



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



Facultad de Farmacia y Bioquímica

Tesis Doctoral

Variabilidad genómica del virus de la  
Inmunodeficiencia Humana tipo I en individuos con  
conductas de alto riesgo y su impacto sobre la  
capacidad replicativa viral *in vitro*

**Tesista:** Lic. Constanza Eleonora Espada

**Director:** Dra. Liliana Martínez Peralta

**Director Adjunto:** Dr. Mauricio Guillermo Carobene

**Consejero de estudios:** Dra. Viviana Mbayed

**Lugar de trabajo:** Instituto de investigaciones Biomédicas en  
Retrovirus y Sida (INBIRS) UBA-CONICET

AÑO 2014

## ***Indice***

RESUMEN.....	5
ABSTRACT .....	6
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
ABREVIATURAS .....	10
I. INTRODUCCIÓN .....	14
I.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).....	15
I.1.1. Historia y Clasificación .....	15
I.1.2. Origen del Virus de la Inmunodeficiencia Humana .....	16
I.1.3. Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 .....	21
I.1.4. Ciclo de replicación viral .....	24
I.2. Epidemia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I.....	34
I.2.1. Epidemiología del HIV-1 en el mundo .....	34
I.2.2. Historia de la epidemia de HIV/ sida en Argentina.....	36
I.2.3. Conductas de riesgo y vulnerabilidad a la infección por HIV-1 .....	37
I.2.4. Caracterización molecular de HIV en Argentina.....	39
I.2.5. Infecciones múltiples en individuos infectados con HIV-1 .....	41
I.3. Formas recombinantes del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1.....	44
I.3.1. Transcripción reversa y recombinación.....	44
I.3.2. Diversidad del Virus de la Inmunodeficiencia Humana .....	49
I.3.3. Región genómica Gag y GagPol de HIV-1 .....	51
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	70

II.1 Objetivo .....	70
II.1.1. Objetivos generales .....	70
II.1.2. Objetivos particulares.....	70
II.2. Hipótesis .....	71
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	72
III.1. Caracterización de infecciones múltiples .....	73
III.1.1. Población de estudio y obtención de muestras.....	73
III.1.2. Análisis de la evolución clínica de los individuos analizados.....	74
III.1.3. Análisis moleculares en muestras seriadas .....	75
III.2. Impacto de la recombinación intersubtipo en la región genómica Gag-Proteasa sobre la capacidad replicativa de HIV-1 .....	79
III.2.1. Análisis de mutaciones en Gag y Proteasa asociadas a exposición y/o resistencia a Inhibidores de Proteasa .....	79
III.2.2. Evaluación de la capacidad replicativa asociada a la región Gag-Proteasa.....	81
IV. RESULTADOS.....	94
IV. 1. Caracterización de infecciones dobles .....	95
IV. 1.1. Características generales de la población .....	95
IV. 1.2. Detección y características generales de infecciones dobles.....	97
IV.1.3. Características generales de individuos con infección simple para HIV-1 .....	107
IV.2. Impacto de la recombinación intersubtipo en la región genómica Gag-Proteasa sobre la capacidad replicativa de HIV-1 .....	120
IV.2.1. Análisis de mutaciones en Gag y Proteasa asociadas a exposición y/o resistencia a Inhibidores de Proteasa .....	121

IV.2.2. Evaluación de la capacidad replicativa asociada a la región genómica Gag-Proteasa de HIV-1.....	130
V. DISCUSIÓN .....	149
VI. CONCLUSIONES .....	161
VI. PERSPECTIVAS.....	162
Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:.....	162
VII. REFERENCIAS .....	163

## **RESUMEN**

La situación epidemiológica del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I (HIV-1) en Argentina, caracterizada por el predominio de subtipo B en hombres que tienen sexo con hombres y de recombinantes BF en la población heterosexual y usuarios de drogas inyectables, ofrece un campo favorable para la presencia de infecciones dobles en individuos con conductas de alto riesgo para la infección. La región *gag/pol* de HIV-1 juega un rol fundamental durante el ciclo de replicación viral, incluyendo ensamblado y maduración de la partícula viral. Se ha demostrado que la recombinación intersubtipo es frecuente en esta región, lo cual podría afectar la capacidad replicativa de las variantes recombinantes en relación a sus parentales. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo nos propusimos analizar a lo largo del tiempo, la variabilidad genómica del HIV-1 en individuos con infección múltiple y sus posibles implicancias en la dinámica de la población viral y evaluar el impacto de la recombinación intersubtipo en la región genómica *gag/pol* sobre la capacidad replicativa *in vitro* en modelos de infección simple y de infección doble.

El análisis realizado permitió detectar 3 infecciones dobles, dos de ellas correspondientes a co-infecciones entre variantes de subtipo B y recombinantes BF, y la restante a una co-infección con dos variantes recombinantes BF. La condición clínica de los tres individuos se mantuvo estable durante el periodo de estudio y el patrón de mutaciones de resistencia entre las variantes mayoritarias y minoritarias fue diferente. Por otra parte, el análisis comparativo de la variabilidad aminoacídica de secuencias de Gag y Proteasa mostró, por primera vez en la Argentina, una mayor frecuencia de cambios polimórficos naturales en los aislamientos de subtipo F y variantes recombinantes BF respecto a los de subtipo B. Por último, la evaluación *in vitro* de la capacidad replicativa de dos variantes recombinantes BF reveló que la recombinación en la región Gag-Proteasa estuvo asociada a una disminución en la producción de partículas virales, respecto a su contraparte de subtipo B. Esta observación fue probada en el contexto de un ensayo de competición entre las variantes mencionadas. Los resultados mostraron que la replicación de las variantes recombinantes fue menos eficiente que su contraparte de subtipo B, alcanzando una frecuencia menor en la población viral en un periodo corto de tiempo.

Nuestros resultados sugieren que la sobreinfección es un fenómeno frecuente en poblaciones con riesgo múltiple, aún entre variantes muy relacionadas. El estudio de la estructura primaria de secuencias de *gag/pol* provenientes de aislamientos de variantes recombinantes BF, subtipo F y subtipo B mostró que, las dos primeras presentaban mayor cantidad de sustituciones en sitios relacionados con exposición y/o

resistencia a IP. La comparación de la capacidad replicativa *in vitro* entre variantes recombinantes BF y sus parentales, mostró que la recombinación intersubtipo en la región Gag-Proteasa impacta sobre la capacidad replicativa generando nuevas variantes con menor *fitness*, respecto a las variantes parentales.

## ***ABSTRACT***

The genetic characterization of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) epidemic in Argentina showed that subtype B is the most prevalent in men who have sex with men while BF recombinant forms are most prevalent among heterosexuals and intravenous drug users. Thus, patients with multiple epidemiological risks may be exposed to both. The *gag/pol* genomic region plays a fundamental role during the viral life cycle and it has been shown that recombination is a common feature in this region, which may affect the viral replication capacity (RC) of the recombinant virus. Herein we analyzed the presence of HIV dual infections in individuals with high probability of re-infection and we evaluated the impact of intersubtype recombination in the *gag/pol* region on viral RC and relative RC.

Three dual infections were detected, two corresponded to individuals co-infected with subtype B and BF recombinant variants, and one was co-infected with two BF recombinant variants. Prolonged infection with a stable clinical condition was observed in the three individuals. Resistance mutation patterns were different between the predominant and the minority strains. The analysis of Gag and Gagpol sequences showed, for the first time in Argentina, a high natural polymorphism in subtype F and BF recombinants variants in comparison with subtype B isolates. The *in vitro* evaluation of RC of two BF recombinant forms revealed that the recombination in the Gag-Protease region was associated with a decrease in viral particles production when compared to the B variant. Furthermore, when challenged with subtype B in a dual competition assay, the BF variants were less efficient than subtype B, reaching a lower frequency in the viral population in a short period of time.

In conclusion, our results show that HIV dual infection can occur with closely related subtypes, and even with different variants of the same recombinant form. The comparison of the primary structure of *gag/pol* sequences between F1 subtype, BF recombinants variants and B subtype isolates, showed that non-B HIV-1 strain were highly polymorphic in positions related with PI exposure and/or resistance. In addition, we describe for the first time the *in vitro* dynamics of *gag-protease*-associated RC of HIV-1 intersubtype variants, compared with that of subtype B. This study provides

evidence that intersubtype recombination in this region might alter viral RC generating variants with reduce fitness.

## ***LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS***

**Figura 1:** Relación filogenética de los Lentivirus de primates.

**Figura 2:** Transmisión zoonótica independiente y múltiple de SIVcpz y SIVsm hacia el hombre.

**Figura 3:** Virus de la inmunodeficiencia Humana tipo I.

**Figura 4:** Ciclo de replicación del virus HIV-1.

**Figura 5:** Representación esquemática de la historia natural de la infección por HIV-1.

**Figura 6:** Número estimado de adultos y niños que vivían con HIV/sida

**Figura 7:** Representación de la estructura recombinante de la CRF12\_BF.

**Figura 8:** Transcripción reversa del HIV-1.

**Figura 9:** Proceso de recombinación.

**Figura 10:** Distribución global de subtipos y formas recombinantes del HIV-1.

**Figura 11:** Representación esquemática de las poliproteínas Gag (Pr55<sup>Gag</sup>) y GagPol (Pr160<sup>GagPol</sup>).

**Figura 12:** Proteína Matriz (MA, p17) de HIV-1.

**Figura 13:** Proteína Cápside (CA, p24) de HIV-1.

**Figura 14:** Proteína Nucleocápside (NC, p7) de HIV-1.

**Figura 15:** Proteína p6 de HIV-1.

**Figura 16:** Maduración de las partículas virales de HIV-1.

**Figura 17:** Estructura de la Proteasa de HIV-1.

**Figura 18:** Representación esquemática de la secuencia de clivado de las poliproteínas Gag y GagPol.

**Figura 19:** Estrategia utilizada para la construcción de los genomas recombinantes

**Figura 20:** Frecuencia de co-infecciones con enfermedades de transmisión sexual

**Figura 21:** Individuo I01.

**Figura 22:** Individuo I02.

**Figura 23:** Individuo I03.

**Figura 24:** Individuo I04.

**Figura 25:** Individuo I05.

**Figura 26:** Individuo I06.

**Figura 27:** Individuo I07.

**Figura 28:** Frecuencia de sustituciones asociadas con exposición y/o resistencia a IPR.

**Figura 29:** Frecuencia de sustituciones en la Proteasa viral.

**Figura 30:** Estructura de las quimeras generadas y las CRF12\_BF y CRF28\_BF prototípicas

**Figura 31:** Patrón de recombinación y estructura primaria de la región Gag-Proteasa.

**Figura 32:** Evaluación de la cinética de producción viral en líneas celulares linfoides infectadas.

**Figura 33:** Evaluación de la capacidad replicativa relativa entre NL-B y NL-F, NL-12BF-*like* y NL-28BF-*like*.

**Figura 34:** Expresión de Gag de las diferentes quimeras.

**Tabla 1:** Nombre, posición y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen *pol* de HIV-1.

**Tabla 2:** Condiciones de ciclado para la amplificación del gen *pol* de HIV-1.

**Tabla 3:** Nombre, posición y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento 5' LTR-*gag-proteasa* de HIV-1.

**Tabla 4:** Condiciones para la amplificación del fragmento 5'LTR-*gag-proteasa*.

**Tabla 5:** Nombre, posición y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen *gag* de HIV-1.

**Tabla 6:** Condiciones de ciclado para la amplificación del fragmento *gag* de HIV-1.

**Tabla 7:** Características clínicas de los individuos estudiados.

**Tabla 8:** Evolución del perfil de resistencia en los individuos con infecciones dobles vs infección simple.

**Tabla 9:** Cinética de producción viral en la línea celular linfóide MT2.

**Tabla 10:** Cinética de producción viral en la línea celular linfóide CEM-GFP

## ***ABREVIATURAS***

ABC: Abacavir.

ADN: Acido Desoxi-Ribonucleico

ADNni: ADN no integrado

APV: Amprenavir.

ARN: Acido Ribonucleico

ARNg: ARN genómico.

ARNt: ARN de transferencia.

ARV: *Antiretroviral treatment*, Tratamiento Antirretroviral.

ARV: *AIDS Related Virus*, Virus asociado a sida

AZT: Zidovudina.

CA: proteína de la Cápside/p24.

CDC: *Center for Disease Control and Prevention*, Centro de Control de Enfermedades

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica.

CNRS: Centro Nacional de Referencia para el sida.

CTD: *C-Terminal Domain*, Dominio C-terminal.

CRF12\_BF: *Circulating Recombinant Form 12\_BF*, Forma Recombinante Circulante 12\_BF.

CV: Carga Viral.

CypA: Ciclofilina A.

ddC: Zalcitabina.

ddl: Didanosina.

d4T: Estavudina.

DLV: Delarvidina.

dNTP: didesoxinucleótidos trifosfato.

EFV: Efavirenz.

ETS: Enfermedades de Transmisión Sexual.

fosAPV: Fos-amprenavir.

FUNDAI: Fundación de Ayuda al Inmunodeficiente.

GFP: *Green Fluorescent Protein*, Proteína verde fluorescente.

HAART: *Highly Active Antiretroviral Therapy*, Terapia antirretroviral de alta eficacia.

HBV: *Hepatitis B Virus*, Virus de la Hepatitis B.

HCV: *Hepatitis C Virus*, Virus de la Hepatitis C.

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*, Virus de la Inmunodeficiencia Humana

HPV: *Human Papillome Virus*, Virus de Papiloma Humano.

HS: Heterosexuales.

HSH: Hombres que tiene sexo con hombres.

HSV: *Herpes Simple Virus*, Virus del Herpes Simple.

HTLV-III: *Human T Lymphotropic Virus Type III*, Virus Linfotrópico Humano tipo III .HTS: Hombres Trabajadores Sexuales.

IDV: Indinavir.

IF: Inhibidores de la Fusión.

IM: Inhibidores de la Maduración.

IN: Integrasa viral.

IIN: Inhibidores de la Integrasa viral.

IP: Inhibidores de la Proteasa viral.

ITS: Infecciones de Transmisión Sexual.

K-2p: Modelo de dos parámetros de Kimura.

Kb: Kilobases.

KDa: Kilodaltons.

KLT: KALETRA

LAV: *Lymphadenopathy associated Virus*, Virus asociado a Linfadenopatía.

LTR: *Long Terminal Repeats*, Repeticiones terminales largas.

MA: proteína de la Matriz/p17.

MAR: Mutaciones asociadas a resistencia.

MHR: *Major Homology Region*, Región principal de homología.

MP: Membrana Plasmática.

MTS: Mujeres Trabajadoras Sexuales.

NC: Proteína de la Nucleocápside/p7.

NFV: Nelfinavir.

NJ: *Neighbor Joining*, Método de vecino más cercano.

NNRTI: *Non- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*, Inhibidores No-Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa.

NRTI: *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*, Inhibidores Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa.

