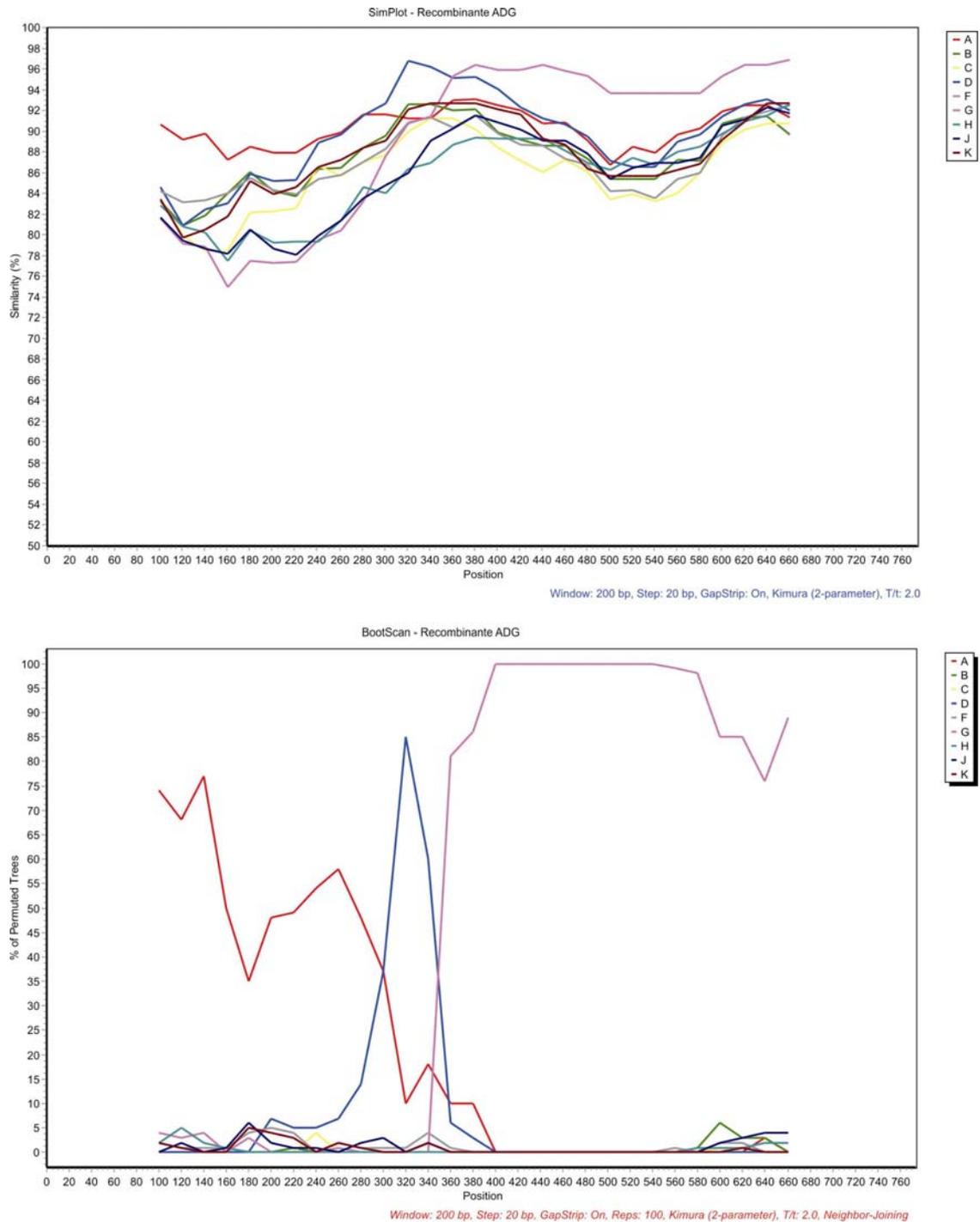


Figura 16C. Análisis mediante trazado de similitud y BootScan del recombinante ADG en *gag*.

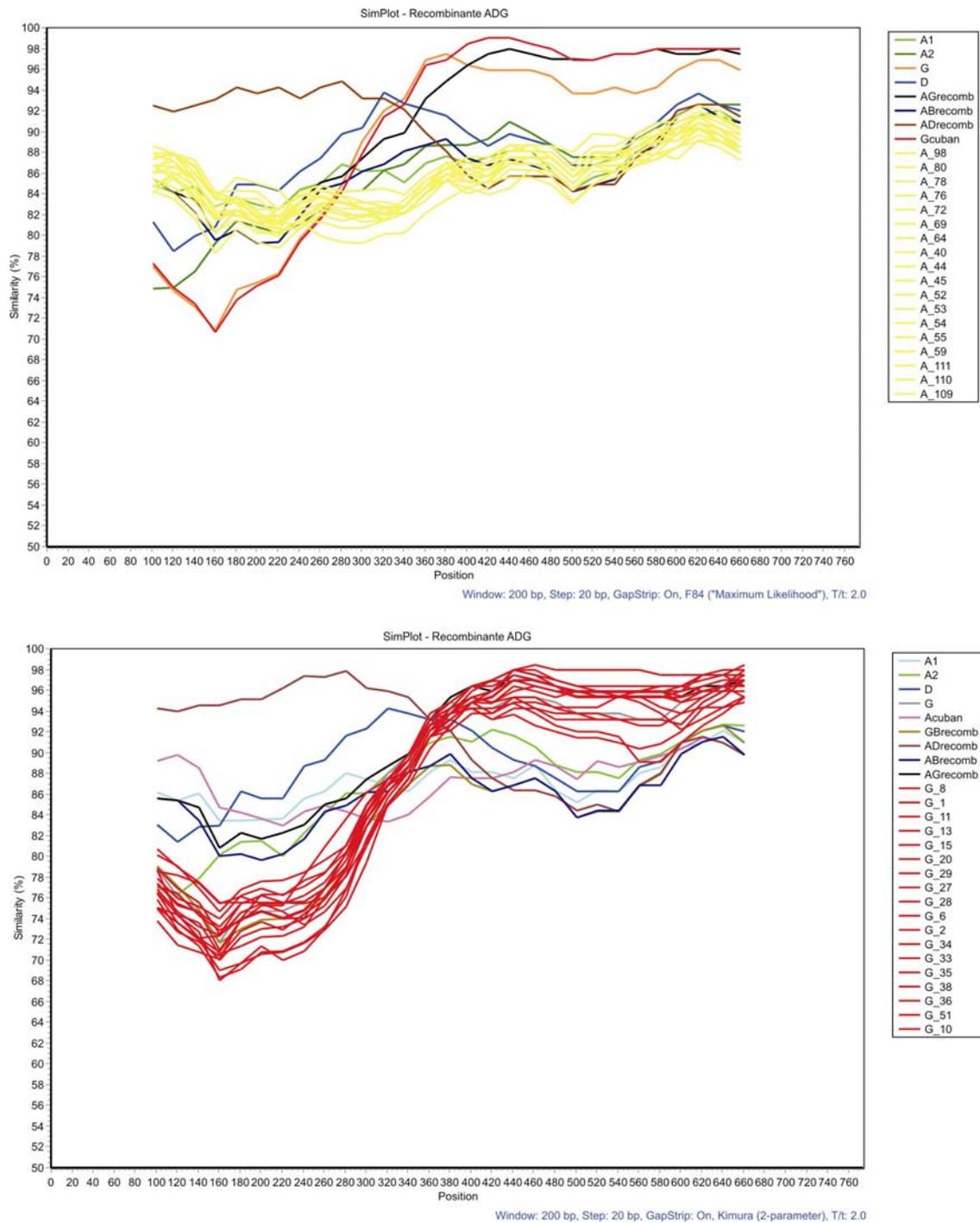


Figura 16D. Análisis mediante trazado de similitud del recombinante ADG en gag, los otros recombinantes cubanos y los subtipos puros A y G, identificados en ambas cadenas de transmisión.

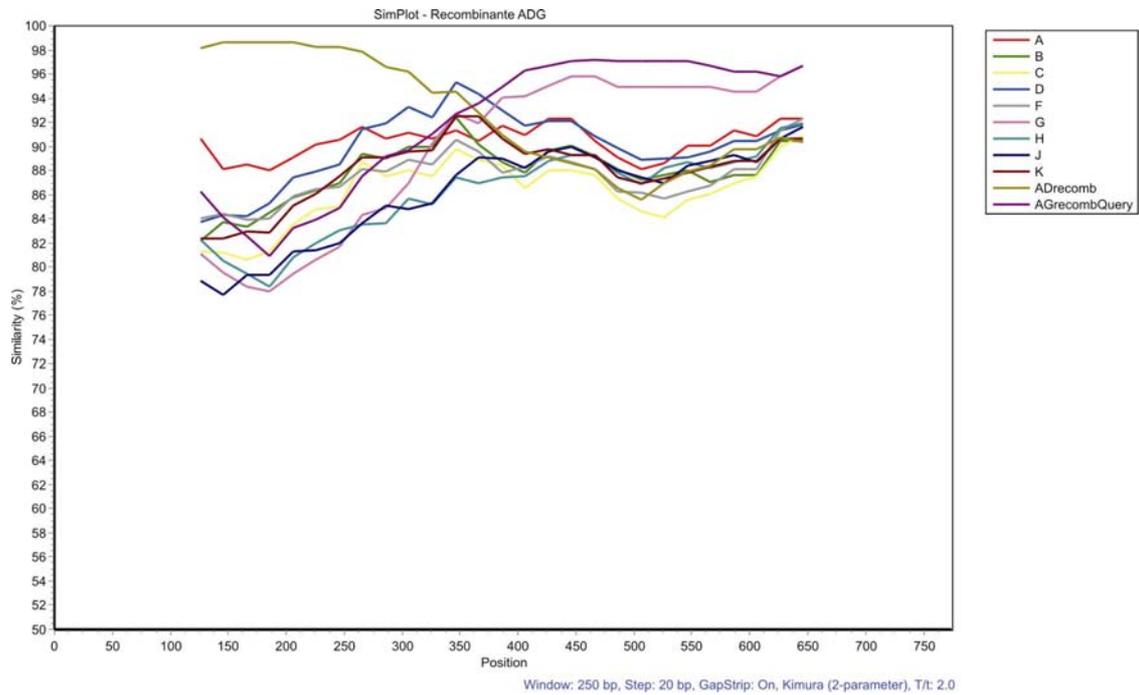


Figura 16E. Análisis mediante trazado de similitud del recombinante ADG y los recombinantes AD y AG cubanos en *gag*.