NtRTI: *Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor*, Inhibidores Nucleotídicos de la Transcriptasa Reversa.

NTD: *N-Terminal Domain* Dominio N-terminal.

NVP: Nevirapina.

ONU sida: Organización de las Naciones Unidas para la lucha contra el sida.

pb: Pares de bases.

PBS: *Primer Binding Site*, Sitio de unión del cebador.

PBS: *Phosphate Buffer Saline*, Solución tamponada de fosfatos.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa.

PFA 1%: Solución de Paraformaldehído al 1%.

PIP2: Fostatidil 4-5 bifosfato.

PPT: *Polypurine Tract*, Tracto de polipurina

PR: Proteasa viral

PTAP: Motivo Pro-Thr-Ala-Pro-Pro.

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, Transcripción inversa acoplada a amplificación por PCR.

RTV: Ritonavir.

SC: Sitio de clivaje.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SGA: *Single Genome Amplification*, Amplificación de genoma único

Sida: Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana.

SIV: Virus de la Inmunodeficiencia de Simios.

SIVcpz: Virus de la Inmunodeficiencia de chimpancé.

SIVsm: Virus de la Inmunodeficiencia de Mangabei gris.

SIVmac: Virus de la Inmunodeficiencia de macacos.

SIVagm: Virus de la Inmunodeficiencia de monos verdes.

SIVsyk: Virus de la Inmunodeficiencia de Cercopiteco de cuello blanco.

SIVhoest: Virus de la Inmunodeficiencia de monos l'Hoest.

SIVsun: Virus de la Inmunodeficiencia de Cercopiteco de Gabón.

SIVmnd: Virus de la Inmunodeficiencia del mandril.

SL1-SL4: *Stem Loops*, Estructuras tallo-bucle.

Sp1: péptido espaciador 1.

Sp2/p2: Péptido espaciador 2.

SQV: Saquinavir.

SQV/r: Saquinavir/Ritonavir.

TBE: buffer de tris- borato-EDTA.

TDF: Tenofovir.

TFP: *Trans-Frame Protein*.

TR: Transcriptasa Reversa.

3TC: Lamivudina.

UCNI: Usuario de Cocaína No Inyectable.

UDI: Usuario de Drogas Inyectables.

URF\_BF: *Unique Recombinant Form*, Forma Recombinante Unica BF.

VLP: *Virus Like Particle*, Partícula semejante a virus.

WB: *Western Blot*.

ZnF: *Zinc Finger Domain*, Dominio Dedos de Zinc.

# ***I. INTRODUCCIÓN***

# ***1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV)***

## ***1.1.1. Historia y Clasificación***

Los primeros casos de SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) se diagnosticaron en 1981 cuando el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) notificó la aparición de casos de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (previamente *P. carinii*) y de una forma diseminada de sarcoma de Kaposi en jóvenes homosexuales masculinos [1,2]. A pesar de no haber sido en un principio identificado el agente causante, pronto quedó claro que todos los pacientes sufrían una disminución progresiva de linfocitos T CD4+, y que, como resultado de ello, padecían enfermedades que normalmente eran controladas por el sistema inmune.

Durante 1983 se propusieron tres virus como agentes etiológicos del SIDA: el LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*, Virus Asociado a Linfadenopatía), el HTLV-III (*Human T Lymphotropic Virus Type III*, Virus Linfotrópico Humano Tipo III) y el ARV (*AIDS Related Virus*, Virus asociado a sida) [1,2,3]. Estudios posteriores llevaron a la conclusión de que en los tres casos se estaba en presencia de aislamientos de un mismo virus [4]. En 1986 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus designó a este virus el nombre de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).

En 1985 se aisló en África Occidental un virus similar al HIV. Desde entonces se conoce como HIV-1 al virus original, que se encuentra ampliamente distribuido por el mundo, y como HIV-2 al prevalente en África Occidental. El HIV fue clasificado dentro de la familia Retroviridae, subfamilia Lentivirinae,

debido a que comparte con los demás retrovirus un genoma integrado por los tres genes clásicos: *gag*, *pol* y *env*, y la presencia de la enzima transcriptasa reversa (TR).

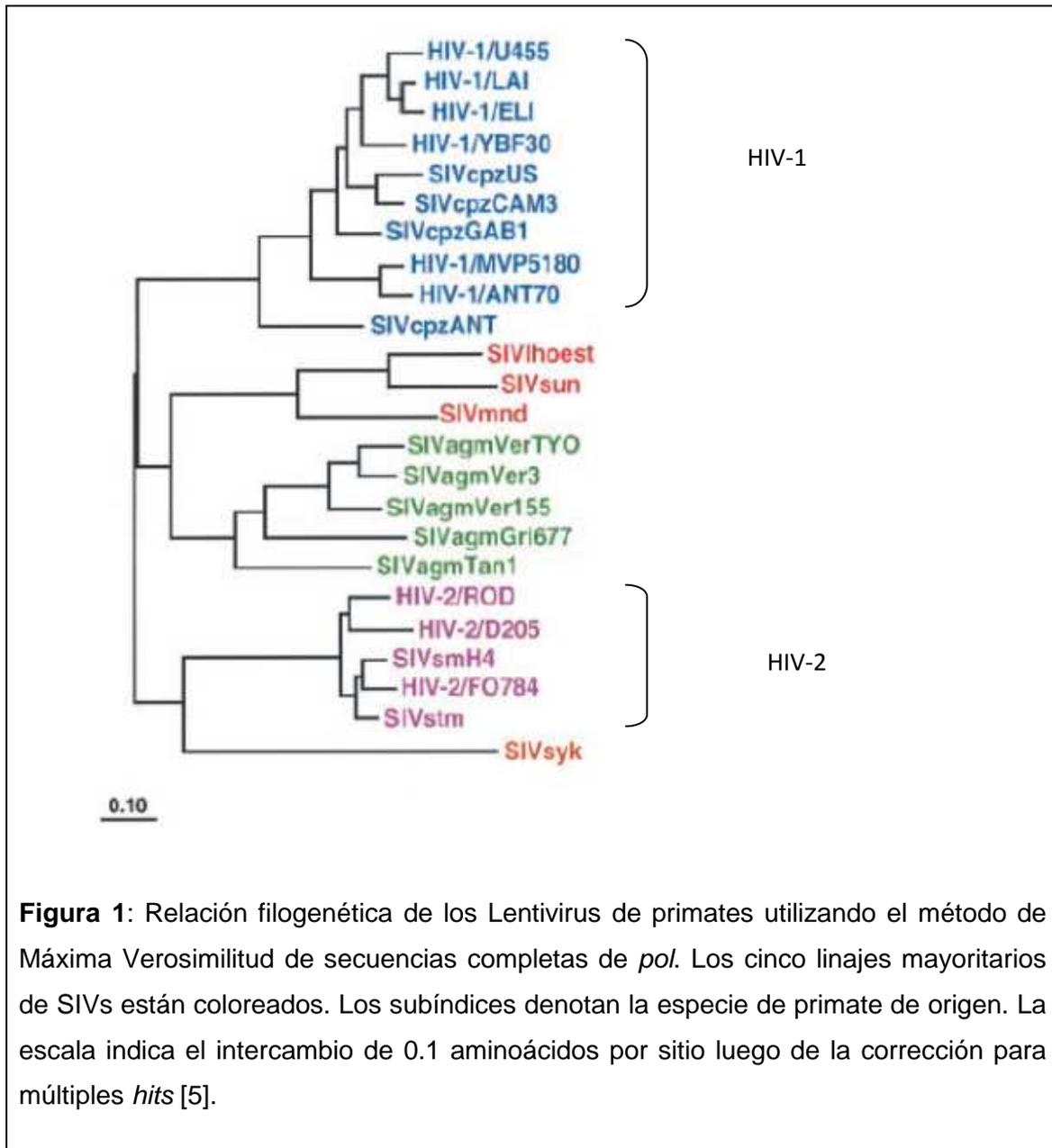
### ***1.1.2. Origen del Virus de la Inmunodeficiencia Humana***

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre secuencias de HIV-1 y HIV-2 y de virus de primates africanos permitió establecer no sólo el origen simiano del virus sino también las circunstancias y factores que contribuyeron a la iniciación de la epidemia. El hombre (*Homo sapiens sapiens*) no es el huésped natural de los virus de inmunodeficiencia. Por el contrario, estos virus se introdujeron en la población como resultado de transmisión entre especies. Se sabe ahora que existen al menos 18 lentivirus que infectan naturalmente primates africanos [5]. Cinco criterios han sido utilizados para explicar el origen zoonótico de HIV-1 y -2: (i) similitud en la organización del genoma viral; (ii) relación filogenética; (iii) prevalencia en el huésped natural; (iv) coincidencia geográfica y (v) rutas plausibles de transmisión [6].

Los virus simianos fueron llamados virus de la inmunodeficiencia (SIV) debido a su similitud genética y estructural con los virus causantes de sida. Sin embargo, no se observó que causaran tal enfermedad en los simios sino hasta un trabajo reciente en el que se demostró que, al menos el Virus de la Inmunodeficiencia de Chimpancés (SIVcpz), es patogénico aún en su huésped natural, en el que produce una inmunopatología semejante a sida [7].

Los lentivirus simianos, para los cuales se cuenta con secuencia completa de su genoma, se agrupan en 5 linajes filogenéticos. Estos linajes están

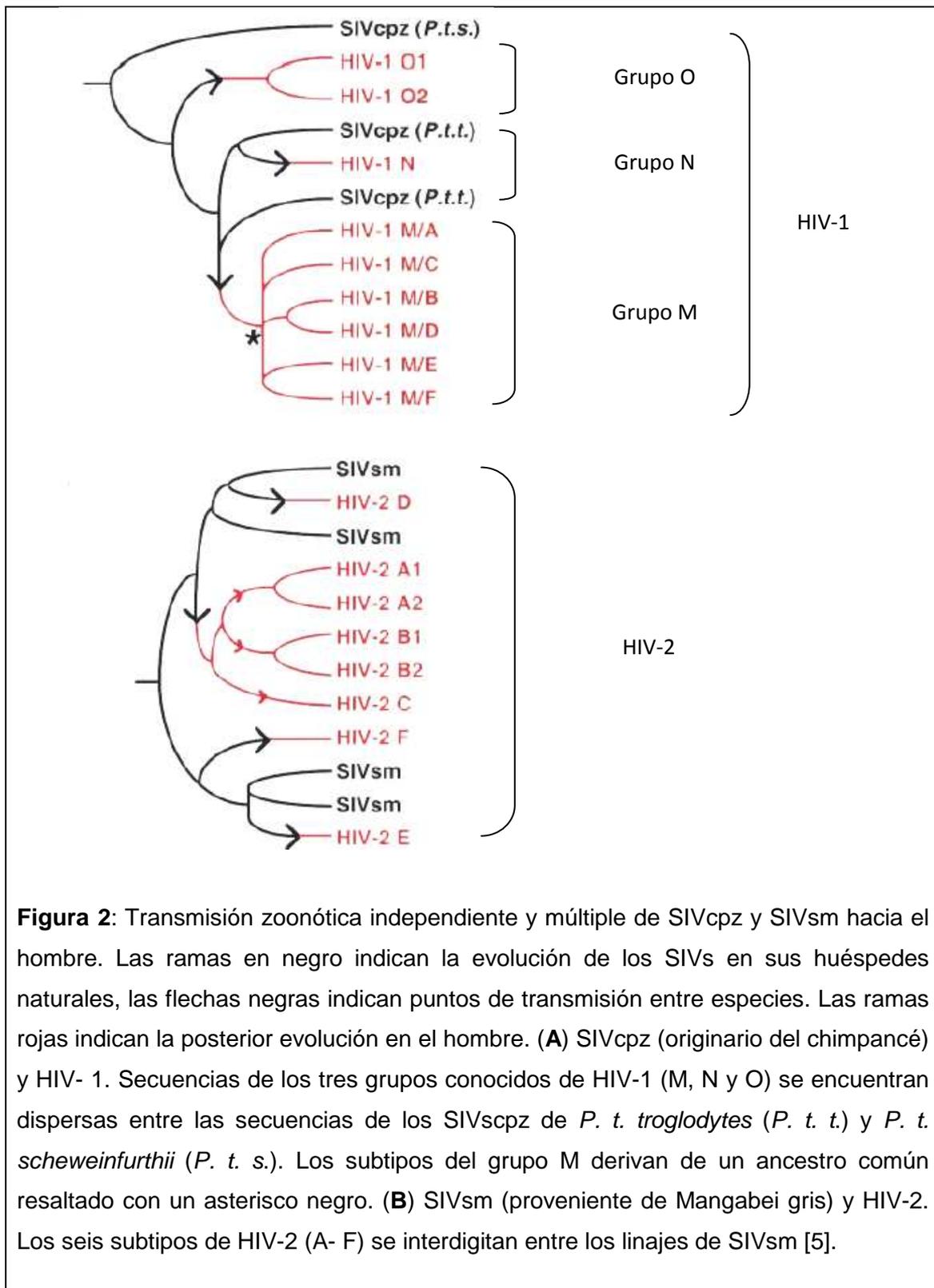
representados por (i) SIVcpz, virus de la inmunodeficiencia de chimpancés (*Pan troglodytes*) que agrupa junto con HIV-1; (ii) SIVsm, virus de la inmunodeficiencia de Mangabei gris (*Cercocebus atys*) que agrupa junto con HIV-2 y SIVmac, virus de la inmunodeficiencia de macacos (género *Macaca*); (iii) SIVagm, virus de la inmunodeficiencia de 4 especies de monos verdes africanos (género *Chlorocebus*); (iv) SIVsyk, virus de la inmunodeficiencia de Cercopiteco de cuello blanco (*Cercopithecus albolugaris*); y (v) SIVhoest, virus de la inmunodeficiencia de monos l'Hoest (*Cercopithecus lhoesti*), SIVsun virus de Cercopiteco de Gabón (*Cercopithecus solatus*) y SIVmnd, virus de inmunodeficiencia del mandril (*Mandrillus sphinx*) [5] (Figura 1).



El origen zoonótico del HIV ha sido claramente establecido para el HIV-2. Sin embargo, rastrear el origen del HIV-1 no fue tan simple. En un primer momento se pensó que el ancestro primate del HIV-1 era el SIVcpz debido a su similitud en la organización genética y a que ambos compartían un gen particular, *vpu*, exclusivo para ambos virus. Sin embargo, la distancia filogenética entre las secuencias de ambos resultó inesperadamente alta, la prevalencia del SIVcpz en poblaciones naturales era muy baja, la coincidencia geográfica entre el

hábitat natural de los chimpancés y los primeros casos de sida no era muy clara y finalmente no se encontraban rutas plausibles de transmisión. Posteriormente, estudios independientes de dos grupos de trabajo demostraron que la epidemia de HIV-1 surgió como consecuencia de la transmisión del SIVcpz pero de una subespecie particular de chimpancé, *P. t. troglodytes*, al hombre [6,8,9]. En ambos trabajos se presentaron evidencias de una alta prevalencia de SIVcpz en poblaciones naturales de chimpancés, coincidencia geográfica entre los virus simiano y humanos, y la caza y el uso de cuero de chimpancé como rutas de transmisión zoonótica.

Con respecto al sitio geográfico de origen de la epidemia de HIV-1, la región ecuatorial oeste de África (Gabón, Guinea, Camerún y República del Congo) se propuso como el centro original debido a que es el único sitio en el que co-circulan poblaciones humanas y grupos de chimpancés (*P. t. troglodytes*) infectados con virus filogenéticamente relacionados [6] (Figura 2).



El HIV-1 se habría transmitido desde su ancestro simiano al hombre al menos en tres oportunidades, resultando en tres linajes filogenéticos distintivos, M

(*Main*), O (*Outlier*) y N (*non M- non O*), siendo el grupo M el responsable de la pandemia de HIV (Figura 2) [8]. Recientemente, se ha descrito en mujeres procedentes de Camerún, una nueva variante de HIV-1 relacionado filogenéticamente con el virus de la inmunodeficiencia de gorilas. Esta variante se agrupó en un nuevo linaje filogenético, el cual se designó como grupo P [10].

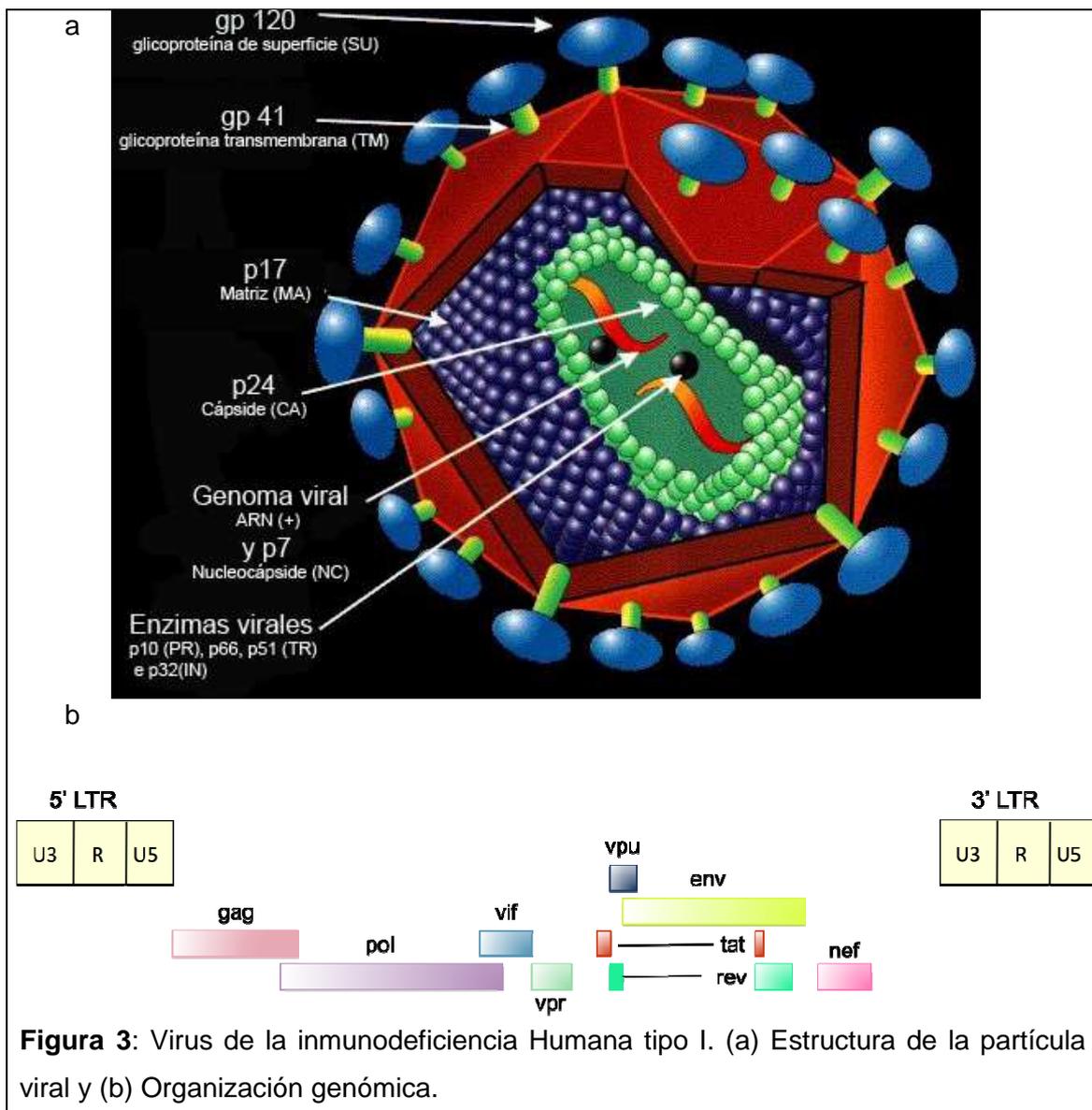
En cuanto al momento de la transmisión entre especies, se sabe, por el análisis de muestras de sangre guardadas, que grupos provenientes de África occidental han estado infectados con HIV-1 grupo M desde 1959 [11] y con virus del grupo O desde 1963 [12]. Factores como disrupciones sociales, esclavitud, urbanización, y prostitución, entre otros, habrían contribuido a la iniciación de la epidemia en los comienzos del siglo XX. Además, el uso de agujas no esterilizadas para inyecciones parenterales y vacunación, podría haber resultado en una transmisión rápida del virus [13,14].

### ***1.1.3. Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1***

El virión de HIV-1 es una partícula esférica de aproximadamente 100 a 110 nm de diámetro. Es un virus envuelto por una bicapa lipídica proveniente de la célula huésped con glicoproteínas expuestas a la superficie (gp120) y ancladas a la membrana por medio de proteínas transmembrana (gp41) formando un homotrímero [15]. Tanto gp120 como gp41 poseen una importante función en la entrada del virus a la célula huésped.

Por dentro de la envoltura lipídica se encuentra la cápside externa, un poliedro de 60 caras triangulares, constituida por la proteína de la Matriz (MA/p17). Esta

cápside contiene al core viral que se encuentra formado por una segunda cápside de proteína CA (p24) que contiene las 3 enzimas virales: proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR) e integrasa (IN) y el genoma viral asociado a la nucleoproteína (NC/p7) junto con tres proteínas accesorias, Vif, Vpr y Nef (Figura 3).



**Figura 3:** Virus de la inmunodeficiencia Humana tipo I. (a) Estructura de la partícula viral y (b) Organización genómica.

El genoma del HIV-1 está constituido por dos cadenas de ARN monocatenario de aproximadamente 9.2 kb y de polaridad positiva, por lo que pueden

considerarse virus “diploides”. Ambas cadenas están constituidas por dos secuencias terminales repetitivas (**LTR**: *long terminal repeat*), y cada una codifica para los genes: *gag*, *pol* y *env* y una serie de genes reguladores (Figura 3).

El gen *gag* codifica para un precursor de las proteínas de la cápside, pr55<sup>Gag</sup> (Gag), que luego es clivado por la PR viral, produciendo las proteínas MA y CA que van a formar las cápsides externa e interna, respectivamente, y p15 que a su vez es precursora de las proteínas de la NC y p9 (p6).

El gen *pol* codifica para proteínas con función enzimática que intervienen en la replicación y maduración viral: la PR (p10), la TR (p66/51,) y la IN (p32).

El gen *env* codifica para un precursor que se encuentra altamente glicosilado, la gp160, que luego de un clivaje da lugar a las dos glicoproteínas de membrana, gp41 y gp120. La gp120 tiene 5 regiones constantes (C1 a C5) y 5 regiones variables (V1 a V5) [16]. La región V3 codifica para el principal dominio de neutralización, llamado también *V3 loop* [17], además se lo ha asociado al tropismo celular, citopatogenicidad, infectividad y capacidad de formación de sincicios [18].

Se han descrito también 6 genes reguladores: *tat*, *rev* y *nef*, que codifican para las proteínas p14, p19 y p25/27 respectivamente y ejercen principalmente su acción a nivel de la transcripción; mientras que *vif*, *vpr* y *vpu* (*vpx* para HIV-2) actúan a nivel de los productos de maduración y liberación del virus [19,20]. A pesar de que estas son las funciones principales, se han descrito múltiples funciones asociadas a la homeostasis celular.

## ***1.1.4. Ciclo de replicación viral***

### ***1.1.4.1. CICLO VIRAL***

El ciclo replicativo del HIV-1 comienza con la unión del virus a la célula hospedadora. Dicha unión es específica, y se inicia con la interacción de la glicoproteína gp120, presente en la membrana viral, con el receptor CD4 de la célula hospedadora. Siguiendo a esta unión ocurre un cambio conformacional en gp120 que incluye un incremento en la exposición del dominio V3 *loop*. Sin embargo, este cambio conformacional no es suficiente para la generación de una estructura de fusión. Algunos receptores de quimoquinas, como el CXCR4 o el CCR5, presentes en las células hospedadoras, intervienen como co-receptores en esta unión. Esta interacción conduce a un cambio conformacional que permite la exposición del péptido de fusión presente en la glicoproteína gp41 y la siguiente penetración del mismo en la membrana celular [19,20].

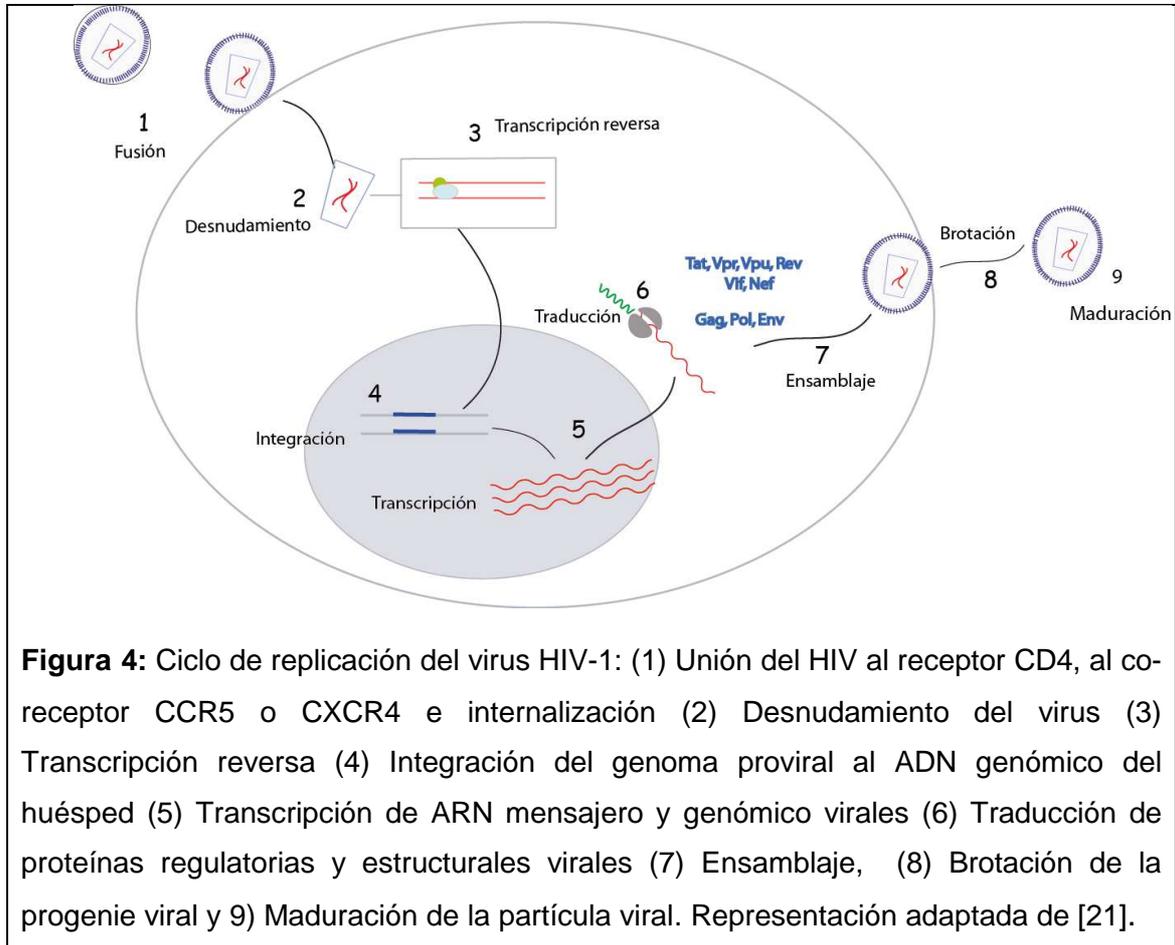
Siguiendo a la fusión de membranas entre el virus y la célula huésped se produce la penetración del *core* en el citoplasma. Las proteínas del *core* permanecen asociadas al ARN viral hasta el inicio de la transcripción. La transcripción es llevada a cabo por la TR, la cual transcribe una cadena de ADN de polaridad negativa sobre una de las cadenas de ARN, dando lugar a un híbrido ADN/ARN cuyo ARN es luego degradado por la actividad RNAsaH de la TR. Posteriormente se genera una segunda cadena de ADN de polaridad positiva, como copia de la primera. Algunas de las características de la actividad polimerasa de la TR viral es que incorpora desoxi-nucleotidos trifosfatos (dNTPs) durante la formación del puente fosfodiéster 3'- 5' y que,

además, tiene una especificidad relativamente alta tanto para un templado de ARN como de ADN. Sin embargo, una de las propiedades más importante de la TR es su falta de actividad de corrección de errores. Debido a su incapacidad de escindir los nucleótidos mal apareados, la TR viral posee una fidelidad aproximadamente 100 veces menor que las ADN polimerasas celulares, lo que se traduce en una tasa de mutación de aproximadamente  $3,4 \times 10^{-5}$  mutaciones por par de base por ciclo replicativo. Debido a que se estima que el genoma del HIV-1 consiste en  $10^4$  pares de bases y la tasa de producción viral se estima en  $10^{10}$  viriones por día, millones de variantes se producen a diario en una persona infectada [21,22,23].

Una vez concluida la transcripción inversa, el complejo proteico más la molécula de ADN doble cadena, denominado complejo pre-integración, es transportado al núcleo donde el ADN viral puede integrarse al genoma celular, por acción de la IN (provirus) o permanecer como ADN no integrado (ADNni) en forma lineal o circularizada.