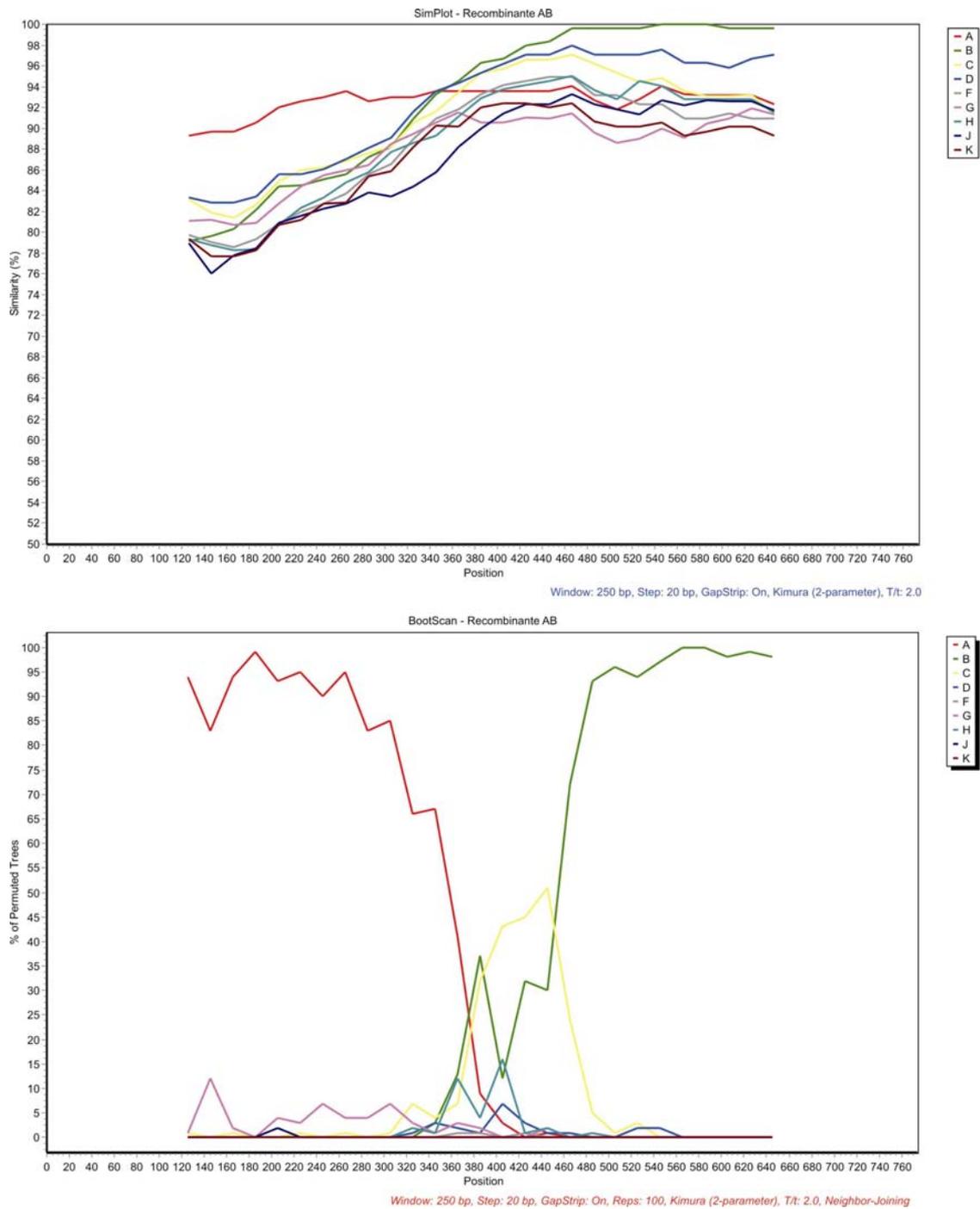


Figura 16F. Análisis mediante trazado de similitud y BootScan del recombinante AB en *gag*.

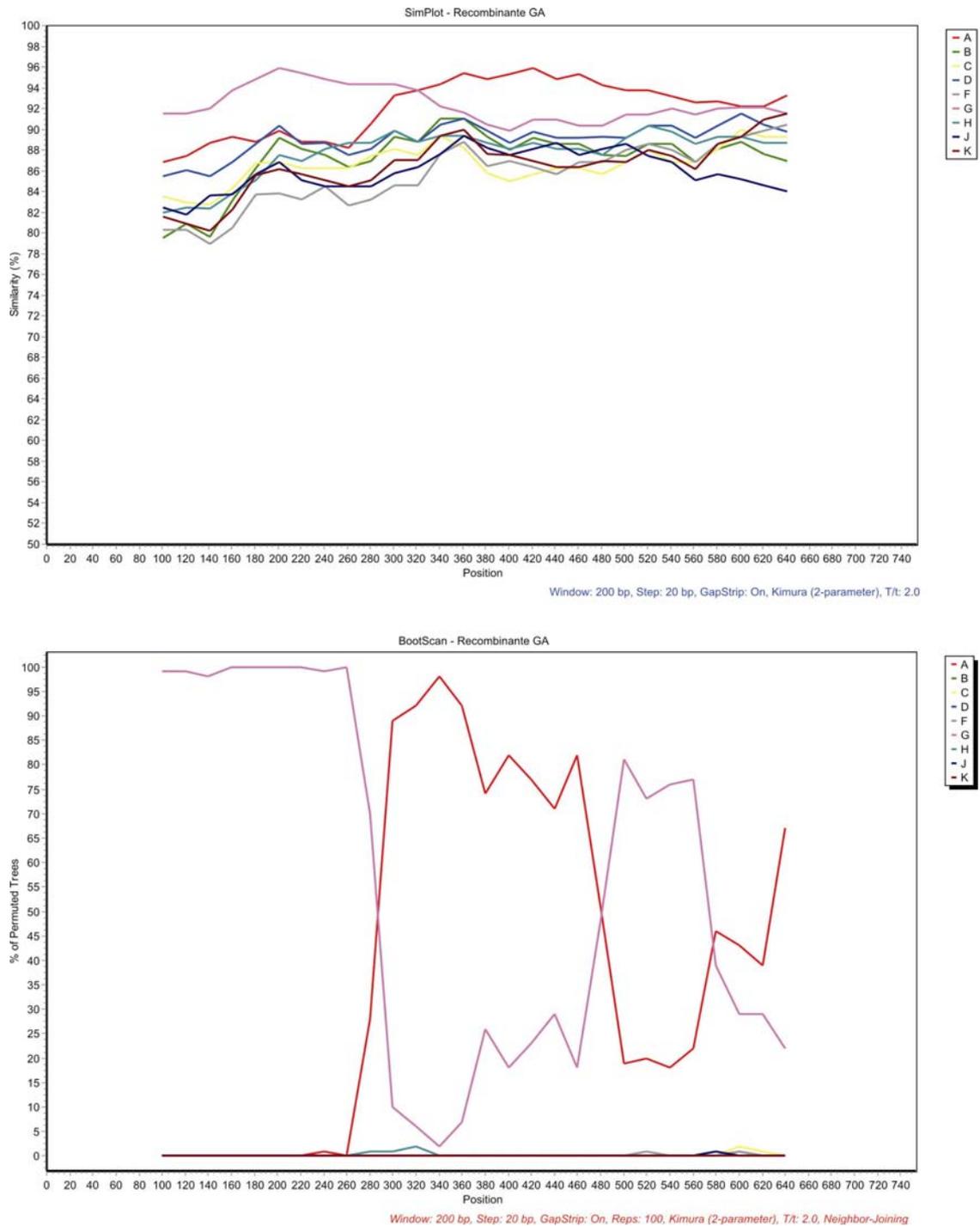


Figura 16G. Análisis mediante trazado de similitud y BootScan del recombinante GA en *gag*.

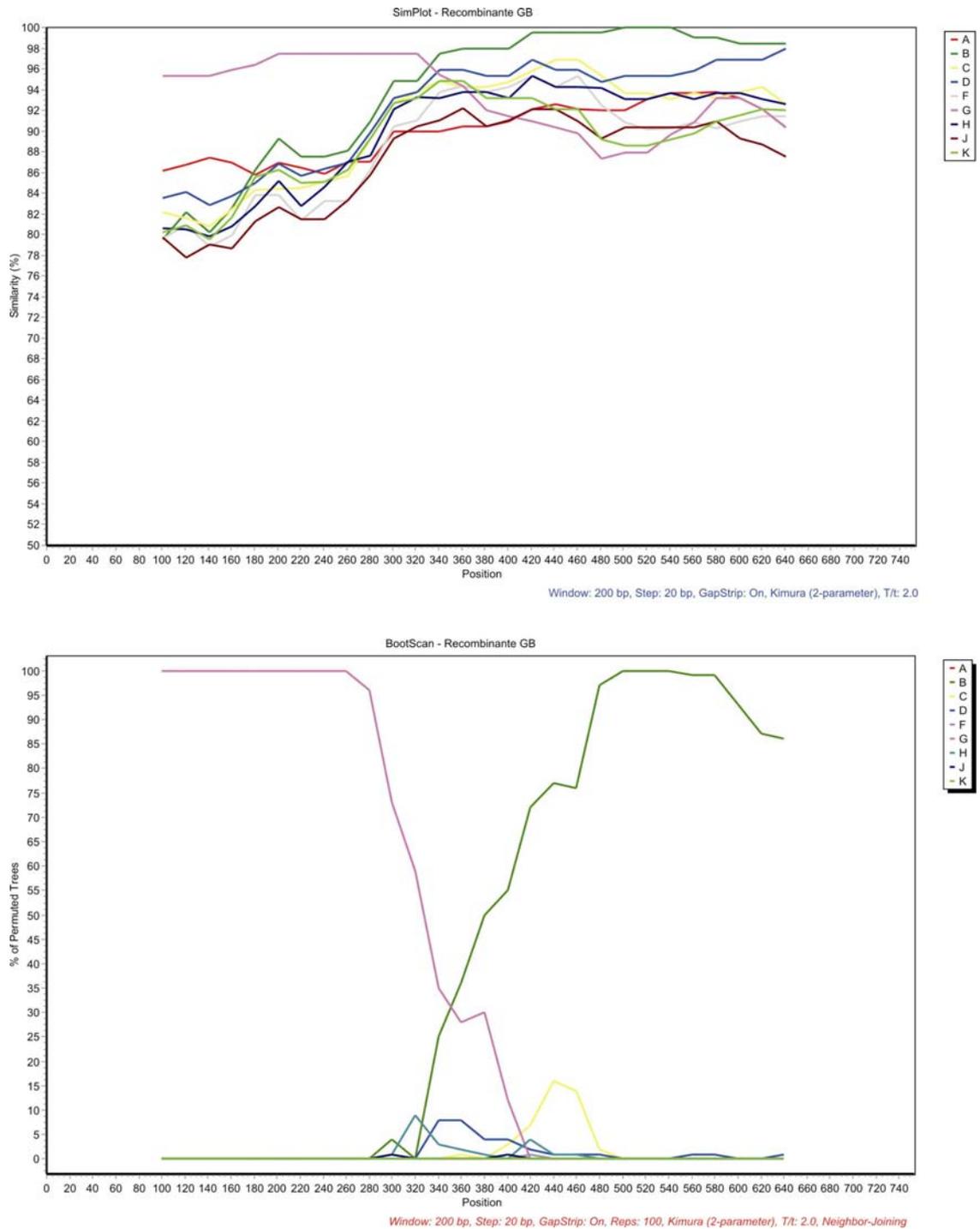


Figura 16H. Análisis mediante trazado de similitud y BootScan del recombinante GB en *gag*.