Cuando la célula es activada, el provirus inicia la síntesis de los ARN mensajeros a partir de los cuales se traducirán las proteínas virales. Las proteínas de membrana, una vez que han sido clivadas y glicosiladas, se ubican en la membrana de la célula hospedadora. Las proteínas estructurales se ensamblan con el ARN viral cerca de la membrana celular y adquieren la envoltura durante el proceso de brotación. La brotación del nuevo virión puede producirse de forma lenta, conservando la integridad celular, o de forma rápida, provocando la lisis de la célula huésped [21]. Luego o durante la brotación, la PR cliva los precursores Gag y GagPol, proceso conocido como maduración, el

cual es un proceso clave en la generación de partículas infecciosas (Figura 4) [24].



**Figura 4:** Ciclo de replicación del virus HIV-1: (1) Unión del HIV al receptor CD4, al co-receptor CCR5 o CXCR4 e internalización (2) Desnudamiento del virus (3) Transcripción reversa (4) Integración del genoma proviral al ADN genómico del huésped (5) Transcripción de ARN mensajero y genómico virales (6) Traducción de proteínas regulatorias y estructurales virales (7) Ensamblaje, (8) Brotación de la progenie viral y 9) Maduración de la partícula viral. Representación adaptada de [21].

### ***1.1.4.2. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN***

En la infección por HIV-1 se pueden diferenciar tres estadios: (i) primoinfección, (ii) fase asintomática (latencia clínica) y (iii) fase clínica de sida. Al inicio de la infección, el virus infecta y destruye principalmente linfocitos T CD4+ de memoria en los tejidos linfoides asociados a mucosas. Esta fase, comprendida dentro de la primoinfección, ha sido denominada “etapa eclipse”, debido a que la infección está localizada en el tejido expuesto al virus y no ha ocurrido

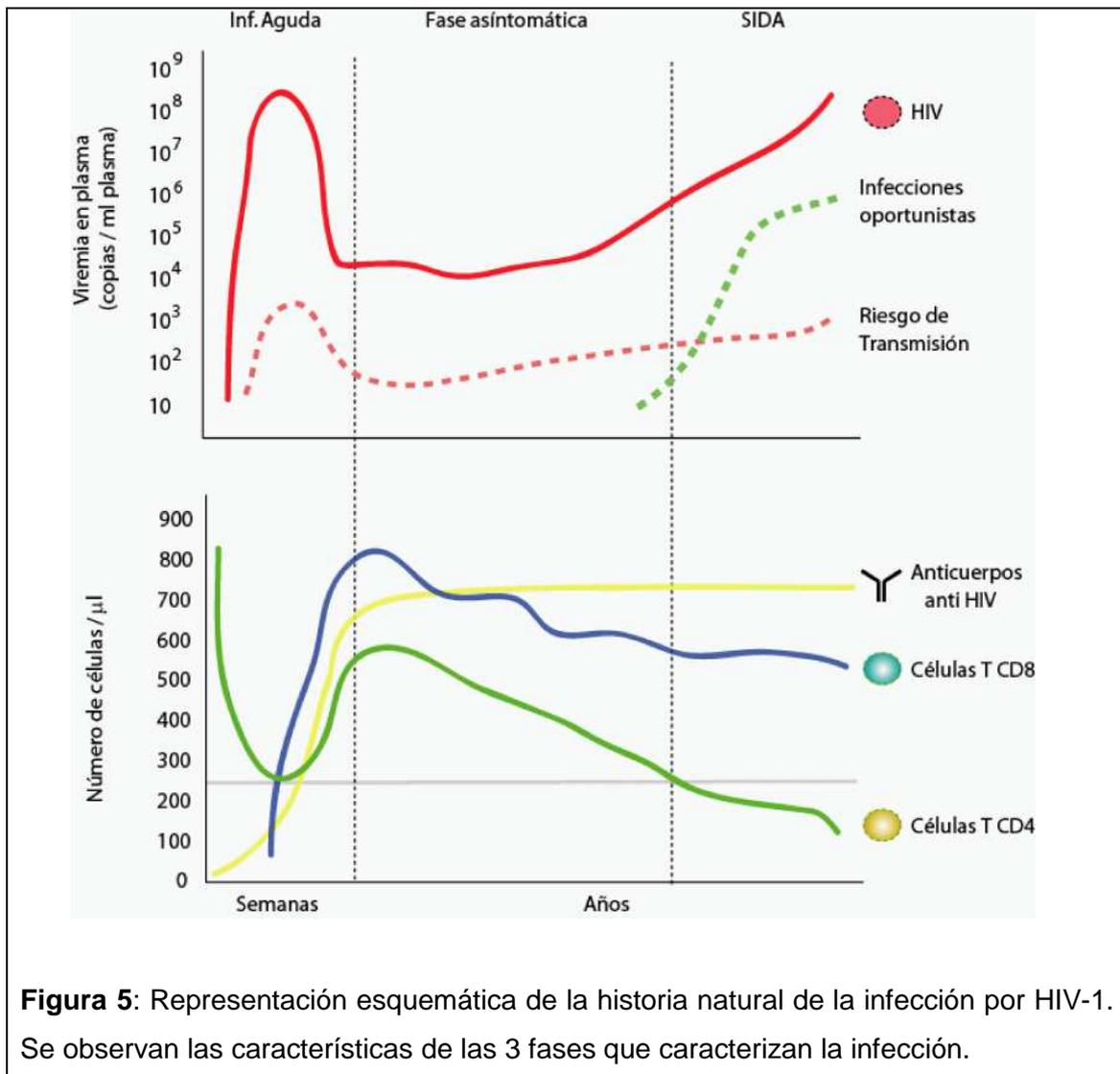
diseminación sistémica [25]. Aproximadamente en los 10 días siguientes, el virus se detecta a nivel sistémico en sangre y nódulos linfáticos y se observa el pico de viremia. Los títulos encontrados en la sangre pueden ser superiores a  $5 \times 10^3$  partículas infecciosas o  $10^7$  moléculas de ARN viral por ml de plasma, y las variantes predominantes utilizan el co-receptor celular CCR5. Generalmente esta viremia decae en unas pocas semanas, debido posiblemente a la respuesta inmune celular mediada por células, ya que el número de células T CD8 específicamente programadas aumenta antes de que los anticuerpos neutralizantes puedan ser detectados [26].

Luego de pocos meses, la viremia generalmente se reduce a niveles bajos, con pequeños picos oscilantes de virus. El grado de viremia en esta fase de la infección es un predictor directo de la rapidez de la progresión de la enfermedad. Durante la fase asintomática, la población viral se vuelve más heterogénea, probablemente por la aparición de variantes virales de escape a la presión de selección de la respuesta inmune, que se va modificando de manera continua.

En este período el número de células T CD4+ disminuye en un número promedio de 60 células/ $\mu$ l/año. Algunos autores han adjudicado este descenso al efecto directo del virus y/o la apoptosis debida a la inapropiada producción de citoquinas. En esta fase asintomática, que en promedio en una persona sin tratamiento antirretroviral dura 10 años, los niveles de células T CD8+ permanecen elevados, pero la replicación viral continúa, principalmente, en los nódulos linfáticos. Como en la fase aguda, en esta fase algunos autores observan que la propagación viral es suprimida por la acción antiviral de los

linfocitos T citotóxicos. Luego, hacia el final de este período el número de linfocitos disminuye más rápidamente.

Finalmente, en el último estadio de la infección el individuo desarrolla los síntomas del sida, que están caracterizados por un bajo recuento de células T CD4+ ( $< 200/\mu\text{l}$ ) y un aumento en la carga viral (Figura 5). También se observa una disminución en el número total de linfocitos T citotóxicos CD8+. En los nódulos linfáticos, la replicación viral aumenta con la consecuente destrucción de las células linfoides y la arquitectura normal del tejido linfoide. La replicación directa del virus o la estimulación crónica de la respuesta inmune podrían ser los causantes de esta degeneración del nódulo linfoide [27]. En este estadio, la población viral se vuelve relativamente homogénea y generalmente los aislamientos son variantes que utilizan el co-receptor CXCR4. Las propiedades, asociadas con el aumento de la virulencia, incluyen: la expansión del rango de hospedador celular, la habilidad para inducir la formación de sincicios, la cinética de replicación rápida y la citopatogenicidad en las células T CD4+. La degeneración del tejido linfoide y el agotamiento de la capacidad regenerativa de células T CD4+, debido a su activación crónica, llevan al colapso de la homeostasis del sistema inmune y a la aparición continua y descontrolada de infecciones oportunistas, características de las fases finales de sida.



**Figura 5:** Representación esquemática de la historia natural de la infección por HIV-1. Se observan las características de las 3 fases que caracterizan la infección.

### ***1.1.4.3. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL***

Las distintas etapas del ciclo replicativo como así también las enzimas virales han sido especialmente estudiadas como posibles blancos de drogas antirretrovirales. Entre las drogas utilizadas en el tratamiento antirretroviral se encuentran los inhibidores nucleosídicos (NRTI), no nucleosídicos (NNRTI) y nucleotídicos (NtRTI) de la transcriptasa reversa; los inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores de la fusión (FI), inhibidores de la integración (IIN) y más recientemente inhibidores de la maduración (IM).

Los NRTIs son análogos de los deoxinucleósidos modificados en la posición 3' del núcleo de desoxirribosa. Luego de la conversión a la forma trifosfato, compiten con los deoxinucleótidos naturales por la unión a la TR. Al ser incorporados dentro de la cadena de ADN recién sintetizada, producen la terminación de la misma. Los NRTIs pueden ser clasificados en dos subgrupos: análogos y no análogos de la timidina. La zidovudina (AZT) y la estavudina (d4T) pertenecen al primer subgrupo, mientras que la didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC) y abacavir (ABC) corresponden al subgrupo de no análogos de la timidina [28].

Los NNRTIs son inhibidores no competitivos de la TR que interfieren con la transcripción inversa mediante su unión cerca del sitio catalítico de la enzima. La principal limitación de los NNRTIs es el rápido desarrollo de resistencia tanto *in vitro* como *in vivo*. Dentro de esta familia se encuentran la nevirapina (NVP), efavirenz (EFV) y delavirdina (DLV) [29].

De los inhibidores nucleotídicos, el Tenofovir (TDF) es el único aprobado hasta el momento para uso clínico. Su mecanismo de acción es similar al de los inhibidores nucleosídicos, sólo que no necesita ser fosforilado para su activación [21].

A diferencia de estas drogas que actúan en la fase temprana del ciclo replicativo del HIV-1, los IP actúan en fases tardías del mismo, impidiendo la producción *de novo* de viriones infectivos. El mecanismo de acción de estos inhibidores se basa en el bloqueo de la PR viral, enzima necesaria para la producción de viriones maduros. Dentro de esta familia se encuentran el indinavir (IDV), el ritonavir (RTV), el nelfinavir (NFV), el saquinavir (SQV), el

amprenavir (APV) y fosamprenavir (fosAPV), entre otros. En secciones siguientes se discutirá más ampliamente sobre esta familia de antirretrovirales.

Además de estas drogas que actúan a nivel de la TR o la PR viral, los inhibidores de fusión bloquean distintas etapas de la fase de adsorción y fusión del virus y, por ende, inhiben la entrada del virus a la célula hospedadora. Los más reconocidos son Enfuvirtide (péptido T20), que actúa a nivel de gp41 y Maraviroc, inhibidor del co-receptor CCR5 [30]. Actualmente, varios inhibidores de fusión se encuentran en fase III para su aprobación (vicriviroc, PRO 140, Ibalizumab) [31,32].

Alternativamente, se ha aprobado el uso de un IIN, Raltegravir, cuyo mecanismo de acción consiste en prevenir la unión covalente de la enzima viral con el ADN del hospedador, paso esencial para la transferencia del ADN viral al genoma celular [33,34].

Por último, el análisis de las últimas etapas de maduración del virión, ha llevado al desarrollo de drogas inhibitorias de este proceso. Tal es el caso del Bevirimat, droga que se une a Gag, bloqueando el clivaje del sitio CA- SP1, produciendo virus no infectivos [35]. Sin embargo, esta droga aún no ha sido aprobada para su uso clínico.

Dado que los inhibidores nucleosídicos, no nucleosídicos y nucleotídicos de la TR y los IP actúan en etapas diferentes de la replicación viral, existe una base racional para el uso de ambas clases de drogas en forma conjunta con el fin de alcanzar un efecto inhibitorio mayor contra la replicación del virus. Esta es la base de la terapia de alta eficacia o terapia combinada (HAART: *Highly Active Antiretroviral Therapy*), la cual logra restaurar la función inmune y reducir la carga viral a niveles indetectables, con menor probabilidad de seleccionar

variantes resistentes. Desde la instrumentación de las terapias HAART en la clínica, se ha logrado aumentar significativamente tanto la calidad como la expectativa de vida de las personas infectadas [36].

En la tabla 1 se resume las drogas disponibles para el tratamiento de la infección.

**Tabla 1: Drogas antirretrovirales**

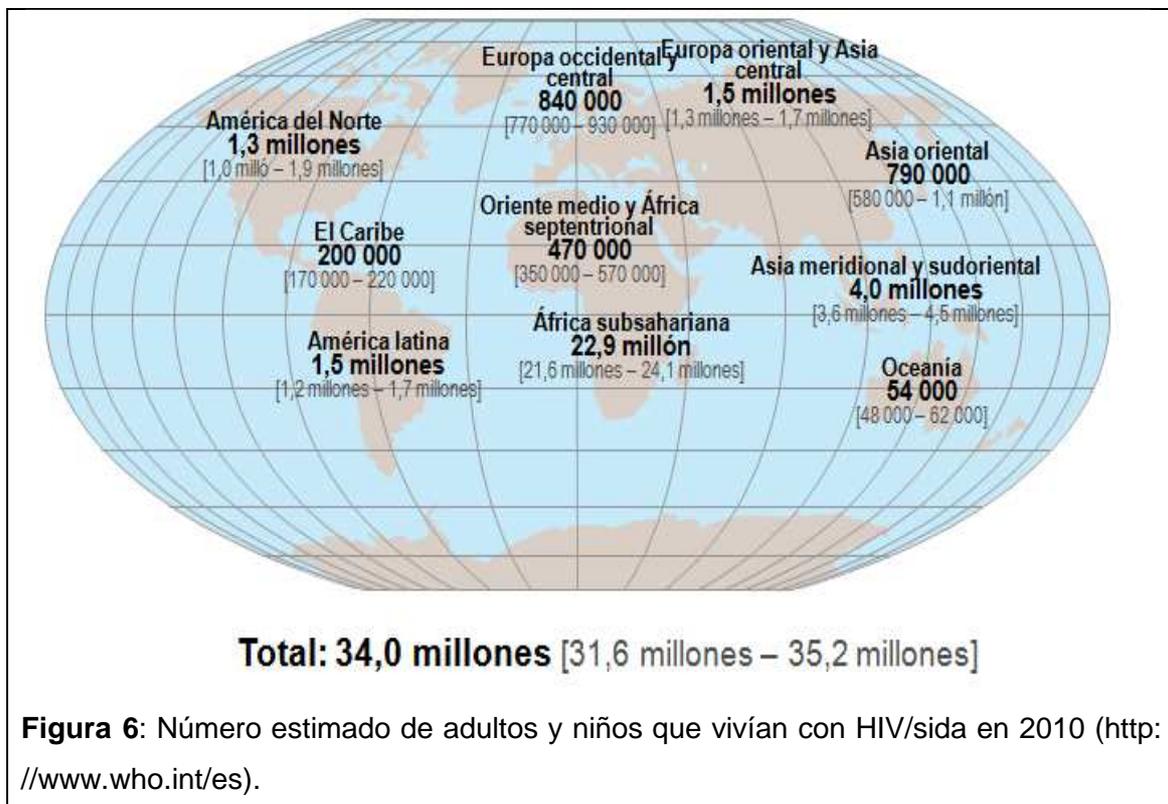
<b>Blanco terapéutico</b>		<b>Drogas aprobadas para su uso</b>
<b>Transcriptasa reversa</b>	Inhibidores nucleosídicos	Abacavir (ABC), Lamivudina (3TC), Didanosina (ddl), Zidovudina (AZT), Estavudina (d4T), Zalcitabina (ddC)
	Inhibidores nucleotídicos	Tenofovir.
	Inhibidores no nucleosídicos	Efavirenz, Nevirapina, Lovirida, Delavirdina
<b>Proteasa</b>	Inhibidor de proteasa	Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir, Lopenavir/ Ritonavir (KALETRA), Amprenavir, Indinavir, fosamprenavir.
<b>Integrasa</b>	Inhibidor	Raltegravir
<b>Maduración</b>	Inhibidores de la maduración	Bevirimat <small>(no aprobada para su uso clínico)</small>
<b>Entrada</b>	Inhibidores de la fusión	Enfuvirtide (T20), maraviroc.

## ***1.2. Epidemia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I***

### ***1.2.1. Epidemiología del HIV-1 en el mundo***

El último reporte de la Organización de las Naciones Unidas para la Lucha contra el sida (ONUSIDA) indica que, hasta diciembre de 2010, entre 31,6 y 35,2 millones de personas viven con sida en todo el mundo (Figura 6). Durante el 2013, se produjeron 2,7 millones de nuevas infecciones y el número de muertes alcanzó los 1,8 millones [37].

El 68% de las personas afectadas por el HIV/sida se concentra principalmente en la región de África subsahariana, conformando el epicentro de la pandemia [38] [39].



En Asia la epidemia parece haberse estabilizado en los últimos años, aunque en algunos países, como Pakistán, ha aumentado la incidencia debido al uso de drogas inyectables.

También, en Europa del Este y Asia Central, el número de personas viviendo con HIV se ha triplicado desde el año 2000 debido al uso de drogas inyectables.

El Caribe muestra prevalencias variables según el país, siendo Cuba el país con la menor prevalencia (0,1%) y Bahamas la más alta (3,1%) de la región. Junto con África subsahariana, son las únicas dos regiones del mundo donde el número de mujeres infectadas supera al de los hombres.

En América del Norte, Europa Central y del Oeste la prevalencia continúa aumentando principalmente debido al sexo sin protección en Hombres que tienen sexo con Hombres (HSH), aunque el uso de drogas inyectables y el sexo comercial sin protección también contribuyen a esta tendencia.

Oriente Medio y Norte de África muestran prevalencias, nuevas infecciones y muertes relacionadas al sida en aumento.

En Oceanía, donde la prevalencia es baja, el número de personas infectadas se ha duplicado desde 2001 pero el número de nuevas infecciones está en disminución desde ese mismo año. En esta región, la epidemia está impulsada principalmente por la transmisión sexual.

La epidemia en América Central y del Sur ha variado poco en los últimos años. El número de personas infectadas continúa aumentando debido a la baja disponibilidad de tratamiento antirretroviral. La mayoría de las epidemias en esta región se concentran principalmente en HSH. Un tercio de las personas infectadas en esta región vive en Brasil [40].

## ***1.2.2. Historia de la epidemia de HIV/ sida en Argentina***

Los primeros casos de sida en la Argentina fueron informados al Ministerio de Salud de la Nación a fines del año 1982 y correspondían a individuos masculinos que presentaban como antecedente el haber mantenido relaciones sexuales con hombres en las ciudades de Nueva York, Miami o San Francisco. Estos individuos presentaron características clínicas y epidemiológicas semejantes a las que se describían en el resto del mundo [41]. En el año 1987, ante el aumento de casos detectados, fue necesario establecer un marco formal, dentro del ámbito de la salud pública, donde pudiera coordinarse el área de HIV/sida, creándose entonces el Programa Nacional de sida y Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS), sobre el ya existente Programa de ETS. Este Programa es el organismo responsable del análisis de la situación y tendencia de la epidemia en todo el ámbito nacional y, sus resultados, son periódicamente publicados en el Boletín sobre sida en la Argentina.

La epidemia de HIV en Argentina, como en casi todos los países latinoamericanos, continúa siendo de tipo “concentrada”, es decir, la proporción de personas infectadas en la población joven y adulta es menor al 1%, pero mayor al 5% en algunos subgrupos: hombres que tienen sexo con hombres (HSH), mujeres y hombres trabajadores sexuales (MTS y HTS, respectivamente), trans (travestis, transexuales y transgénero) y usuarios de drogas inyectables (UDIs) [42].

A través de estudios de prevalencia, se estima que en la Argentina viven actualmente alrededor de 140 mil personas infectadas, la mitad de las cuales

desconoce su estado serológico. Respecto a la incidencia, ésta se ha mantenido constante en los últimos años con alrededor de 5000 nuevos diagnósticos de infección por año. La tasa de mortalidad relacionada al sida también se ha mantenido estable con un valor de 35 por millón de habitantes desde la implementación de la triple terapia en 1996.

La epidemia se concentra principalmente en las ciudades capitales del país, con un 70% de la población infectada residiendo en la provincia de Buenos Aires, ciudades de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe [43].

La razón hombre/mujer en infecciones por HIV es estable desde mediados de la década y se ubicó en 1,7 varones por cada mujer diagnosticada en el período 2007-2009.

Las relaciones sexuales sin protección se han consolidado en los últimos años como la principal vía de transmisión. En el período 2007-2009, el 88% de los varones y el 84% de las mujeres diagnosticadas se habían infectado por esta vía. En el caso de los hombres, el 49% lo hizo en una relación heterosexual, en tanto el 36% en una relación sin protección con otro hombre. Además, desde 2000 tanto las transmisiones por uso compartido de material para consumo de drogas inyectables, como las de transmisión vertical, continúan disminuyendo [42].

### ***1.2.3. Conductas de riesgo y vulnerabilidad a la infección por HIV-1***

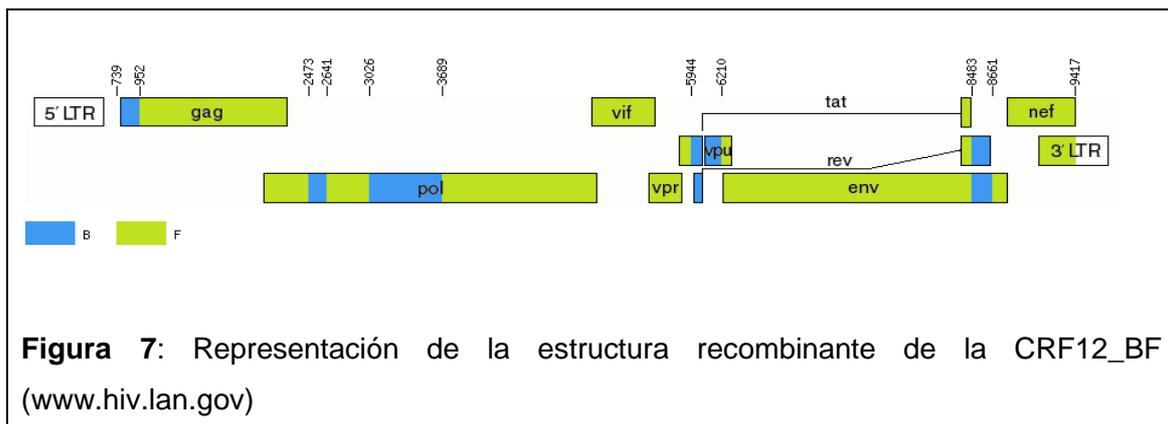
La epidemia de HIV/sida está fuertemente vinculada con la conducta de las personas, lo cual hace que el análisis de toda la población como un grupo homogéneo dificulte la comprensión real del problema.

De acuerdo a la definición de ONUSIDA, la vulnerabilidad es consecuencia de factores sociales que influyen negativamente en la capacidad del individuo para ejercer control sobre su propia salud [44]. De acuerdo a esta definición, se destacan como grupos vulnerables a la infección por HIV los HSH, los hombres, mujeres y trans, TS, los UDIs y los pacientes con infecciones de transmisión sexual (ITS). Estudios realizados por el Centro Nacional de Referencia para el Sida (CNRS) desde 1998 a 2011 mostraron alta seroprevalencia de HIV en estos grupos: 10,3- 13,8% en HSH [45,46], 1,9- 3,2% MTS [45,46], 44,3% en UDIs [47], 6,3% usuarios de cocaína no inyectable (UCNIs) [48], 17,1% en pacientes con tuberculosis [49], 7,2% en pacientes que asistieron a hospitales de Buenos Aires por consultas de ITS [50]. Además, En estos estudios además la incidencia observada en estos estudios fue de 6,33 en HSH, 1,65 en hombres UD, 2,72 en mujeres UD, 2,15 en HTS, 0,62 en MTS, 11,31 en trans TS y 0,05 en mujeres embarazadas por 100 por persona por año [46]. Estos resultados demuestran que, a más de 10 años del inicio de la epidemia HIV/sida en Argentina, el grupo de HSH mantiene una tasa significativamente alta de prevalencia e incidencia y el grupo trans (travestis, transexuales y transgénero) es un grupo altamente sensible a esta epidemia con valores de tasas de prevalencia e incidencia jamás descriptos antes en nuestro país [51].

## ***1.2.4. Caracterización molecular de HIV en Argentina***

En nuestro país, a partir de la década del 90 se comenzó a analizar la epidemiología molecular de las poblaciones virales circulantes en la región. En un primer trabajo, Gómez Carrillo et al (1992) analizaron la región variable V3 de gp120 en muestras obtenidas entre los años 1989 y 1990. Todas las secuencias obtenidas en esa oportunidad correspondieron a subtipo B [52]. Sin embargo, poco tiempo después, se empezaron a describir las primeras secuencias de recombinantes BF en Argentina [53,54].

En el año 2001, la secuenciación del genoma completo de muestras de Argentina y Uruguay llevó a la caracterización de la Forma Recombinante Circulante 12\_BF (CRF12\_BF) [55]. Esta CRF posee una estructura predominantemente de subtipo F con cinco segmentos de subtipo B y se considera que es el prototipo de las recombinantes BF en Argentina, no sólo porque fue la primera en ser descrita sino también por su frecuencia en nuestro país (Figura 7).



Las recombinantes BF se encuentran casi exclusivamente en Sudamérica o en países europeos con los que existe intercambio social y cultural, como España e Italia [56,57]. En Sudamérica, además de la CRF12\_BF, se han descrito las

CRF28, CRF29, CRF39, CRF40\_ BF y CRF46\_BF en Brasil [58,59,60], CRF17\_BF en Argentina, Bolivia, Uruguay, Perú y Paraguay [55] y CRF38\_BF en Uruguay [61].

En un trabajo reciente, Aulicino *et al* (2011) observaron una disminución significativa en la frecuencia de niños infectados con CRF12\_BF y una alta frecuencia de Formas Recombinantes Únicas BF (URF\_BF) en esta población. Estas URFs comparten varios puntos de recombinación con la CRF12\_BF pero poseen segmentos de subtipo B de mayor extensión, lo que sugiere que se habrían originado por eventos sucesivos de recombinación entre recombinantes CRF12\_BF y variantes de subtipo B puro.

A principios de la epidemia en nuestro país, se observó un patrón complejo con predominio de subtipo B en poblaciones de HSH y de formas recombinantes BF en hombres y mujeres heterosexuales (HS) y UDIs [62]. Esta distribución diferencial entre subtipo B puro y recombinantes BF fue haciéndose más compleja en los últimos años, debido a estudios en poblaciones vulnerables a las que sólo recientemente se ha podido acceder [51,63]. Sin embargo, esta distribución aún puede observarse en los últimos estudios de prevalencia e incidencia. No obstante, el análisis de la dinámica de las poblaciones virales en estas poblaciones continúa siendo difícil y sólo se han podido realizar estudios transversales en ellas.

### ***1.2.5. Infecciones múltiples en individuos infectados con HIV-1***

En 1987 se describió la sobreinfección de chimpancés con una cepa distinta de HIV-1, de 6 a 15 meses posteriores a la primoinfección; y en África la infección doble con HIV-1 y HIV-2 [64,65] en humanos, con una prevalencia de 24% en trabajadoras sexuales de Costa de Marfil [66]. A pesar de esto, la posibilidad de una sobreinfección con HIV-1 no fue tomada en serio durante mucho tiempo. Se asumió que una infección inicial con HIV-1 podría proteger contra una segunda infección, como lo podría hacer una hipotética vacuna. Posteriormente, la presencia y predominancia de formas recombinantes detectadas mundialmente, dieron los primeros indicios de que las sobreinfecciones con HIV-1 ocurren frecuentemente, puesto que las formas recombinantes sólo pueden originarse a partir de la co-infección con dos variantes diferentes [67,68]. La sobreinfección puede ocurrir durante la infección primaria, antes de que la respuesta inmune esté completamente desarrollada (co-infección) o como re-infección con una nueva variante después de haberse establecido la infección crónica con la primera variante (sobreinfección/infección doble) [69]

Se han detectado casos de infecciones con tres cepas distintas de HIV-1, dos en África y dos en Europa [70]. En estos cuatro casos se detectaron variantes recombinantes, lo que demuestra la importancia de las infecciones múltiples para favorecer la diversidad del HIV-1. Aunque la frecuencia y consecuencias clínicas de las sobreinfecciones no han sido completamente dilucidadas aún, su importancia en la variabilidad del HIV-1 parecería ser comparable a la

generada por la elevada tasa de mutación de la polimerasa viral [71,72]. Además, tanto modelos matemáticos [73,74] como estudios epidemiológicos [75] demuestran que aún una incidencia limitada de sobreinfecciones podría, sin embargo, llevar a una alta prevalencia de recombinantes.

Estudios iniciales de infecciones dobles parecían indicar que se trataba de un fenómeno poco frecuente [76,77] y que la sobreinfección ocurría generalmente dentro de los primeros meses de la primoinfección [78]. Sin embargo, estudios más recientes mostraron que los eventos de sobreinfección podrían producirse mucho tiempo después de la infección inicial [79] y aún en presencia de anticuerpos neutralizantes [80]. Estos hallazgos tendrían implicancias directas en las estrategias de inmunización activa para el HIV-1, ya que una respuesta inmune completamente establecida no brindaría protección frente a una nueva exposición al virus [81].