IV.4 Determinación de la influencia del tiempo que media entre la transmisión y el muestreo en análisis de la evolución del VIH-1

El uso de la epidemiología molecular para la investigación de casos de transmisión es complicado, debido a que los análisis se realizan, la mayoría de las veces, a partir de muestras biológicas obtenidas tiempo después del momento estimado de transmisión y que varía de caso a caso. Por otro lado, la evolución depende también del estado inmunológico de cada persona infectada y de la naturaleza propia del agente infeccioso (Machuca y cols., 2001).

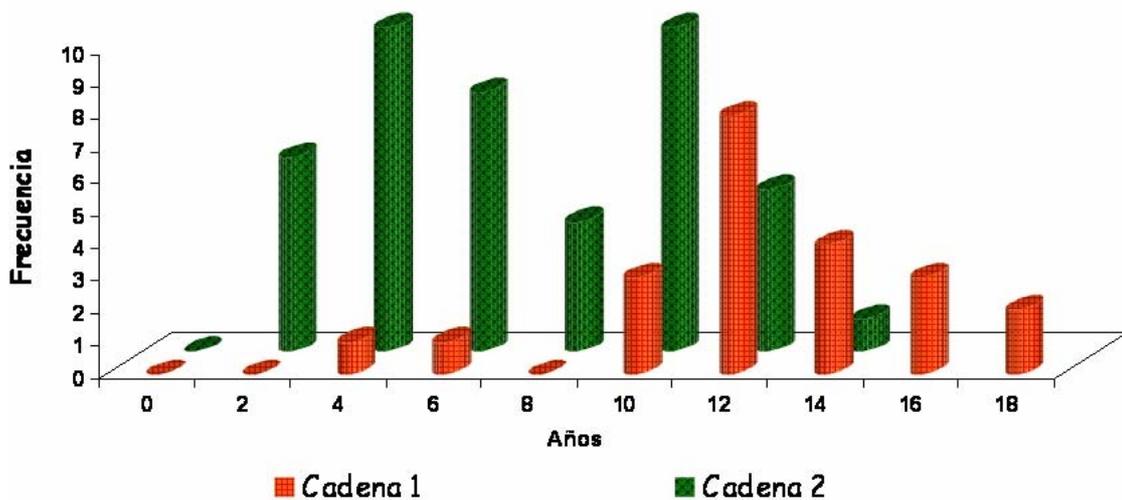


Figura 17. Histograma de la cantidad de años que median entre la fecha de infección (cuando estuvo disponible) y la fecha de colecta de la muestra.

En la Figura 17 se muestra el Histograma de tiempo entre la fecha de infección

(cuando estuvo disponible) y la fecha de toma de la muestra, utilizadas en el estudio.

Es importante tomar en consideración que, en este estudio, la búsqueda de contactos fue ejecutada inmediatamente después de realizado el diagnóstico de infección por VIH, mientras que la toma de la muestra biológica utilizada en el mismo, fue acometida mucho tiempo después del diagnóstico para la mayoría de los pacientes. Es de destacar que al momento del diagnóstico de infección por VIH de los individuos de ambas cadenas no se contaba ni con las tecnologías necesarias para la realización de este tipo de estudio, ni con la acumulación de conocimientos que sobre este virus se tiene en la actualidad a nivel mundial, por lo que se utilizaron muestras biológicas remanentes de otros estudios clínicos que estaban conservadas en la seroteca del laboratorio.

Para la Cadena 1 en particular, se debe considerar el lapso de tiempo relativamente estrecho de las transmisiones y el lapso de tiempo relativamente grande entre las transmisiones y el muestreo. Por lo tanto, es difícil dilucidar lo incierto de la información filogenética y de la búsqueda de contactos, especialmente para las transmisiones no rechazadas. Para la Cadena 2, el análisis se torna más confuso debido a la presencia de múltiples parejas sexuales durante el lapso de tiempo que medió entre el diagnóstico y el muestreo.

Al investigar la compatibilidad de datos genéticos y epidemiológicos, en cadenas de transmisión, existen dos fuentes de incertidumbre: la incertidumbre acerca de la precisión de los datos epidemiológicos y la incertidumbre de las reconstrucciones filogenéticas (Leitner y cols., 1996; 1997; Leitner y Albert, 1999; Paraskevis y cols., 2004; Mikhail y cols., 2005). En el caso de la Cadena 1, el último fenómeno es bien importante, debido a que los eventos de transmisión ocurrieron en un intervalo de tiempo relativamente estrecho. Por tanto, existió un tiempo limitado para que las mutaciones se fijaran entre las diferentes transmisiones, incluso, para un patógeno que evoluciona tan rápido como el VIH (Preston y cols., 1988).

Por otra parte, las muestras se colectaron varios años después que los pacientes adquirieron la infección (fundamentalmente para la Cadena de Transmisión 1). De este modo, aún cuando las mutaciones logran fijarse entre los diferentes eventos de transmisión, la información podría tornarse borrosa debido a los años de evolución intrapacientes, donde la selección natural es la fuerza evolutiva predominante (Rambaut y cols., 2004).

Para valorar el impacto sobre la evolución del tiempo que media entre la transmisión y el muestreo se compararon las distancias genéticas en transmisiones apoyadas y no rechazadas.

La Cadena de Transmisión 2 no es muy conveniente para este análisis, debido a que la mayoría de los eventos de transmisión son rechazados por el análisis subtipo/recombinación, por lo que se restringió el mismo, al estudio de las transmisiones apoyadas y no rechazadas de la Cadena 1.

En la Tabla 8 se muestran los resultados del análisis para la Cadena de Transmisión 1.

Tabla 8. Comparación de las distancias genéticas entre transmisiones apoyadas y no rechazadas de la Cadena 1 para los genes *gag* y *env*.

Transmisión	Años	nucl/sust/sitio	
		<i>gag</i>	<i>env</i>
20 → 29	ND	0,022238	0,045990
20 → 28	ND	0,020996	0,063111
4 → 14	16	0,035464	0,166328
34 → 38	18	0,014796	0,063349
33 → 35	24	0,062634	0,118699
33 → 36	26	0,036706	0,161229

Leyenda
 Rojo – apoyada
 Azul – no rechazada
 ND – no disponible

A pesar de que no se cuenta con el año de infección para todos los casos, puede observarse que para el gen *gag*, a más años de evolución de los pacientes, más dificultad para que el estudio filogenético apoye la transmisión, no así para el gen *env*. El gen *env* tiene un rango de sustituciones entre dos a

cuatro veces mayor que el gen *gag*. Se puede esperar que mayor tiempo desde la transmisión a la toma de muestra conlleve a la pérdida de apoyo filogenético del evento de transmisión, pero no al rechazo.

Posada y Crandall (Posada y Crandall, 2001) han planteado la necesidad de aplicar un modelo de sustitución correcto para la inferencia de relación filogenética cuando se utilizan secuencias de VIH. Casi todos los métodos de reconstrucción filogenética a partir de secuencias nucleotídicas, están basados en la hipótesis del reloj molecular (Kimura, 1983), de acuerdo a la cual, para cualquier secuencia, las mutaciones ocurren al azar e independientemente, a una frecuencia más o menos constante de divergencia de su ancestro común. Si el tiempo es largo, la relación lineal entre tiempo de divergencia y diferenciación genética se pierde, debido a la gran cantidad de diferencias reales producidas y a lo bien cercano que estemos del punto de saturación (Li, 1997).

Una característica importante del VIH-1 es su elevada frecuencia evolutiva, pero ésta es heterogénea a lo largo del genoma (Muse, 1999). En consecuencia, la determinación de la relación filogenética ha tenido que basarse en el análisis de una región con un adecuado nivel de evolución por escala de tiempo del problema. Las transmisiones recientes han de ser analizadas con regiones que

evolucionan rápidamente, porque de otra forma podría no producirse o producirse una variación tan pequeña que no permite diferenciar los eventos recientes de los eventos tardíos, en la misma población. Mientras, los eventos tardíos pueden solamente ser estudiados con regiones que evolucionan más lentamente, ya que las regiones que evolucionan rápido podrían haber alcanzado o estar cercanas al punto de saturación y no aportar suficiente poder resolutivo (González-Candelas y Moya, 2005).

La búsqueda de contactos es útil y confiable para identificar cadenas epidemiológicas de transmisión reconstruibles filogenéticamente, sólo bajo ciertas circunstancias. El muestreo y la búsqueda de contactos deben realizarse cercanas al momento del diagnóstico, lo cual reduce lo incierto, tanto en la búsqueda de contactos como en la reconstrucción filogenética. Si los datos de secuencias se obtienen a partir de muestras tomadas a los pacientes durante la evolución clínica de la enfermedad, también se impone realizar entrevistas de seguimiento para la búsqueda de contactos. El hecho de que la señal filogenética se desvanece cuando el muestreo es realizado en un tiempo considerablemente alejado de la transmisión, tiene implicaciones importantes para los estudios forenses que utilizan inferencias filogenéticas cuando evalúan hipótesis de transmisión.