Los primeros reportes de infecciones dobles fueron asociados con una progresión clínica acelerada de la enfermedad, analizada mediante carga viral y recuento de linfocitos T CD4+ [68]. Posteriormente, en un estudio que evaluó las características de pacientes no progresores a largo plazo, fueron encontrados casos de infecciones dobles [82]. Por lo tanto, se desconoce aún si la sobreinfección acelera la progresión a sida de los pacientes re-infectados y, si así fuera, cuáles serían los mecanismos subyacentes, tanto virales como genéticos del hospedador.

Otro aspecto al que se ha prestado interés creciente es la importancia de la sobreinfección en la evolución de la resistencia a drogas antiretrovirales (ARVs), ya que un evento de sobreinfección podría permitir la generación de cepas multirresistentes. En general, se asume que la incidencia de

sobreinfecciones en individuos infectados bajo tratamiento ARV es baja [83]. Sin embargo, se han detectado casos durante interrupciones de tratamiento [68,84]. Esto podría deberse a que la respuesta inmune al HIV-1 disminuye durante la terapia, o por la falta de protección de drogas ARV. Se han reportado numerosos casos de sobreinfecciones que abarcan virus resistentes al tratamiento [78], en algunos de ellos cepas multirresistentes [83].

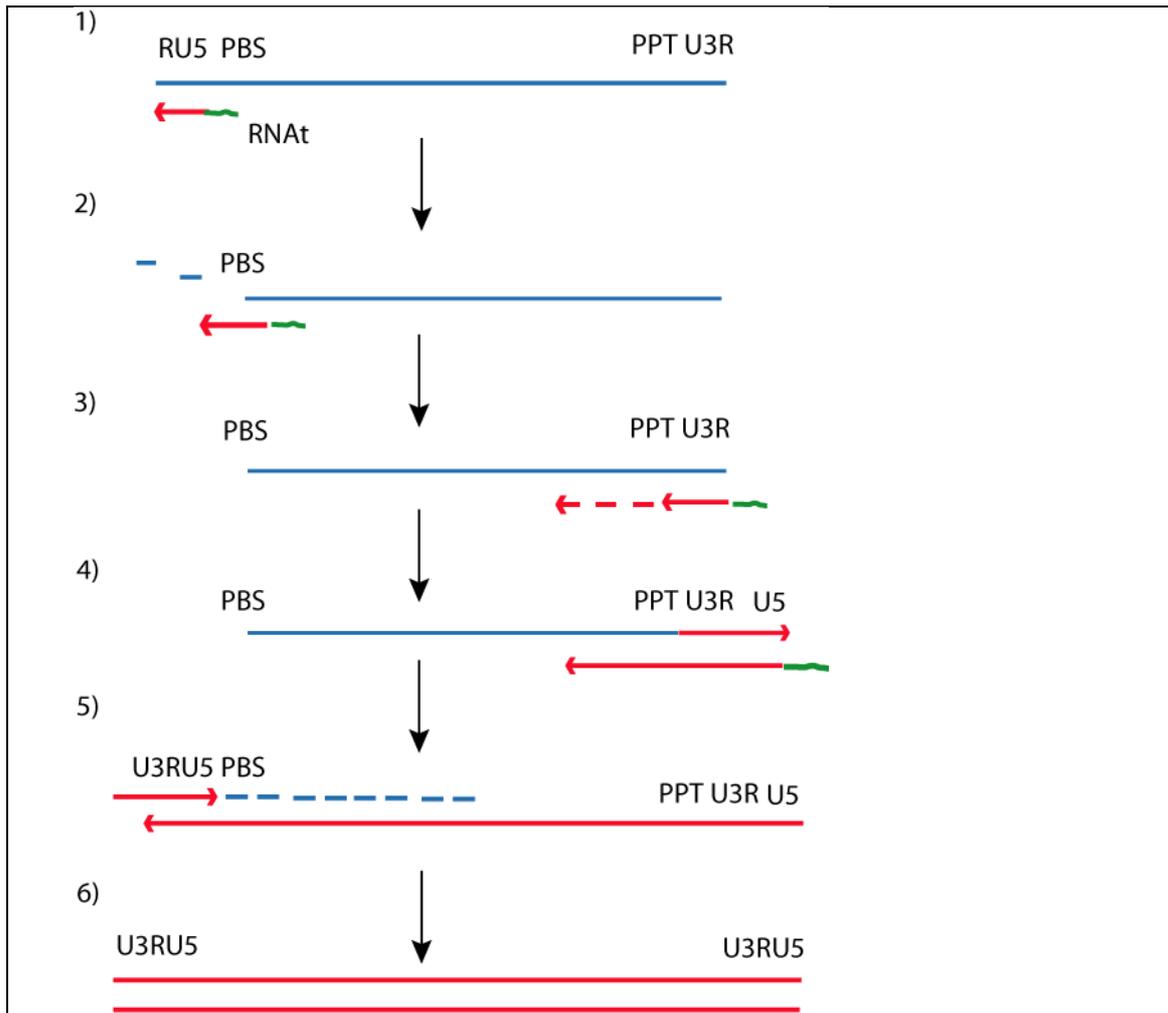
La existencia de formas recombinantes circulantes locales y el aumento en la frecuencia de URFs en nuestro país, habla por sí misma de la existencia de infección doble y de lo frecuente que ésta podría ser en nuestro país. Sin embargo, no se ha realizado aún una búsqueda sistemática de infecciones dobles en esta población, a pesar de la alta probabilidad de re-infección que posee y de sus consecuencias, en el curso de la enfermedad de estos individuos.

## ***1.3. Formas recombinantes del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1***

### ***1.3.1. Transcripción reversa y recombinación***

El proceso de transcripción inversa en el HIV-1 requiere que la TR realice dos “saltos” obligatorios entre los templados de ARN genómico (ARNg). Un provirus generalmente contiene en sus extremos dos bloques idénticos de secuencias, conocidos como LTRs. Cada LTR puede ser dividido en 3 regiones, la región 3' única (U3), repetición (R) y la región 5' única (U5). La secuencia del ARNg es más corta que la del provirus, dado que carece de las regiones 5'U3 y 3'U5. Debido a que el promotor viral se localiza en la región 5'U3, la expresión del ADN viral depende del proceso de transcripción inversa para reconstituir los LTRs.

La transcripción inversa comienza cerca del extremo 5' del ARN viral, usando como cebador un ARNt (ARN de transferencia) de la célula hospedadora, complementario a la región denominada PBS (*Primer binding site*, sitio de unión del cebador) (Figura 8). Dado que la molécula de ARN viral es de sentido positivo, la cadena naciente de ADN es de polaridad negativa. La TR transcribe una región corta del ARN viral que incluye las regiones 5' U5 y 5' R y luego, gracias a su actividad Rnasa H, degrada específicamente el ARN que fue usado como templado. La degradación del ARN deja expuesta la región 5' R que se aparea con la región complementaria 3' R en el extremo 3' de la molécula de ARN; este paso constituye el primer “salto” de la TR [21] (Figura 7, paso 3).



**Figura 8:** Transcripción inversa del genoma de HIV. Detalle del proceso requerido para completar el proceso. Azul, ARN; rojo, ADN; verde, ARNt. Las flechas indican la dirección de la síntesis de ADN y las líneas entrecortadas la degradación del ARN. Representación adaptada de [85].

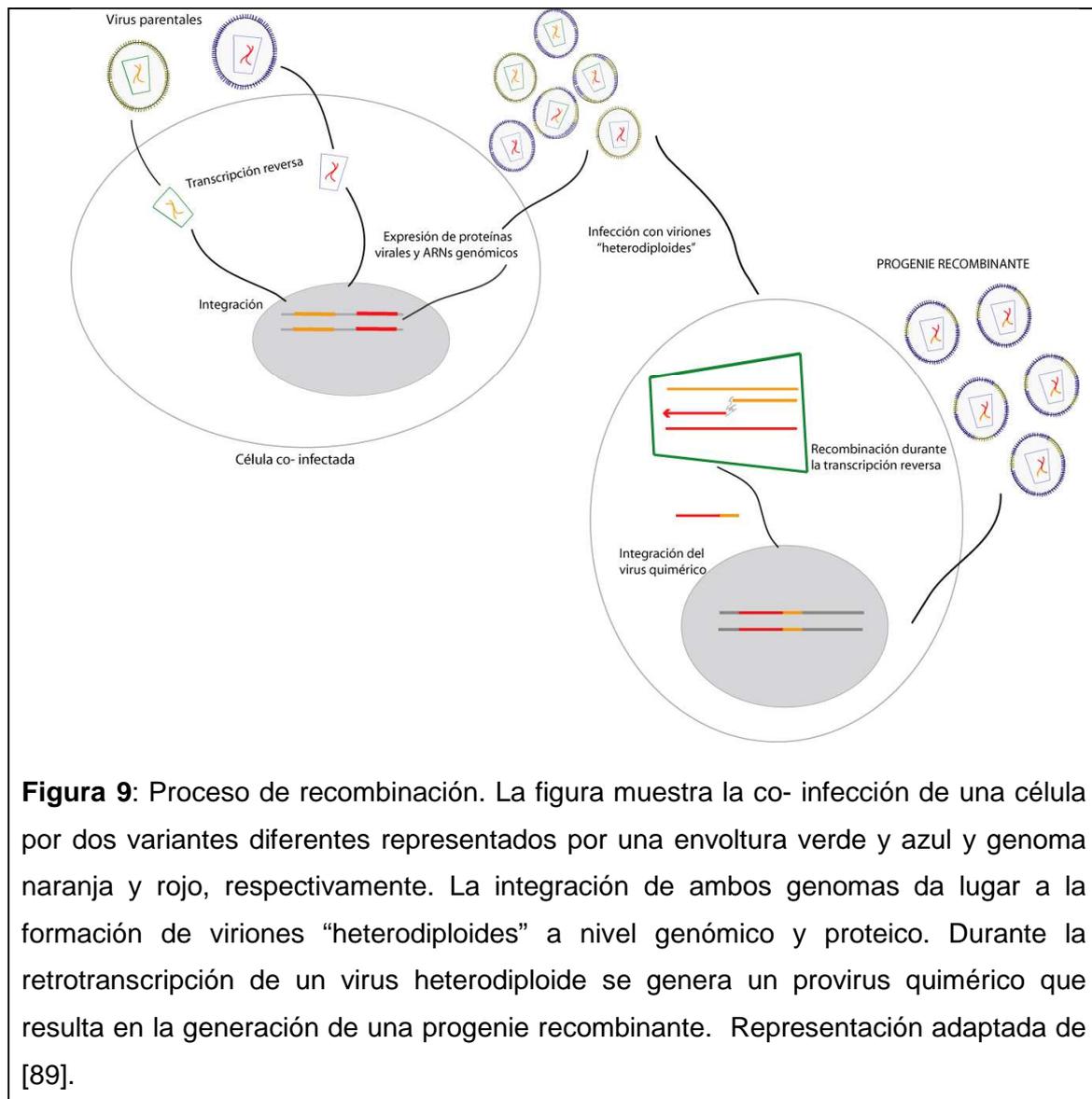
Se ha demostrado que durante este primer salto, la molécula de ADN puede transferirse tanto a la misma molécula de ARN (transferencia intramolecular) como a la otra molécula de ARN empaquetada en el virión (transferencia intermolecular) [86]. Una vez que la TR llega a una región denominada PPT (*polypurine tract*, tracto de polipurinas) comienza la síntesis de la segunda cadena de ADN, utilizando esta región como cebador y copiando la región 3' LTR junto con una porción del ARNt. Posteriormente, la TR realiza el “segundo

salto”, obligatorio para completar la transcripción inversa, usando la región complementaria entre la cadena positiva de ADN y la región PBS de la cadena negativa de ADN [85].

Se ha propuesto que para poder realizar éstos “saltos” entre los templados de ARN la TR evolucionó hacia una menor afinidad por el templado y una menor procesividad [87]. Esta característica del proceso de transcripción inversa permite que al tener que realizar los “saltos” entre cadenas de ARN, la TR pueda transferir la cadena nascente de ADN a una molécula diferente de ARN, produciéndose la recombinación. La recombinación se origina a partir de dos virus diferentes que co-infectan una misma célula y emergen como partículas heterodiploides. Luego de una nueva infección, la TR “salta” entre los genomas heterólogos de una misma partícula viral durante la síntesis, tanto de la cadena (+) como (-) de ADN, y produce un genoma proviral quimérico (Figura 9). Se estima que la frecuencia de “saltos” de la TR entre templados de ARN altamente similares sería entre  $3 \times 10^{-4}$  y  $1,4 \times 10^{-3}$  eventos por nucleótido, equivalentes a 3-12 cambios de templado por replicación de genoma [23]. Como consecuencia, la recombinación puede combinar, en un solo ciclo replicativo, sustituciones nucleotídicas que caracterizan un aislamiento viral con respecto al otro. Por lo tanto produce “atajos evolutivos”, combinando mutaciones pre- existentes en virus individuales [88].

Para la formación de recombinantes funcionales el HIV cumple con tres requisitos fundamentales: (i) los dos virus parentales son capaces de infectar el mismo individuo y la misma célula, (ii) los diferentes ARN virales son capaces de formar un dímero funcional durante el ensamblaje del virión, y por último (iii)

las proteínas virales quiméricas ensamblan de modo que dan origen a un virión funcional [89].



**Figura 9:** Proceso de recombinación. La figura muestra la co- infección de una célula por dos variantes diferentes representados por una envoltura verde y azul y genoma naranja y rojo, respectivamente. La integración de ambos genomas da lugar a la formación de viriones “heterodiploides” a nivel genómico y proteico. Durante la retrotranscripción de un virus heterodiploide se genera un provirus quimérico que resulta en la generación de una progenie recombinante. Representación adaptada de [89].

La recombinación en HIV-1 ha sido demostrada entre grupos [90], subtipos [91,92] y entre aislamientos de un mismo subtipo [93].

Hasta el momento más de 40 CRFs y 100 URFs han sido descritas y el 20% de las 33 millones de personas HIV+ están infectadas con recombinantes, lo que demuestra que: (i) la recombinación entre subtipos de HIV-1 es un medio altamente eficiente para aumentar la variabilidad del virus y (ii) personas

infectadas con el virus deben haber estado infectadas con más de una variante, solapadas en el tiempo (co o sobre- infección) [94,95]. Estas CRFs y URFs podrían evadir la respuesta a una vacuna basada en subtipos puros e incluso acelerar la generación de variantes resistentes a drogas antiretrovirales [95]. Sin embargo, las causas del éxito epidemiológico de las formas recombinantes es un interrogante que permanece sin respuesta. Un punto crucial para entender el aumento en la frecuencia de infecciones con recombinantes es si estos recombinantes son el producto de deriva génica o si poseen una ventaja replicativa, y si es así, cuál es la clave de esta ventaja.