V. CONCLUSIONES

1. En la Cadena de Transmisión 1 las secuencias nucleotídicas se agruparon, en su mayoría, consistentemente con la relación epidemiológica reportada, mientras que en la Cadena 2 existieron múltiples subtipos y recombinantes del VIH-1 que no permitieron encontrar esa concordancia.
2. La elevada frecuencia de detección de recombinantes intragen para *gag* e intergenes para *gag/env* fue una limitación para el apoyo filogenético de la relación epidemiológica.
3. La limitación del tamaño del gen *env* estudiado contribuyó con que no se detectaran recombinantes intragen en ninguna de las muestras secuenciadas.
4. Se demuestra evolución viral sin pérdida de relación monofilética en todas las secuencias nucleotídicas de un mismo paciente obtenidas de muestras tomadas en diferentes momentos.
5. Las secuencias del gen *env* tienden a ser menos informativas que las secuencias de *gag*, en lo que respecta a eventos de transmisión sospechados.
6. Mientras mayor es el tamaño del fragmento de gen estudiado más se incrementa el apoyo filogenético de la transmisión epidemiológica.

7. De acuerdo con los datos obtenidos del fragmento del gen *gag* para la Cadena de Transmisión 1, se observó una tendencia a que en la medida en que se incrementaron los años de evolución de los pacientes, fue menor el apoyo del estudio filogenético a la transmisión epidemiológica propuesta.

8. El muestreo y la búsqueda de contactos deben realizarse cercanas al momento del diagnóstico para reducir lo incierto, tanto en la búsqueda de contactos como en la reconstrucción filogenética.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estimaciones sistemáticas de las señales filogenéticas y su capacidad para reconstruir cadenas de transmisión conocidas, en dependencia del lapso de tiempo entre la transmisión y el muestreo.
2. Realizar investigaciones longitudinales intra e interpacientes con cohortes de seropositivos de nueva captación para valorar evolución viral e investigar prospectivamente la presencia de superinfecciones, especialmente porque en nuestro contexto circula una diversidad de subtipos y formas recombinantes.
3. Utilizar la enzima RT SensiScript para amplificar ARN de muestras de suero y plasma conservadas a temperaturas subóptimas por períodos de tiempo de al menos diez años.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akashi, H. Within- and between-species DNA sequence variation and the 'footprint' of natural selection. *Gene* 1999; 238: 39–51.
2. Albert J, Ahlberg J, Leitner T, Escanilla D, Uhlen M. Analysis of a rape case by direct sequencing of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 pol and gag Genes. *J Virol* 1994; 68: 5918-24.
3. Allen TM, Altfeld M. HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 829-35.
4. Aloia RC, Huirou T, Jensen FC. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Med Sci* 1993; 90: 5181-5.
5. Altfeld M, Allen TM, Yu XG, Johnston MN, Agrawal D, Korber BT, *et al.* HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* 2002; 420: 434-9.
6. Altschul, SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389–3402.
7. Apetrei C, Marx PA, Smith SM. The evolution of HIV and its consequences. *Infect Dis Clin North Am* 2004a; 18: 369-94.
8. Apetrei C, Robertson DL, Marx PA. The history of SIVS and AIDS: epidemiology, phylogeny and biology of isolates from naturally SIV infected non-human primates (NHP) in Africa. *Front Biosci* 2004b; 9: 225-54.

9. Bailes E, Gao F, Bibollet-Ruche F, Courgnaud V, Peeters M, Marx PA, *et al.* Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 2003; 300: 1713.
10. Baron S. Medical microbiology. 4th ed. USA: The University of Texas Medical Branch; 1996.
11. Barr-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868–71.
12. Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP. Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J* 1998; 17: 7056–65.
13. Birch CJ, McCaw RF, Bulach DM, Revill PA, Carter JT, Tomnay J, *et al.* Molecular analysis of human immunodeficiency virus strains associated with a case of criminal transmission of the virus. *J Infect Dis* 2000; 182: 941–4.
14. Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1108-14.
15. Blanchard A, Ferris S, Chamaret S, Gue´Tard D, Montagnier L. Molecular evidence for nosocomial transmission of Human Immunodeficiency Virus from a surgeon to one of his patients. *J Virol* 1998; 72: 4537–40.
16. Bodelle P, Vallari A, Coffey R, McArthur CP, Beyeme M, Devare SG, *et al.* Identification and genomic sequence of an HIV type 1 group N isolate from Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 902-8.
17. Bosch I, Melichar H, Pardee AB. Identification of differentially expressed genes from limited amounts of RNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E27.
18. Bracho MA, Gosalbes MJ, Blasco D, Moya A, Gonzalez-Candelas F. Molecular epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a hemodialysis

- unit. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2750-5.
19. Brander C, Goulder PJ, Walker BD, Kiepiela P, Korber BT, Mullins JI. Extensive intrasubtype recombination in South African human immunodeficiency virus type 1 subtype C infections. *J Virol* 2007. 81:492-500.
 20. Bredell H, Crookes RL, du P Heynes A, Schoub BD, Morris L. Molecular investigation of two possible cases of accidental HIV-1 transmission in South Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19: 613-7.
 21. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologist progression. *AIDS* 1994; 8: 1123-8.
 22. Burger H, Weiser B, Flaherty K, Gulla J, Nguyen PN, Gibbs RA. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 nucleotide sequence diversity among close contacts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11236-40.
 23. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29: 23-39.
 24. Carvajal-Rodriguez A, Crandall KA, Posada D. Recombination estimation under complex evolutionary models with the coalescent composite-likelihood method. *Mol Biol Evol* 2006; 23:817-27.
 25. Carvajal-Rodriguez A, Crandall KA, Posada D. Recombination favors the evolution of drug resistance in HIV-1 during antiretroviral therapy. *Infect Genet Evol* 2007; 7: 476-83.
 26. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morb Mortal Wkly Rep* 1992; 41: 1-19.
 27. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumocystis pneumonia -

- Los Angeles. *Morb Mortal Wkly Rep* 1981; 30: 250–2.
28. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998; 93: 681–4.
29. Chang D, Sharp P. Messenger RNA transport and HIV Rev regulation. *Science* 1990; 249: 614-5.
30. Charpentier C, Nora T, Tenaillon O, Clavel F, Hance AJ. Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasispecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients. *J Virol* 2006; 80:2472-82.
31. 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. *N Engl J Med* 1991; 324: 954-60.
32. Clavel F, Gutard D, Brun-Vzinet F. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343–6.
33. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. Retroviruses: plainview. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
34. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267: 483–9.
35. Colonna RJ, Thiry A, Limoli K, Parkin N. Activities of atazanavir (BMS-232632) against a large panel of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates resistant to one or more approved protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1324–33.
36. Corbet S, Muller-Trutwin MC, Versmisse P, Delarue S, Ayoub A, Lewis J, *et al.* *env* sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol* 2000; 74: 529-34.

37. Crandall KA, Templeton AR. En: The Evolution of HIV (ed. Crandall, K. A.) 153–176 (The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999).
38. Crandall KA. Intraspecific phylogenetics: support for dental transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1995; 69: 2351–6.
39. Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Diaz H, Delgado E, Parga EV, *et al.* High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS* 2002; 16: 1643–53.
40. Cullen B. Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell* 1993; 73: 417-20.
41. Cullen B. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 1998; 93: 685-92.
42. Cullen B. The HIV-1 tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell* 1990; 63: 655-7.
43. Damond F, Worobey M, Campa P, Farfara I, Colin G, Matheron S, *et al.* Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classifications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 666-72.
44. de Arazoza H, Lounes R, Pérez J, Thu Hoang. What percentage of the Cuban HIV-AIDS Epidemic is known? *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55: 30-7.
45. de Cock KM, Adjorlolo G, Ekpini E, Sibailly T, Kouadio J, Maran M, *et al.* Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *J Am Med Assoc* 1993; 270: 2083-6.
46. de Wolf F, Spijkerman I, Schellenkens PT. AIDS prognosis based on HIV-1 RNA, CD4+ T-cell count function: markers with reciprocal predictive value over time after seroconversion. *AIDS* 1997; 11: 1799-806.
47. DeBry RW, Abele LG, Weiss SH, Hill MD, Bouzas M, Lorenzo E, *et al.* Dental HIV transmission? *Nature* 1993; 361: 691.

48. Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, Mulins JI. Human Immunodeficiency Virus type 1 Evolution in Vivo Tracked by DNA Hetroduplex Mobility Assays. *J Virol* 1994; 68: 6672-83.
49. Dowling WE, Kim B, Mason CJ, Wasunna KM, Alam U, Elson L, *et al.* Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of subtype A and A-containing recombinants. *AIDS* 2002; 16: 1809-20.
50. Drouin G, Prat F, Ell M, Paul Clark GD. Detecting and characterizing gene conversions between multigene family members. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 1639–90.
51. Drummond, A, Forsberg R, Rodrigo AG. The inference of stepwise changes in substitution rates using serial sequence samples. *Mol Biol Evol* 2001; 18: 1365–71.
52. Ekstrand ML, Stall RD, Paul JP, Osmond DH, Coates TJ. Gay men report high rates of unprotected anal sex with partners of unknown or discordant HIV status. *AIDS* 1999; 13: 1525– 33.
53. Endo T, Ikeo K, and Gojobori T. Large-scale search for genes on which positive selection may operate. *Mol Biol Evol* 1996; 13: 685–90.
54. Essex M, McLane MF, Lee TH. Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. *Science* 1983; 220: 859–62.
55. Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, Sun Y, Manola J, Gelman R, *et al.* Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD4 +T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J Virol* 2001; 75: 5646–55.
56. Etemad-Moghadam B, Sun Y, Nicholson EK, Fernandes M, Liou K, Gomila R, *et al.* Envelope glycoprotein determinants of increased

- fusogenicity in a pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV-KB9) passaged *in vivo*. *J Virol* 2000; 74: 4433–40.
57. Fang G, Weiser B, Kuiken C, Philpott SM, Rowland-Jones S, Plummer F, *et al*. Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS* 2004; 18: 153-9.
58. Farber JM, Berger EA. HIV's response to a CCR5 inhibitor: I'd rather tighten than switch! *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1749–51.
59. Fonjungo PN, Mpoudi EN, Torimiro JN, Alemnji GA, Eno LT, Nkengasong JN, *et al*. Presence of diverse human immunodeficiency virus type 1 viral variants in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1319-24.
60. Fournier MV, Martin KJ, Pardee AB. Steroid Receptor Methods. Protocols and Assays. En: Humana Press, Scientific and Medical Publisher, Totowa, NJ, USA. Solid Tumor Cancer Markers and Applications to Steroid Hormone Research; 2001 p. 329-40.
61. Fransen K, Mortier D, Heyndrickx L, Verhofstede C, Janssens W, van der Groen G. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of seven different methods for extraction (part two). *J Virol Methods* 1998; 76: 153-7.
62. Freed EO, Martin MA. HIVs and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editores. Field's Virology, 4^{ta}. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1971-2042.
63. 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; 4: 500-3.
64. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;

220: 865-7.

65. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pantroglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397: 436–41.
66. Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, Li Y, Bailes E, Kostrikis LG, *et al.* An Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Originally Classified as Subtype I Represents a Complex Mosaic Comprising Three Different Group M Subtypes (A, G, and I). *J Virol* 1998; 72: 10234–41.
67. Gao F, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG, *et al.* Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 675-88.
68. Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, *et al.* Human infection by genetically diverse SIVsm related HIV-2 in West Africa. *Nature* 1992; 358: 495–9.
69. Ginocchio CC, Wang X-P, Kaplan MH, Mulligan G, Witt D, Romano JW, *et al.* Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2886-93.
70. Ginsberg SD. RNA amplification strategies for small sample populations. *Methods* 2005; 37: 229-37.
71. Goff SP. The Retroviruses and Their Replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editores. *Field's Virology*, 4^{ta}. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1679-728.
72. Goldman N, Anderson JP, Rodrigo AG. Likelihood-Based tests of Topologies in Phylogenetics. *Syst Biol* 2000; 49: 652-70.
73. Gómez CE, Iglesias E, Perdomo W, Rolo F, Blanco M, Lobaina L, *et al.* Isolates from four different HIV type 1 clades circulating in Cuba identified

- by DNA sequence of the C2-V3 region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 55-8.
74. Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and Visna virus, a pathogenic Lentivirus. *Science* 1985; 227: 173-7.
75. Gonzales MJ, Dugan JM, Shafer RW. Synonymous-nonsynonymous mutation rates between sequences containing ambiguous nucleotides (Syn-SCAN). *Bioinformatics* 2002; 18: 886-7.
76. Gonzales MJ, Wu TD, Taylor J, Belitskaya I, Kantor R, Israelski D, *et al.* Extended spectrum of HIV-1 reverse transcriptase mutations in patients receiving multiple nucleoside analog inhibitors. *AIDS* 2003; 17: 791-9.
77. González-Candelas F, Bracho MA, Moya A. Molecular epidemiology and forensic genetics: Application to a Hepatitis C Virus transmission event at a hemodialysis unit. *J Infect Dis* 2003; 187: 352-8.
78. González-Candelas F, Moya A. Time and rate of evolution are the key to establish transmission cases. *AIDS* 2005; 19: 1552-3.
79. Goodreau SM. Assessing the effects of human mixing patterns on human immunodeficiency virus-1 interhost phylogenetics through social network simulation. *Genetics* 2006; 172:2033-45.
80. Goujon CP, Schneider VM, Grofti J, Montigny J, Jeantils V, Astagneau P, *et al.* Phylogenetic analyses indicate an atypical nurse-to-patient transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2000; 74: 2525-32.
81. Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *New Engl J Med* 1991; 324: 308-17.
82. Guillon C, Schutten MM, Boers PH, Gruters RA, ME Osterhaus AD. Antibody-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type

- 1 infectivity is determined by the structure of gp120 and depends on modulation of the gp120-CCR5 interaction. *J Virol* 2002; 76: 2827–34.
83. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52: 696-704.
84. Hahn BH, Shaw GM, de Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000; 287: 607–14.
85. Hallet T, Garnett G. Has global HIV incidence peaked? *The Lancet* 2006. 368:116-7.
86. Harris ME, Serwadda D, Sewankambo N, Kim B, Kigozi G, Kiwanuka N, *et al.* Among 46 near full length HIV type 1 genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 1281-90.
87. Harrison SC, Skehel JJ and Wiley DC. Virus Structure. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM editores. *Field's Virology*. 3^{ra} ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 1996. p. 93-5.
88. Hayman A, Moss T, Simmons G, Arnold C, Holmes EC, Naylor-Adamson L, *et al.* Phylogenetic analysis of multiple heterosexual transmission events involving subtype b of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 689-95.
89. Heeney JL, Dalgleish AG, Weiss RA. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 2006. 313:462-6.
90. Herbinger KH, Gerhardt M, Piyasirilp S, Mloka D, Arroyo MA, Hoffmann O, *et al.* Frequency of HIV Type 1 Dual Infection and HIV Diversity: Analysis of Low- and High-Risk Population in Mbeya Tegion, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 599-606.
91. Herring BL, Ge YC, Wang B, Ratnamohan M, Zheng F, Cunningham AL, *et al.* Segregation of human immunodeficiency virus type 1 subtype by

- risk factor in Australia. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4600-4.
92. Ho DD. Viral counts count in HIV infection. *Science* 1996; 1: 167-70.
93. Hoelscher M, Dowling WE, Sanders-Buell E, Carr JK, Harris ME, Thomschke A, *et al.* Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay. *AIDS* 2002; 16: 2055-64.
94. Holmes EC, Brown AJ, Simmonds P. Sequence data as evidence. *Nature* 1993; 364: 766.
95. Holmes EC, Zhang LQ, Robertson P, Cleland A, Harvey E, Simmonds P, *et al.* The molecular epidemiology of HIV-1 in Edinburgh, Scotland. *J Infect Dis* 1995; 171: 45-53.
96. Holmes EC, Zhang LQ, Simmonds P, Ludlam CA, Leigh Brown AJ. Convergent and divergent sequence evolution in the surface envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 within a single infected patient. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4835-9.
97. Holmes EC, Zhang LQ, Simmonds P, Rogers AS, Leigh Brown AJ. Molecular investigation of human immunodeficiency virus (HIV) infection in a patient of an HIV-infected surgeon. *J Infect Dis* 1993; 167:1411-4.
98. Holmes KV. HIV and AIDS. En: Nathanson N, Ahmed R, Murphy FA, editores. *Viral pathogenesis and Immunity*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2002 .p. 170-85.
99. Holodniy M, Mole L, Yen-Lieberman B, Margolis D, Starkey C, Carroll R, *et al.* Comparative stabilities of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma samples collected in VACUTAINER CPT, VACUTAINER PPT, and standard VACUTAINER tubes. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1562-6.
100. Hue S, Pillay D, Clewley JP, Pybus OG. Genetic analysis reveals the

- complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 4425-9.
101. Jafee HW, McCurdy JM, Kalish ML, Liberti T, Metellus G, Bowman BH, *et al.* Lack of HIV transmission in the practice of a dentist with AIDS. *Ann Intern Med* 1994; 121: 855-9.
102. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology: The immune system in health & disease. 5th ed. New York: Garland Publishing; 2001.
103. Javaherian K, Langlois AJ, LaRosa GJ, Profy AT, Bolognesi DP, Herlihy WC, *et al.* Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* 1990; 250: 1590-3.
104. Jensen MA, van't Wout AB. Predicting HIV-1 Coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev* 2003; 5: 104-12.
105. Jenwitheesuk E, Liu T. Single phylogenetic reconstruction method is insufficient to clarify relationships between patient isolates in HIV-1 transmission case. *AIDS* 2005; 19: 743-4.
106. Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston DB, Dougher JP. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 2000; 74: 1234-40.
107. Johnston MI, Fauci AS. An HIV vaccine-evolving concepts. *N Engl J Med* 2007. 356:2073-81.
108. Joncas JH, Delage G, Chad I, Lapointe N. Acquired (or congenital) immunodeficiency syndrome in infants born of Haitian mothers. *N Engl J Med* 1983; 308: 842.
109. Jost S, Bernard MC, Kaiser L, Yerly S, Hirschel B, Samri A, *et al.* A patient with HIV-1 superinfection. *N. Engl. J Med* 2002; 347: 731-6.
110. Jung A, Maier R, Vartanian JP, Bocharov G, Jung V, Fischer U, *et al.*

- Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 2002; 418: 144.
111. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998; 339: 33-9.
112. Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S, Sridharan G. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res* 2005; 121: 333-44.
113. Kang SM, Morrow CD. Genetic analysis of a unique human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) with a primer binding site complementary to tRNA Met supports a role for-PBS stem-loop RNA structures in initiation of HIV-1 reverse transcription. *J Virol* 1999; 73: 1818-27.
114. Kanki PJ, Peeters M, Gueye-Ndiaye A. Virology of HIV-1 and HIV-2: implications for Africa. *AIDS* 1997; 11: S33-S42.
115. Katzenstein TL, Jorgensen LB, Permin H, Hansen J, Nielsen C, Machuca R, *et al.* Nosocomial HIV-transmission in an outpatient clinic detected by epidemiological and phylogenetic analyses. *AIDS* 1999; 13:1737-44.
116. Kellam P, Larder BA. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J Virol* 1995; 69: 669-74.
117. Kelly JA, Hoffman RG, Rompa D, Gray M. Protease inhibitor combination therapies and perceptions of gay men regarding AIDS severity and the need to maintain safer sex. *AIDS* 1998; 12: F91-5.
118. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge University Press; 1983.
119. Kishino H, Hasegawa M. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J Mol Evol* 1989; 29: 170-9.
120. Koelsch KK, Smith DM, Little SJ, Ignacio CC, Macaranas TR, Brown AJ,

- Petropoulos CJ, Richman DD, Wong JK. Clade B HIV-1 superinfection with wildtype virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *AIDS* 2003; 17: F11–6.
121. Konings FA, Haman GR, Xue Y, Urbanski MM, Hertzmark K, Nanfack A, *et al.* Genetic analysis of HIV-1 strains in rural eastern Cameroon indicates the evolution of second-generation recombinants to circulating recombinant forms. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42: 331-41.
122. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, *et al.* Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288: 1789–96.
123. Kosiol C, Bofkin L, Whelan S. Phylogenetics by likelihood: evolutionary modeling as a tool for understanding the genome. *J Biomed Inform* 2006; 39:51-61.
124. Koup RA, Saag MS, Yang LC. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994; 68: 4650-5.
125. Kravcik S, Victor G, Houston S, Sutherland D, Garber GE, Hawley-Foss N, *et al.* Effect of antiretroviral therapy and viral load on the perceived risk of HIV transmission and the need for safer sexual practices. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 19: 124–9.
126. Kusagawa S, Sato H, Watanabe S, Nohtomi K, Kato K, Shino T, *et al.* Genetic and serologic characterization of HIV type 1 prevailing in Myanmar (Burma). *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14: 1379–85.
127. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; 393: 648–59.
128. Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, Sodroski J, Hendrickson WA.

- Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* 2000; 74: 1961-72.
129. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res* 2005; 121: 287-314.
130. Lee B, Leslie G, Soilleux E, O'Doherty U, Baik S, Levroney E, *et al.* Cis expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol* 2001; 75: 12028-38.
131. Leitner T, Albert J. Reconstruction of HIV-1 transmission chains for forensic purposes. *AIDS Reviews* 2000; 2: 241-51.
132. Leitner T, Albert J. The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10752-7.
133. Leitner T, Escanilla D, Franzen C, Uhlen M, Albert J. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10864-9.
134. Leitner T, Fitch W. The phylogenetics of known transmission histories. En: *The Evolution of HIV*. Crandall KA editor. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press; 1999. pp. 315-45.
135. Leitner T, Kumar S, Albert J. Tempo and mode of nucleotide substitutions in gag and env gene fragments in Human Immunodeficiency Virus type 1 populations with a known transmission history. *J Virol* 1997; 71: 4761-70.
136. Lemey P, Derdelinckx I, Rambaut A, Van Laethem K, Dumont S, Vermeulen S, *et al.* Molecular footprint of drug-selective pressure in a Human Immunodeficiency Virus Transmission chain. *J Virol* 2005a; 79: 11981-9.

137. Lemey P, Pybus OG, Rambaut A, Drummond AJ, Robertson DL, Roques P, *et al.* The molecular population genetics of HIV-1 group O. *Genetics* 2004; 167: 1059-68.
138. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandame AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6588-92.
139. Lemey P, Rambaut A, Pybus OG. HIV evolutionary dynamics within and among hosts. 2006. *AIDS Rev* 8:125-40.
140. Lemey P, Van Dooren S, Van Laethem K, Schrooten Y, Derdelinckx I, Goubau P, *et al.* Molecular testing of multiple HIV-1 transmissions in a criminal case. *AIDS* 2005b; 19: 1649-58.
141. Lemey P, Van Dooren S, Vandamme AM. Evolutionary dynamics of human retroviruses investigated through full-genome scanning. *Mol Biol Evol* 2005c; 22: 942-51.
142. Lemey P, Vandamme AM. Exploring full-genome sequences for phylogenetic support of HIV-1 transmission events. *AIDS* 2005d; 19: 1551-2.
143. Li WH. Molecular evolution. Sunderland, MA: Sinauer; 1997.
144. Liang C, Li X, Rong LI. The importances of the A-rich loop in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription and infectivity. *J Virol* 1997; 71: 5750-7.
145. Lifson AR, Hesson NA, Rutherford GW. Progression and clinical outcome of infection due to human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 966-72.
146. Lim WL, Xing H, Wong KH, Wong MC, Shao YM, Ng MH, *et al.* The lack of epidemiological link between the HIV type 1 infections in Hong Kong and Mainland China. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 259-62.

147. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, *et al.* Full-length Human Immunodeficiency Virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999; 73: 152-60.
148. Lueders KK, Kuff EL. Sequences associated with intracisternal A particles are repeated in the mouse genome. *Cell* 1977; 12: 963-72.
149. Lyles RH, Muñoz A, Yamashita TE, Bazmi H, Detels R, Rinaldo CR. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. *J Infect Dis* 2000; 181: 872-80.
150. Machuca R, Jorgensen LB, Theilade P, Nielsen C. Molecular investigation of transmission of Human Immunodeficiency Virus type 1 in a criminal case. *Clinic Diagnostic Labor Immunol* 2001; 8: 884-90.
151. Mamadou S, Vidal N, Montavon C, Ben A, Djibo A, Rabiou S, *et al.* Emergence of complex and diverse CRF02-AG/CRF06-cpx recombinant HIV type 1 strains in Niger, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19: 77-82.
152. Masur H, Ognibene F, Yarchoan R. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1989; 111: 223-31.
153. McCutchan FE, Carr JK, Bajani M, Sanders-Buell E, Harry TO, Stoeckli TC, *et al.* Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* 1999; 254: 226-34.
154. McCutchan FE. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* 2000; 14: S31-S44.
155. McVean G, Awadalla P, Fearnhead P. A coalescentbased method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics*

- 2002; 160: 1231–41.
156. Mellors J, Rinaldo C, Gupta P. Prognosis in HIV infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-70.
157. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997; 126: 946–54.
158. Mikhail M, Wang B, Lemey P, Beckthold B, Vandamme AM, Gill MJ, *et al.* Role of viral evolutionary rate in HIV-1 disease progression in a linked cohort. *Retrovirology* 2005; 2: 41.
159. Montagnier L, Chermann JC, Barr-Sinoussi F. A new human T-lymphotropic retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes. En: Gallo RC, Essex ME, Gross L, editores. Human T-cell leukemia/lymphoma virus: the family of human T-lymphotropic retroviruses: their role in malignancies and association with AIDS. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1984. p. 363–79.
160. Morris A, Marsden M, Halcrow K, Hughes ES, Brettle RP, Bell JE, *et al.* Mosaic structure of the human immunodeficiency virus type 1 genome infecting lymphoid cells and the brain: evidence for frequent in vivo recombination events in the evolution of regional populations. *J Virol* 1999; 73: 8720–31.
161. Motomura K, Kusagawa S, Kato K, Nohtomi K, Lwin HH, Tun KM, *et al.* Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1831–43.
162. Motomura K, Kusagawa S, Lwin HH, Thwe M, Kato K, Oishi K, *et al.* Different subtype distributions in two cities in Myanmar: evidence for independent clusters of HIV-1 transmission. *AIDS* 2003; 17: 633–6.

163. Moudgil T, Daar ES. Infectious decay of human immunodeficiency virus type 1 in plasma. *J Infect Dis* 1993; 167: 210–2.
164. Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X, Binley JM, *et al.* Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120–CD4–CCR5 complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6913–8.
165. Moya A, Holmes EC, Gonzalez-Candelas F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 279-88.
166. Muse SV. Modeling the molecular evolution of HIV sequences. En: The evolution of HIV. Crandall KA editor. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 1999. pp. 122–52.
167. Nájera R, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS* 2002; 16: S3–S16.
168. Natarajan V, Bosche M, Metcalf JA, Ward DJ, Lane HC, Kovacs JA. HIV-1 replication in patients with undetectable plasma virus receiving HAART. *Lancet* 1998; 353: 119-20.
169. Nelson JA, Baribaud F, Edwards T, Swanstrom R. Patterns of changes in human immunodeficiency virus type 1 V3 sequence populations late in infection. *J Virol* 2000; 74: 8494–501.
170. Nelson JAE, Fiscus SA, Swanstrom R. Evolutionary variants of the human immunodeficiency virus type 1 V3 regions characterized by using heteroduplex tracking assay. *J Virol* 1997; 71: 8750-8.
171. Nguyen L, Hu DJ, Choopanya K, Vanichseni S, Kitayaporn D, van Griensven F, *et al.* Genetic analysis of incident HIV-1 strains among injection drug users in Bangkok: evidence for multiple transmission clusters during a period of high incidence. *J Acquir Immune Defic Syndr*

- 2002; 30: 248-56.
172. Niubo J, Li W, Henry K, Erice A. Recovery and analysis of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV) RNA sequences from plasma samples with low HIV RNA levels. *J Clin Microb* 2000; 38: 309-12.
173. Nora T, Charpentier C, Tenailon O, Hoede C, Clavel F, Hance AJ. Contribution of recombination to the evolution of Human Immunodeficiency Viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J Virol* 2007; 81: 7620-8.
174. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29: 184–90.
175. Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, Bandea CI, Luo CC, Korber BT, *et al.* Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science* 1992; 256: 1165-71.
176. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362: 355-8.
177. Paraskevis D, Magiorkinis E, Magiorkinis G, Kiosses VG, Lemey P, Vandamme AM, *et al.* Phylogenetic reconstruction of a known HIV-1 CRF04_cpx transmission network using maximum likelihood and Bayesian methods. *J Mol Evol* 2004; 59: 709-17.
178. Peeters M, Cournaud V, Abela B, Auzel P, Pourrut X, Bibollet-Ruche F, *et al.* Risk to human health from a plethora of Simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 451–7.
179. Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, *et al.* Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* 1997; 11: 493-8.

180. Peeters M, Liegeois F, Torimiro N, Bourgeois A, Mpoudi E, Vergne L, *et al.* Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol* 1999; 73: 7368-75.
181. Peeters M, Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 2000; 14: S129-40.
182. Peeters, M. Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic. En: Kuiken C, Foley B, Hahn B, y cols., editores. The HIV sequence compendium 2000. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico; 2000 p. 139-54.
183. Pelerson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-6.
184. Pérez J, Pérez D, González I, Jidy MD, Orta M, Aragonés C, *et al.* Approaches to the management of HIV/AIDS in Cuba. Perspectives and practice in antiretroviral treatment (Case Study). Geneva: World Health Organization. 2004 Available: http://www.who.int/hiv/pub/prev_care/en/cuba.pdf. Accessed 25 August 2005.
185. Pérez J, Torres R, Terry H. HIV infection in Cuba. *AIDS und HIV Infektionen* 1993; 8: 1-9.
186. Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, *et al.* High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993; 259: 1749-54.
187. Pieniazek D, Ellenberger D, Janini LM, Ramos AC, Nkengasong J, Sassan-Morokro M, *et al.* Predominance of human immunodeficiency virus type 2 subtype B in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS Res Hum*

Retroviruses 1999; 15: 603-8.

188. Ping LH, Nelson JA, Hoffman IF, Schock J, Lamers SL, Goodman M, *et al.* Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C Human Immunodeficiency Virus type 1 isolates from Malawi: Underrepresentation of X4 variants. *J Virol* 1999; 73: 6271-81.
189. Pistello M, Del Santo B, Buttò S, Bargagna M, Domenici R, Bendinelli M. Genetic and phylogenetic analyses of HIV-1 corroborate the transmission link hypothesis. *J Clin Virol* 2004; 30: 11-8.
190. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; 224: 497-500.
191. Posada D, Crandall KA. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002a; 98: 13757-62.
192. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998; 14: 817-8.
193. Posada D, Crandall KA. Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol Biol Evol* 2001; 18: 897-906.
194. Posada D, Crandall KA. The Effect of Recombination on the Accuracy of Phylogeny Estimation. *J Mol Evol* 2002b; 54: 396-402.
195. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988; 242: 1169-71.
196. Quinnan GV Jr, Masur H, Rook AH. Herpesvirus infections in the acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 1984; 252: 72-7.
197. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The cause and consequences of HIV-1 evolution. *Nature Rev* 2004; 5: 52-61.