Otro aspecto a considerar en relación a los cambios genómicos que conlleva la recombinación, es la tolerancia genética del HIV-1 a los mismos. Si el cambio constante en la secuencia genómica es sinónimo de adaptabilidad a los cambios en el ambiente, el virus del HIV es, ciertamente, un ejemplo remarcable de este fenómeno. La posibilidad de pérdida de función frente a los cambios generados no sólo por la recombinación sino también por la alta tasa de mutación de la TR y la alta tasa de replicación del virus, se equilibra entonces con una flexibilidad genética intrínseca significativa [23].

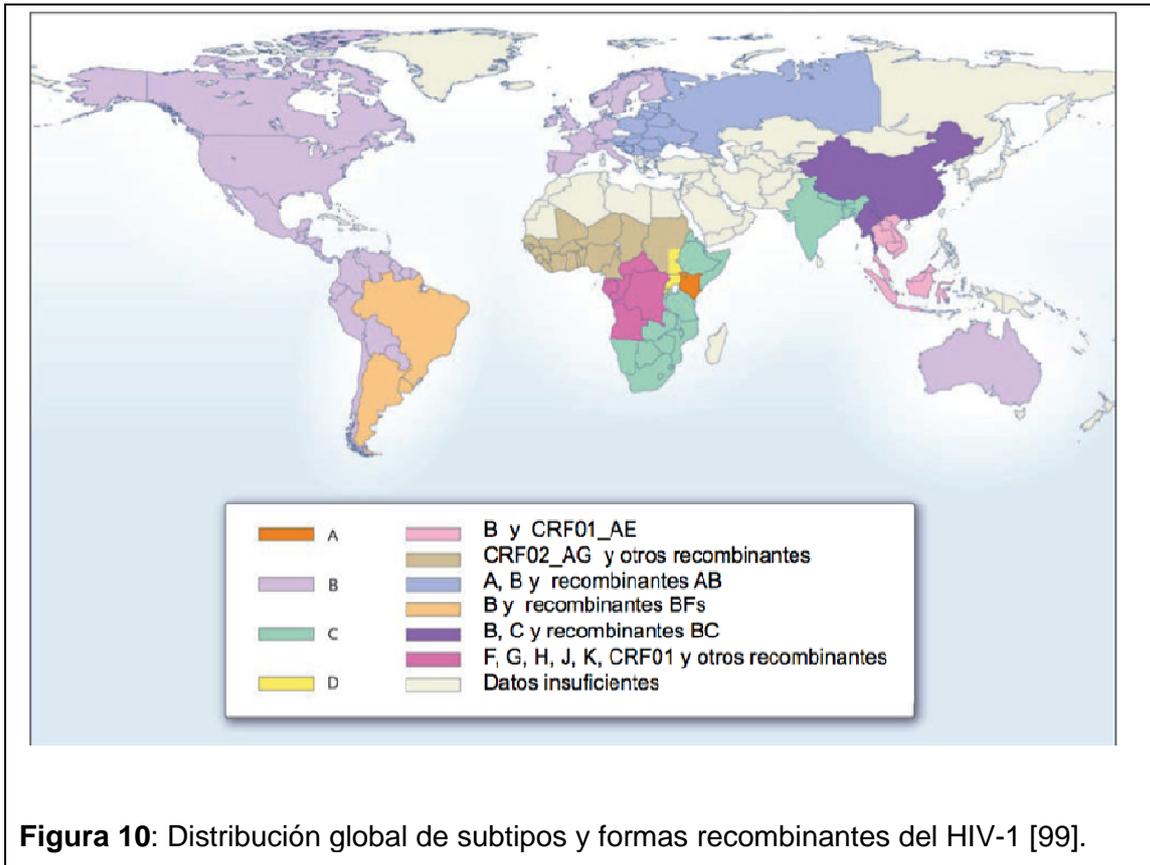
La presencia de variaciones espaciales en la frecuencia de recombinación sugiere que los puntos de recombinación no están distribuidos uniformemente y que por lo tanto tienden a agruparse en *clusters* de “puntos calientes”, dejando otras regiones “frías” intactas [96,97]. Esta observación también implica que la recombinación tiene un efecto altamente relevante en el *fitness* del virus, pudiendo su efecto ser deletéreo.

### ***1.3.2. Diversidad del Virus de la Inmunodeficiencia Humana***

La diversidad del HIV es la resultante de tres fuerzas que actúan en forma independiente: alta tasa de replicación, introducción frecuente de mutaciones y recombinación [71].

Actualmente se conocen dos tipos de HIV, HIV-1 de distribución mundial y HIV-2 endémico de la región oeste de África. A su vez, el HIV-1 ha sido clasificado en 4 grupos, M, N, O y P. Los tres primeros habrían surgido por saltos zoonóticos independientes del chimpancé al humano, que llevaron a la propagación desproporcionada del virus [98], mientras que el grupo P estaría relacionado al virus de la inmunodeficiencia del gorila [10].

Desde su introducción a la población humana, el grupo M del HIV-1 ha sido el de mayor distribución mundial y diversidad, integrado por, al menos, 9 subtipos o grupos filogenéticos denominados A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K (Figura 10) ([www.hivlan.gov](http://www.hivlan.gov)). El grado de variación genética entre secuencias de un mismo subtipo es de aproximadamente 15-20%, mientras que, entre secuencias de distintos subtipos es de 25-35%. La diversificación del virus no solo llegó a grupos, sino que la aparición de mosaicos genómicos hizo evidente una característica propia del HIV: la posibilidad de recombinación. Este fenómeno ha dado origen a más de 40 CRFs y 100 URFs, refiriéndose a recombinantes que han establecido formas recurrentes y transmisibles en la población y recombinantes que han sido identificadas en un solo individuo, respectivamente.



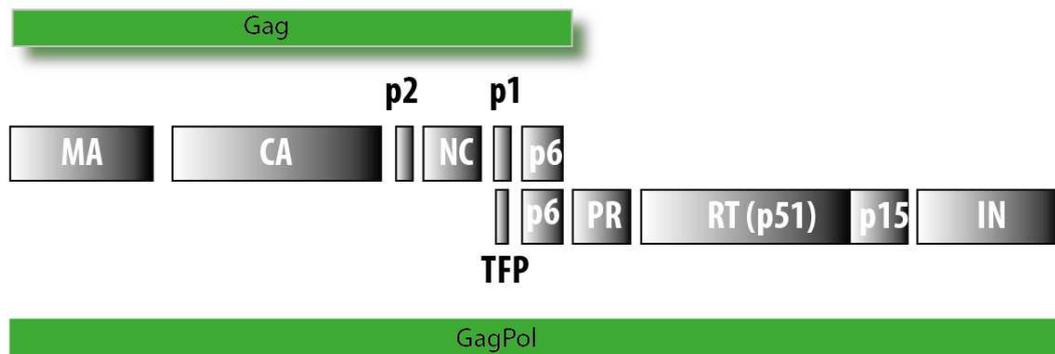
Hasta el momento, la mayor diversidad del HIV se encuentra en África Central y Occidental, probablemente por ser el lugar geográfico de origen de la epidemia. A pesar de la gran capacidad de dispersión del virus, el 90% de la epidemia se debe a la expansión de 4 subtipos (A, B, C y D) y 2 CRFs (CRF01\_AE y CRF02\_AG) (Figura 10). El subtipo C, predomina en África del Sur, Central y Este, India y China. El subtipo B es el que predomina en América, Europa Occidental y Oceanía. Sin embargo, debido a migración, varios subtipos No B están comenzando a circular en estas regiones. Aproximadamente el 50% de las infecciones en el mundo se deben al subtipo C, seguidas por subtipo A, B, G y D, que representan el 12, 10, 6 y 3% de las infecciones a nivel mundial, respectivamente. Los subtipos F (F1 y F2), H, J y K representan aproximadamente el 1% de las infecciones [100]. Esta distribución geográfica de subtipos probablemente reflejaría consecuencias de efecto

fundador, migraciones de poblaciones humanas y prevalencia de determinadas rutas de transmisión [101,102].

Con respecto al HIV-2, éste se diferencia en los subtipos A, B, C, D y E, siendo el A y el B los más frecuentes. Las infecciones por HIV-2 fuera de África Oriental y el Caribe son poco frecuentes, aunque se han notificado casos aislados en el resto del mundo, incluso en Argentina [103,104].

### ***1.3.3. Región genómica Gag y GagPol de HIV-1***

*gag* es uno de los tres genes principales que definen a la familia de los Retrovirus. La poliproteína codificada por éste gen, Gag (Pr55<sup>Gag</sup>), es la principal proteína estructural no sólo de HIV-1 sino también de todos los retrovirus y conforma aproximadamente el 50% de la masa total de la partícula viral. Además, su expresión es necesaria y suficiente para la formación de VLPs (Partículas semejante a virus, *Viral like particle*) no infecciosas aún en ausencia de otros componentes virales (ARN y proteínas) [105]. *pol* es el segundo gen característico de la familia y codifica para las tres enzimas virales, PR, TR e IN. Gag y Pol son traducidas a partir de un mismo transcrito de 9 kb gracias a un cambio de -1 en el marco de lectura. Como resultado, aproximadamente el 5% de los transcritos de 9 kb se traducen a la poliproteína GagPol (Pr160<sup>GagPol</sup>) mientras que el 95% a Gag (Figura 11) [106]. Una vez traducidas, Gag y GagPol son transportadas hasta la membrana celular donde son incorporadas al virión a una razón 20:1 junto con dos copias del ARN viral.



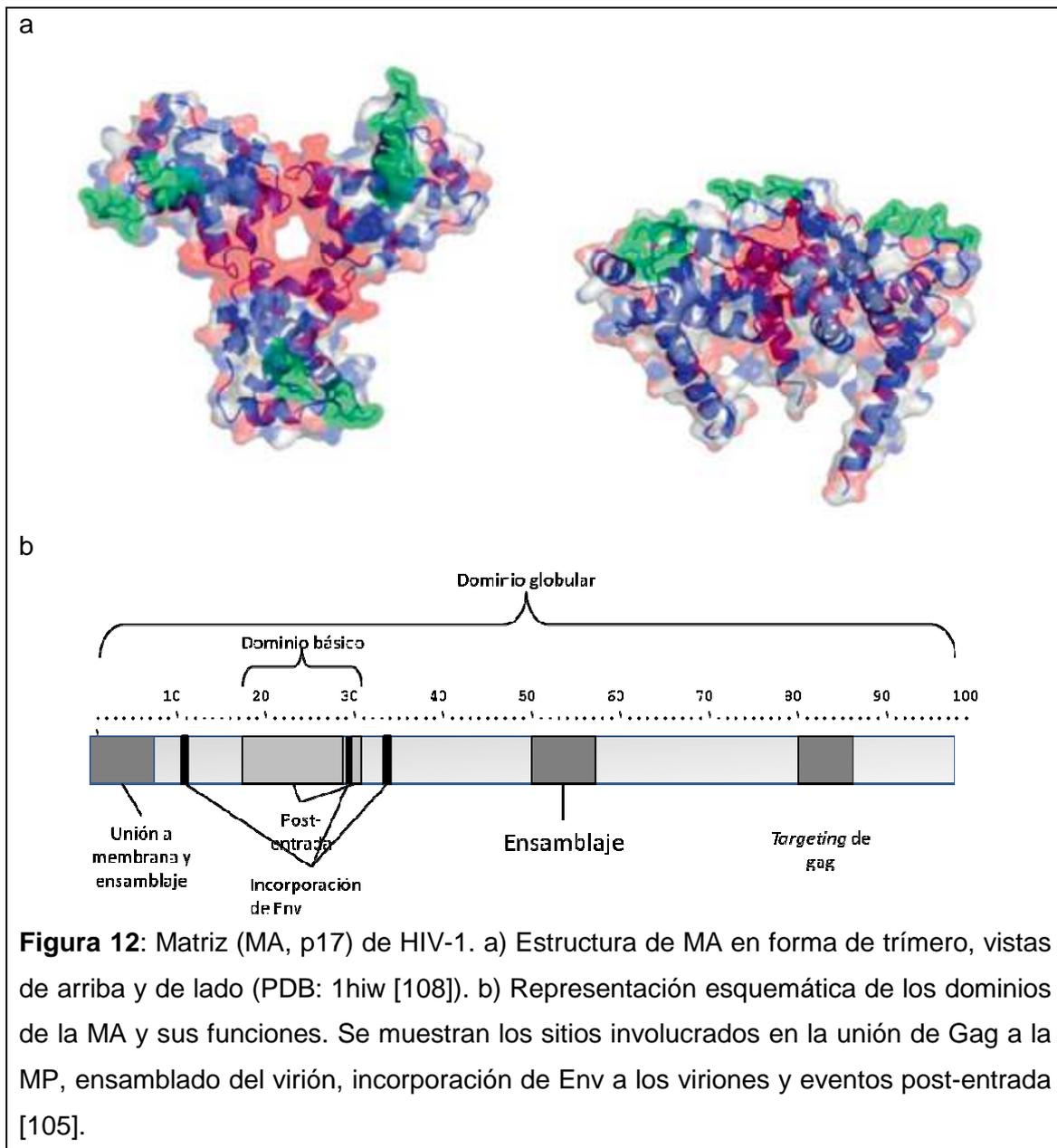
**Figura 11:** Representación esquemática de las poliproteínas Gag (Pr55<sup>Gag</sup>) y GagPol (Pr160<sup>GagPol</sup>). Ambas son traducidas a partir de un transcrito de 9 kb, la producción de GagPol se consigue gracias a un cambio de -1 en el marco de lectura de dicho transcrito.

### ***1.3.3.1. Características estructurales y funcionales de Gag y GagPol***

#### ***1.3.3.1.A. Dominios de Gag***

##### ***1.3.3.1.A.1. Matriz (MA, p17)***

Este dominio está compuesto por 128 amino ácidos y durante su vida media forma parte de 3 proteínas: la poliproteína pr55<sup>Gag</sup>, el precursor p41 (MA-CA-p2) y la proteína completamente clivada, p17 (Figura 11). La proteína madura es trimérica y cada monómero está formado principalmente por hélices-  $\alpha$  y 3 hojas-  $\beta$  [107]. Esta proteína ha sido implicada en la unión de Gag a la membrana celular y en la incorporación de Env a los nuevos viriones [105] (Figura 12).