198. Rambaut A, Robertson DL, Pybus OG, Peeters M, Holmes EC. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature* 2001; 410: 1047–8.
199. Ramos A, Hu DJ, Nguyen L, Phan KO, Vanichseni S, Promadej N, *et al.* Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users. *J Virol* 2002; 76: 7444-52.
200. Rayfield MA, Sullivan P, Bandea CI, Britvan L, Otten RA, Pau CP, *et al.* HIV-1 group O virus identified for the first time in the United States. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 209-12.
201. Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 2002; 83: 1253-65.
202. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, *et al.* A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 1998; 280: 1949–53.
203. Robbins KE, Lemey P, Pybus OG, Jaffe HW, Youngpairoj AS, Brown TM, *et al.* US human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *J Virol* 2003; 77: 6359–66.
204. Robbins KE, Weidle PJ, Brown TM, Saekhou AM, Coles B, Holmberg SD, *et al.* Molecular analysis in support of an investigation of a cluster of HIV-1-infected women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:1157-61.
205. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000; 288: 55-6.
206. Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH. Recombination in HIV-1. *Nature* 1995; 374: 124–6.
207. Rodrigo AG. HIV evolutionary genetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10559–61.

208. Rolo FM, Miranda L, Wainberg MA, Gu Z, Lobaina L, Noa E, *et al.* Envelope V3 region sequences of Cuban HIV-1 isolates. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 9: 123-5.
209. Roos MT, Lange JM, de Goede RE, Coutinho RA, Schellekens PT, Miedema F, *et al.* Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1992; 165: 427-32.
210. Roques P, Robertson DL, Souquiere S, Apetrei C, Nerrienet E, Barre-Sinoussi F, *et al.* Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS* 2004; 18: 1371-81.
211. Rousseau CM, Learn GH, Bhattacharya T, Nickle DC, Heckerman D, Chetty S, Scheffler K, Martin DP, Seoighe C. Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. *Bioinformatics* 2006. 22:2493-9.
212. Salemi M, De Oliveira T, Courgnaud V, Moulton V, Holland B, Cassol S, *et al.* Mosaic genomes of the six major primate lentiviruses lineages revealed by phylogenetic analysis. *J Virol* 2003; 77: 7202–13.
213. Salemi M, Desmyter J, Vandamme AM. Tempo and mode of human and simian T-lymphotropic virus (HTLV/STLV) evolution revealed by analyses of full-genome sequences. *Mol Biol Evol* 2000; 17: 374-86.
214. Salemi M, Strimmer K, Hall WW, Duffy M, Delaporte E, Mboup S, *et al.* Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J* 2001; 15: 276-8.
215. Sanderson MJ, Doyle JJ. Reconstruction of organismal and gene phylogenies from data on multigene families: Concerted evolution, homoplasy, and confidence. *Syst Biol* 1992; 41: 4–17.

216. Santiago ML, Rodenburg CM, Kamenya S, Bibollet-Ruche F, Gao F, Bailes E, *et al.* SIVcpz in wild chimpanzees. *Science* 2002; 295: 465.
217. Sarngadharan MG, Popovic M, Bruch L. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 1984; 224: 506–8.
218. Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1998; 128: 613-20.
219. Schierup ME, Hein J. Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics* 2000a; 156: 879–91.
220. Schierup MH, Hein J. Recombination and the molecular clock. *Mol Biol Evol.* 2000b; 17: 1578–9.
221. Schim van der Loeff MF, Aaby P. Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *AIDS* 1999; 13: S69-84.
222. Schwartzberg P, Colicelli J, Goff SP. Construction and analysis of deletion mutations in the pol gene of Moloney murine leukemia virus: a new viral function required for productive infection. *Cell* 1984; 37: 1043–52.
223. Sharp PM, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hahn BH. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when. *Phil Trans Roy Lond B* 2001; 356: 867–76.
224. Shimodaira H, Hasegawa M. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol Biol Evol* 1989; 16: 1114-6.
225. Shriner D, Liu Y, Nickle DC, Mullins JI. Evolution of intrahost HIV-1 genetic diversity during chronic infection. *Int J Org Evol* 2006; 60:1165-76.
226. Sierra M, Thomson MM, Rios M, Casado G, Castro RO, Delgado E, *et*

- al.* The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF12_BF. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 209-17.
227. Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998; 4: 1032-7.
228. Smith UR, Kuiken C, Korber BT. Recent evolutionary history of human immunodeficiency type 1 subtype B–response. *J Mol Evol* 2003; 56, 643–4.
229. Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, *et al.* Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J Virol* 1997; 71: 7136–9.
230. Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D, Brenner BG. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 29-40.
231. Stebbing J, Moyle G. The clades of HIV: their origins and clinical significance. *AIDS Rev* 2003; 5: 205-13.
232. Stümer M, Preiser W, Gute P, Nisius G, Doerr HW. Response to ‘Single phylogenetic reconstruction method is insufficient to clarify relationships between patient isolates in HIV-1 transmission case’ by Jenwitheesuk and Liu. *AIDS* 2005; 19: 741–3.
233. Subbarao S, Limpakarnjanarat K, Mastro TD, Bhumisawasdi J, Warachit P, Jayavasu C, *et al.* HIV type 1 in Thailand, 1994-1995: persistence of two subtypes with low genetic diversity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14: 319-27.

234. Subbarao S, Vanichseni S, Hu DJ, Kitayaporn D, Choopanya K, Raktham S, *et al.* Genetic characterization of incident HIV type 1 subtype E and B strains from a prospective cohort of injecting drug users in Bangkok, Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 699-707.
235. Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic inference using parsimony (* and other methods). Version 4.0bY. Sunderland, MA: Sinauer, 1998.
236. Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K. Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. *Pediatrics Int* 2004; 46: 236-44.
237. Takebe Y, Motomura K, Tatsumi M, Lwin HH, Zaw M, Kusagawa S. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. *AIDS* 2003; 17: 2077-87.
238. Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, Harada Y, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in Cameroon. *J Virol* 1999; 73: 6810-20.
239. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-80.
240. Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Nájera R: Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. *AIDS* 2005, 19: 1155-63.
241. Thomson MM, Delgado E, Herrero I, Villahermosa ML, Vazquez-de Parga E, Cuevas MT, *et al.* Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 2002a; 83: 107-19.
242. Thomson MM, Perez-Alvarez L, Nájera R. Molecular epidemiology of

- HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2002b; 2: 461-71.
243. Thomson MM, Sierra, M, Tanuri A., May S, Casado G, Manjón N, *et al.* The analysis of near full-length genome sequences of HIV type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Brazil reveals their independent origins and their lack of relationship to CRF12_BF. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 1126-33.
244. Tian H, Lan C, Chen YH. Sequence variation and consensus sequence of V3 loop on HIV-1 gp120. *Immunol Lett* 2002; 83: 231-3.
245. Torres Peña R, L. Abreu M I. Acerca del programa de prevención y control de la infección por el VIH/SIDA en Cuba. *RESUMED* 2000; 13: 76-9.
246. Trask SA, Derdeyn CA, Fideli U, Chen Y, Meleth S, Kasolo F, *et al.* Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 transmission in a heterosexual cohort of discordant couples in Zambia. *J Virol* 2002; 76: 397-405.
247. Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N, *et al.* High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology* 1999; 259: 99-109.
248. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 1999; 285: 1-32.
249. Ullmann S, Schröder-Stumberger I, Fisch E, Martin S, Paul C, Korfhage C. Improvements in quantitative real-time RT-PCR with QIAGEN® Omniscript™ and Sensiscript™ RTs. *QIAGEN News* 2001; 2: 13-6.
250. Verhofstede C, Fransen K, Marissen D, Verhelst R, van der Groen G, Lauwers S, *et al.* Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *J Virol Metho* 1996; 60: 155-9.

251. Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, *et al.* Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* 2000; 74: 10498–507.
252. Vila-Coro AJ, Mellado M, Martin de Ana A, Lucas P, del Real G, Martinez-A C, *et al.* HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3388-93.
253. Villahermosa ML, Thomson M, Vazquez de Parga E, Cuevas MT, Contreras G, Perez-Alvarez L, *et al.* Improved conditions for extraction and amplification of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA from plasma samples with low viral load. *J Hum Virol* 2000; 3: 27-34.
254. Waldo CR, McFarland W, Katz MH, MacKellar D, Valleroy LA. Very young gay and bisexual men are at risk for HIV infection: the San Francisco Bay Area Young Men's Study II. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 24: 168–74.
255. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373: 117-22.
256. Weins JJ .Combining data sets with different phylogenetic histories. *Syst Biol* 1998; 47: 568–81.
257. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 1997; 387: 426–30.
258. Wilbe K, Casper C, Albert J, Leitner T. Identification of two CRF11-cpx genomes and two preliminary representatives of a new circulating recombinant form (CRF13-cpx) of HIV type 1 in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 849-56.
259. Worobey, M. A novel approach to detecting and measuring

- recombination: new insights into evolution in viruses, bacteria, and mitochondria. *Mol Biol Evol* 2001; 18: 1425–34.
260. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, *et al.* CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996; 384: 179–83.
261. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, *et al.* The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998; 393: 705–11.
262. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998; 280: 1884–8.
263. Yang C, Li M, Mokili JLK, Winter J, Lubaki NM, Mwandagilirwa KM, *et al.* Genetic diversification and recombination of HIV type 1 group M in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21: 661-6.
264. Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K, Takebe Y. Identification and characterization of a new class of human immunodeficiency virus type 1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. *J Virol* 2003; 77: 685–95.
265. Yang R, Xia X, Kusagawa S, Zhang C, Ben K, Takebe Y. On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan Province of China. *AIDS* 2002; 16: 1401-7.
266. Yirrell DL, Pickering H, Palmarini G, Hamilton L, Rutemberwa A, Biryahwaho B, *et al.* Molecular epidemiological analysis of HIV in sexual networks in Uganda. *AIDS* 1998; 12: 285-90.
267. Yirrell DL, Robertson P, Goldberg DJ, McMenamin J, Cameron S, Leigh Brown AJ. Molecular investigation into outbreak of HIV in a Scottish prison. *BMJ* 1997; 314: 1446.

268. Yu XF, Chen J, Shao Y, Beyrer C, Liu B, Wang Z, *et al.* Emerging HIV infections with distinct subtypes of HIV-1 infection among injection drug users from geographically separate locations in Guangxi Province, China. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 22: 180-8.
269. Yusim K, Peeters M, Pybus OG, Bhattacharya T, Delaporte E, Mulanga C, *et al.* Using human immunodeficiency virus type 1 sequences to infer historical features of the acquired immune deficiency syndrome epidemic and human immunodeficiency virus evolution. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356: 855–66.
270. Zhang YJ, Moore JP. Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry? *J Virol* 1999; 73: 3443–8.
271. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, *et al.* Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD41 T cells. *Science* 1999; 286: 1353-7.
272. Zhou J, Bowler LD, Spratt BG. Interspecies recombination, and phylogenetic distortions, within the glutamine synthetase and shikimate dehydrogenase genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria species*. *Mol Microbiol* 1997; 23: 799–812.
273. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998; 391: 594-7.
274. Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, Yu H, Klarmann G, Ron Y, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol* 2002; 76: 11273–82.

Anexo 1. Número de acceso al GenBank de las secuencias nucleotídicas de los genes *gag* y *env* de VIH-1 de los casos de las Cadenas 1 y 2 estudiados.

Cepa	Número de Acceso al <i>GenBank</i>	Cepa	Número de Acceso al <i>GenBank</i>	Cepa	Número de Acceso al <i>GenBank</i>
1-99 env	DQ320322	36-00 gag	DQ320376	75-93 env	DQ320430
2-99 env	DQ320323	38-00 gag	DQ320377	77-96 env	DQ320431
4-95 env	DQ320324	38-99 gag	DQ320378	93-94 env	DQ320432
6-96 env	DQ320325	3-97 gag	DQ320379	99-92 env	DQ320433
10-00 env	DQ320326	5-95 gag	DQ320380	116-92 env	DQ320434
10-99 env	DQ320327	8-99 gag	DQ320381	117-94 env	DQ320435
11-00 env	DQ320328	40-96 env	DQ320382	40-00 gag	DQ320436
11-99 env	DQ320329	40-00 env	DQ320383	40-96 gag	DQ320437
13-00 env	DQ320330	42-97 env	DQ320384	42-97 gag	DQ320438
14-91 env	DQ320331	43-00 env	DQ320385	43-00 gag	DQ320439
15-01 env	DQ320332	44-00 env	DQ320386	44-00 gag	DQ320440
16-95 env	DQ320333	44-99 env	DQ320387	44-99 gag	DQ320441
16-97 env	DQ320334	45-00 env	DQ320388	45-00 gag	DQ320442
20-99 env	DQ320335	47-90 env	DQ320389	47-90 gag	DQ320443
24-00 env	DQ320336	51-96 env	DQ320390	51-96 gag	DQ320444
24-99 env	DQ320337	52-00 env	DQ320391	52-00 gag	DQ320445
27-99 env	DQ320338	53-98 env	DQ320392	53-98 gag	DQ320446
28-00 env	DQ320339	54-00 env	DQ320393	54-00 gag	DQ320447
28-99 env	DQ320340	55-00 env	DQ320394	55-00 gag	DQ320448
29-02 env	DQ320341	58-00 env	DQ320395	58-00 gag	DQ320449
33-00 env	DQ320342	59-98 env	DQ320396	59-98 gag	DQ320450
34-00 env	DQ320343	60-00 env	DQ320397	60-00 gag	DQ320451
34-99 env	DQ320344	60-97 env	DQ320398	60-97 gag	DQ320452
35-00 env	DQ320345	63-94 env	DQ320399	63-94 gag	DQ320453
36-00 env	DQ320346	64-00 env	DQ320400	64-00 gag	DQ320454
38-00 env	DQ320347	64-98 env	DQ320401	64-98 gag	DQ320455
38-99 env	DQ320348	65-96 env	DQ320402	65-96 gag	DQ320456
9-94 env	DQ320349	69-97 env	DQ320403	69-97 gag	DQ320457
17-90 env	DQ320350	72-00 env	DQ320404	72-00 gag	DQ320458
1-00 gag	DQ320351	74-92 env	DQ320405	74-92 gag	DQ320459
1-99 gag	DQ320352	76-00 env	DQ320406	76-00 gag	DQ320460
2-99 gag	DQ320353	78-00 env	DQ320407	78-00 gag	DQ320461
4-95 gag	DQ320354	78-99 env	DQ320408	78-99 gag	DQ320462

6-96 gag	DQ320355	80-00 env	DQ320409	80-00 gag	DQ320463
10-00 gag	DQ320356	82-00 env	DQ320410	82-00 gag	DQ320464
10-99 gag	DQ320357	84-92 env	DQ320411	84-92 gag	DQ320465
11-00 gag	DQ320358	88-00 env	DQ320412	88-00 gag	DQ320466
11-99 gag	DQ320359	89-00 env	DQ320413	89-00 gag	DQ320467
13-00 gag	DQ320360	89-99 env	DQ320414	89-99 gag	DQ320468
14-91 gag	DQ320361	94-99 env	DQ320415	94-99 gag	DQ320469
15-01 gag	DQ320362	95-96 env	DQ320416	95-96 gag	DQ320470
16-95 gag	DQ320363	98-00 env	DQ320417	98-00 gag	DQ320471
16-97 gag	DQ320364	101-00 env	DQ320418	101-00 gag	DQ320472
20-99 gag	DQ320365	103-00 env	DQ320419	103-00 gag	DQ320473
24-00 gag	DQ320366	104-00 env	DQ320420	104-00 gag	DQ320474
24-99 gag	DQ320367	110-00 env	DQ320421	110-00 gag	DQ320475
27-99 gag	DQ320368	111-00 env	DQ320422	111-00 gag	DQ320476
28-00 gag	DQ320369	127-00 env	DQ320423	127-00 gag	DQ320477
28-99 gag	DQ320370	128-00 env	DQ320424	128-00 gag	DQ320478
29-02 gag	DQ320371	129-00 env	DQ320425	129-00 gag	DQ320479
33-00 gag	DQ320372	46-90 env	DQ320426	71-93 gag	DQ320480
34-00 gag	DQ320373	49-91 env	DQ320427	90-00 gag	DQ320481
34-99 gag	DQ320374	50-94 env	DQ320428	96-93 gag	DQ320482
53-00 gag	DQ320375	61-94 env	DQ320429	109-00 gag	DQ320483

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

Anexo 2. Secuencias de VIH-1 (gen *gag*) utilizadas en el análisis filogenético de las secuencias clasificadas como subtipo G en la Cadena 1.

Cepa (País)	Número de Acceso al <i>GenBank</i>	Cepa (País)	Número de Acceso al <i>GenBank</i>
97DC.KTB49 (Congo)	AJ404325	92NG083 (Nigeria)	U88826
X605 (España)	AF450096	91ZR02 (Congo)	AF212295
X623 (España)	AF450097	94LB11 (Liberia)	AF212296
X138 (España)	AF450098	97AN20 (Angola)	AF212297
X397 (España)	AF423756	HH8793 clon 1.1 (Finlandia)	AF061640
X421 (España)	AF423757	HH8793 clon 12.1 (Finlandia)	AF061641
X475 (España)	AF423758	SE6165 (Suecia)	AF061642
X477 (España)	AF423759	96CM-1849 (Camerún)	AF460972
X558 (España)	AF423760	96CM-4164 (Camerún)	AF460974
4262336 (Congo)	AF084936	VI191	L11783
X1950628C4 (EUA)	AY371121	Z321B (Zaire)	U76035
92NG003 (Nigeria)	U88825	96CMABB55 (Camerún)	AY772535

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

Anexo 3. Secuencias de VIH-1 (gen *env*) utilizadas en el análisis filogenético de las secuencias clasificadas como subtipo G en las Cadenas 1 y 2.

Cepa (País)	Número de Acceso al <i>GenBank</i>	Cepa (País)	Número de Acceso al <i>GenBank</i>
MM4089-Q16 (Kenya)	AF101470	96NG-IKCSW21 (Nigeria)	AJ389734
71F2 (Zambia)	AY423919	96NG-MACSW018 (Nigeria)	AJ389748
71F3 (Zambia)	AY423920	96NG-MAOP005	AJ389756
71F5 (Zambia)	AY423922	00NE080 (Níger)	AJ429908
71F6 (Zambia)	AY423923	00NE032 (Níger)	AJ429875
71F7 (Zambia)	AY423924	FIN9103 (Finlandia)	AF219376
71F8 (Zambia)	AY423925	clon 183 (Portugal)	AJ296237
71F9 (Zambia)	AY423926	clon 584 (Portugal)	AJ296252
71F10 (Zambia)	AY423927	clon 585 (Portugal)	AJ296263
71M1 (Zambia)	AY423908	clon 629 (Portugal)	AJ296235
71M2 (Zambia)	AY423909	clon 631 (Portugal)	AJ296224
71M4 (Zambia)	AY423911	clon 746 (Portugal)	AJ296265
71M5 (Zambia)	AY423912	clon 800 (Portugal)	AJ296255
71M6 (Zambia)	AY423913	clon PT176 (Portugal)	AJ504454
71M10 (Zambia)	AY423917	clon PT565 (Portugal)	AJ318387
71M11 (Zambia)	AY423918	clon PT806 (Portugal)	AJ504456
VI525 (Gabón)	L22953	clon PT747i (Portugal)	AJ429000
LBV21-7 (Gabón)	U09664	clon PT886i (Portugal)	AJ429020
PHI426 (Francia)	AY231158	clon PT1759i (Portugal)	AJ490032
LN65_n13 (Francia)	AJ490002	clon PT2677i (Portugal)	AJ429013
LN65_n70 (Francia)	AJ490004	clon PT3934i (Portugal)	AJ429014
LN65_n87 (Francia)	AJ490005	clon PT4490i (Portugal)	AJ429002
LA65_D21 (Francia)	AJ490018	clon PT4608i (Portugal)	AJ429001
PN65_D22 (Francia)	AJ490033	clon PT8271i (Portugal)	AJ429028
PN65_D25 (Francia)	AJ490038	X138 (España)	AF450098
96CMABB55 (Camerún)	AY772535	97SE1078 (Senegal)	AJ288981
97CM.MP801 (Camerún)	AJ554893	clon K359DC1 (EUA)	AY055825
01CM.4049HAN (Camerún)	AY371121	clon K359DC2 (EUA)	AY072803
92NG003 (Nigeria)	U88825	clon K359PC1 (EUA)	AY072805
96NG-MACSW065 (Nigeria)	AJ389752	92RU131.9 (Rusia)	U30312
96NG-LCSW218 (Nigeria)	AJ389742	RU511B (Rusia)	U08356

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>