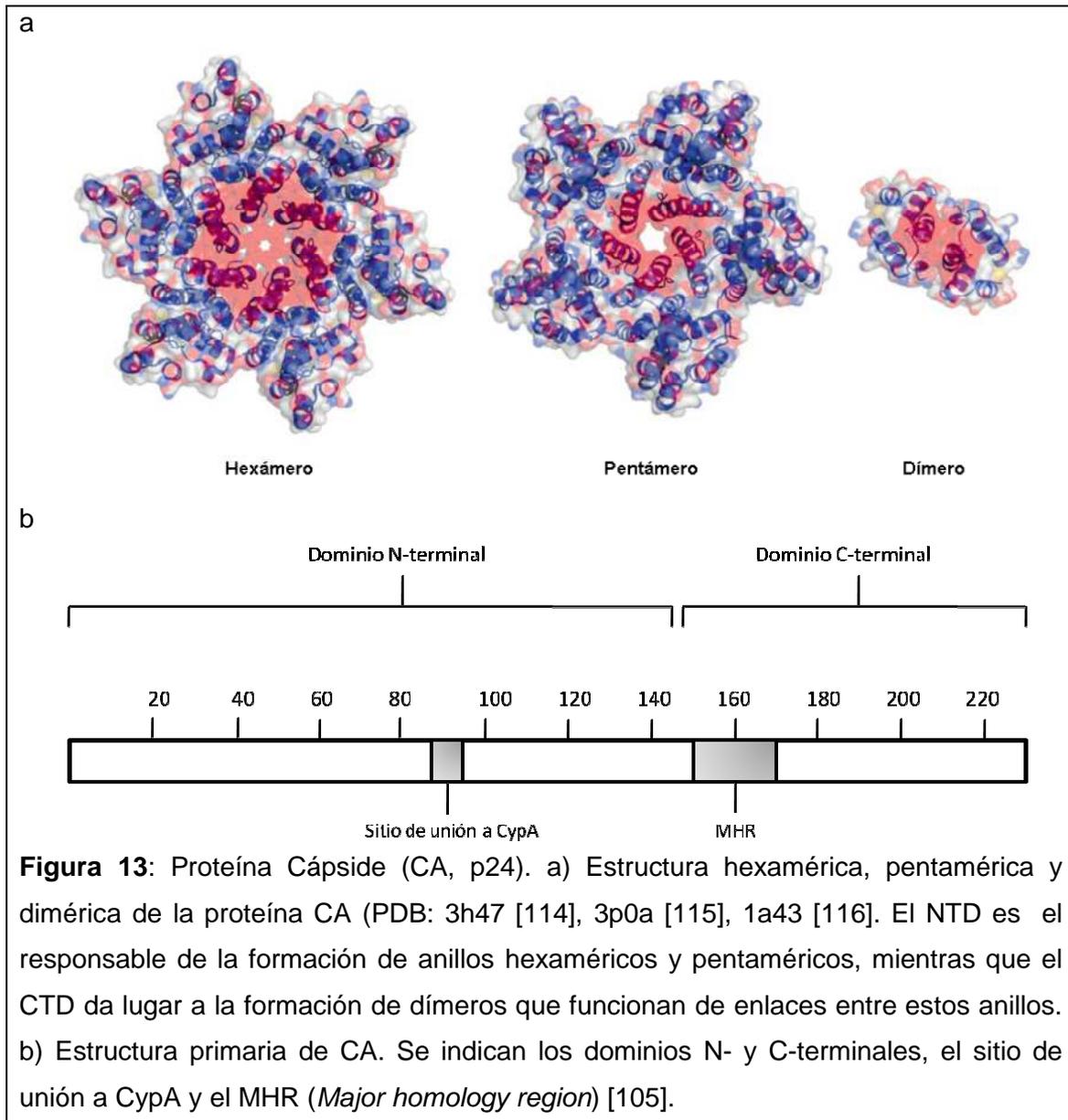
La MA se caracteriza por tener en su región N-terminal, un residuo de glicina (GLy-2) miristoilado post-traduccionamente. Se ha demostrado que la miristoilización es crítica para la unión de Gag a la membrana plasmática (MP) y para el ensamblado del virión [109]. Además, entre los residuos 17 y 31 existe un dominio altamente básico ( $^{18}\text{KIRLRPGGKKKYK\text{LKH}}^{33}$ ) que interacciona con las cabezas aniónicas de los fosfolípidos de la cara interna de la MP, facilitando de este modo la unión de Gag a la misma [110]. Por último,

entre las posiciones 30 y 34 el motivo  $^{30}\text{KLKH}^{34}$ , reconoce el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) de la MP y de esta forma colabora en la construcción de un ancla bidireccional en la MP [111].

Se ha propuesto también que esta proteína interacciona con la cola citoplasmática de Env (gp41) lo que contribuiría a la incorporación de la glicoproteína a los nuevos viriones. Además, estudios de mutagénesis dirigida, señalaron los residuos Glu-12, Lys-30 e His-33 como importantes para esta función.

#### ***1.3.3.1.A.2. Cápside (CA, p24)***

La proteína CA es la principal responsable de la formación del *core* del HIV-1 y durante su vida media forma parte de las poliproteínas  $\text{pr55}^{\text{Gag}}$  y  $\text{pr160}^{\text{GagPol}}$ , los precursores p41 (MA-CA-p2) y p25 (CA-p2) y la proteína clivada p24. Esta proteína se organiza en dos dominios, N-terminal (NTD, *N-Terminal Domain*) y C-terminal (CTD, *C-Terminal Domain*), unidos por un enlace flexible. El NTD está compuesto por 7 hélices- $\alpha$  seguidas por un *loop* rico en prolina y está involucrado en la maduración del virión y la incorporación de la proteína celular ciclofilina A (CypA) al virión. Por su lado, el CTD está formado por 4 hélices- $\alpha$  y contribuye con las interacciones Gag-Gag. Además, este dominio contiene una región de 20 amino ácidos, altamente conservada entre todos los Retrovirus, denominada MHR (*Major homology región*, Región principal de homología) [112]. Sustituciones en esta región interfieren en el ensamblaje, maduración e infectividad de la progenie viral [113] (Figura 13).



Durante la multimerización de Gag, el NTD de CA da lugar a la formación de anillos hexaméricos y pentaméricos (Figura 13 a). La habilidad de formar dos polímeros morfológicamente diferentes es necesaria para la producción del core maduro de la partícula viral [114]. Por su lado, el CTD da lugar a la formación de dímeros que funcionan de enlaces entre estos anillos.

La CypA es una prolil-peptidilisomerasa que es empaquetada en los viriones unida a Gag vía un *loop* rico en prolina ubicado en el NTD (<sup>85</sup>PVHAGPIAPG<sup>94</sup>) (Figura 13 b). Esta región es el blanco del factor de restricción celular TRIM5- $\alpha$ ,

el cual interfiere con eventos tempranos del ciclo de replicación viral. Por lo tanto, la unión de CypA constituye una estrategia de escape del virus a esta respuesta celular [105].

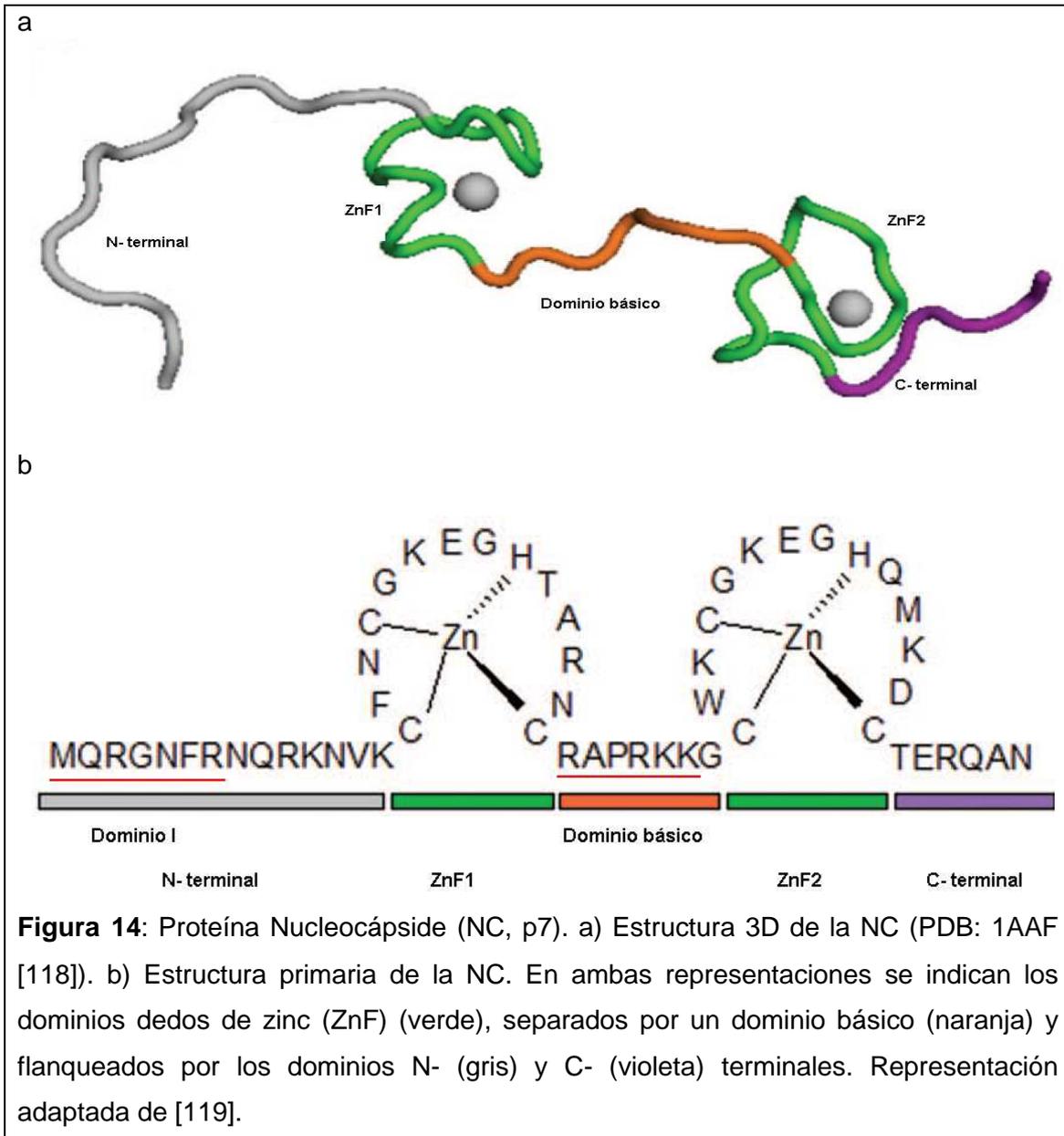
#### ***1.3.3.1.A.3. Péptido espaciador 1 (sp1, p2)***

El péptido espaciador 1 (sp1, p2) es un péptido de 14 amino ácidos que está presente en las poliproteínas pr55<sup>Gag</sup> y pr160<sup>GagPol</sup> y los precursores p41 (MA-CA-p2) y p25 (CA-p2) y es esencial para el ensamblado de la CA. Los primeros estudios sobre este péptido mostraron que mutaciones en los sitios de clivaje CA-p2 y p2-NC alteraban las interacciones entre moléculas de Gag. Posteriormente, análisis mediante crio cromatografía electrónica confirmaron que los hexámeros de Gag de la partícula inmadura son estabilizados por hélices de p2 [117]. Esto implica que la separación entre p2 y NC es importante para la condensación del *core* y la formación del complejo NC y ARNg. Por lo tanto, ese clivaje que, ocurre tarde durante el procesamiento de Gag, permite la morfogénesis, modulando las interacciones entre moléculas de Gag.

#### ***1.3.3.1.A.4. Nucleocápside (NC, p7)***

A pesar de ser uno de los dominios más pequeños de Gag, esta proteína cumple con diversas funciones y es una de las proteínas más estudiadas de HIV-1. Se caracteriza por la presencia de dos dominios Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys (CCHC, ZnF: *Zinc Finger Domain*) reminiscentes de los denominados motivos dedo de zinc que se encuentran en varias proteínas celulares que se unen a ADN (Figura 14).

Durante el ensamblado y la maduración de la partícula viral, la NC participa en diversos procesos, entre ellos, interacciones entre moléculas de Gag, la unión de Gag a la MP, la encapsidación y dimerización del ARNg, la transcripción reversa y la estabilidad del complejo de pre-integración [105].



A través de experimentos en los que se analizó la interacción entre moléculas de Gag utilizando constructos con sustitución de la NC por regiones que podían interactuar entre sí y con otras proteínas [120] o proteínas Gag negativas

para la miristoilización [121] se observó que la asociación NC:ARNg era esencial para la interacción entre moléculas de Gag. Esto llevó a la identificación de un dominio que se denominó Dominio de Interacción o Dominio I, debido a que esta región participa en las interacciones entre moléculas de Gag. Además, este dominio I contiene dos residuos de argininas (R) (<sup>378</sup>MQRGNFR<sup>384</sup>) que, cuando se encuentran mutadas, provocan una falla en el patrón puntuado de Gag en la MP e inhiben la producción de partículas virales [122].

En relación a los dominios ZnFs, aunque ambos son semejantes en estructura y en distribución de amino ácidos polares e hidrofóbicos, se ha demostrado que funcionalmente son distintos. El primer motivo dedo de zinc (ZnF1) debe estar intacto para el empaquetamiento del ARNg, pero el segundo (ZnF2) participa en la estabilización de la partícula viral [123]. Además, en la interacción NC: ARNg participa la región que separa los dos dominios ZnFs, la cual es altamente básica (<sup>406</sup>RAPRKKG<sup>412</sup>) [124] (Figura 14).

El empaquetamiento del ARNg en el virión depende del reconocimiento específico de la NC embebida en el precursor pr55<sup>Gag</sup> por el ARN. El principal dominio dentro del ARN responsable del empaquetamiento específico del ácido nucleico, es conocido como sitio  $\psi$ , y está ubicado entre el 5'LTR y el comienzo de *gag*. En HIV-1 este dominio se organiza en 4 *stem loops* (SL1- SL4), donde el SL3 está particularmente conservado entre los aislamientos [105]. Aunque la biología exacta de esta interacción todavía se desconoce, Lu *et al* observaron que la NC libre se une a SL2 y SL3 del ARNg [125]. Este análisis mostró que la segunda y cuarta guanosina (G) en el *tetra-loop* <sup>677</sup>GGAG<sup>680</sup> del SL3 mantiene contacto con ambos ZnFs. Por otro lado, se ha reportado que la NC facilita la

dimerización del ARNg y que media la conversión del ARN dimérico a una forma más estable, proceso conocido como maduración de ARN. Estas observaciones sugieren que la NC actúa como chaperona, catalizando la conversión del ARN a una forma termodinámicamente estable [105].

#### ***1.3.3.1.A.5. Péptido espaciador 2 (sp2, p1)***

El péptido espaciador 2 (o p1) es un péptido de 16 amino ácidos que posee dos residuos de prolina altamente conservados (Pro- 439 y Pro- 445). Mutaciones en estos residuos disminuyen la estabilidad del ARNg encapsidado y la infectividad de la partícula viral [126].

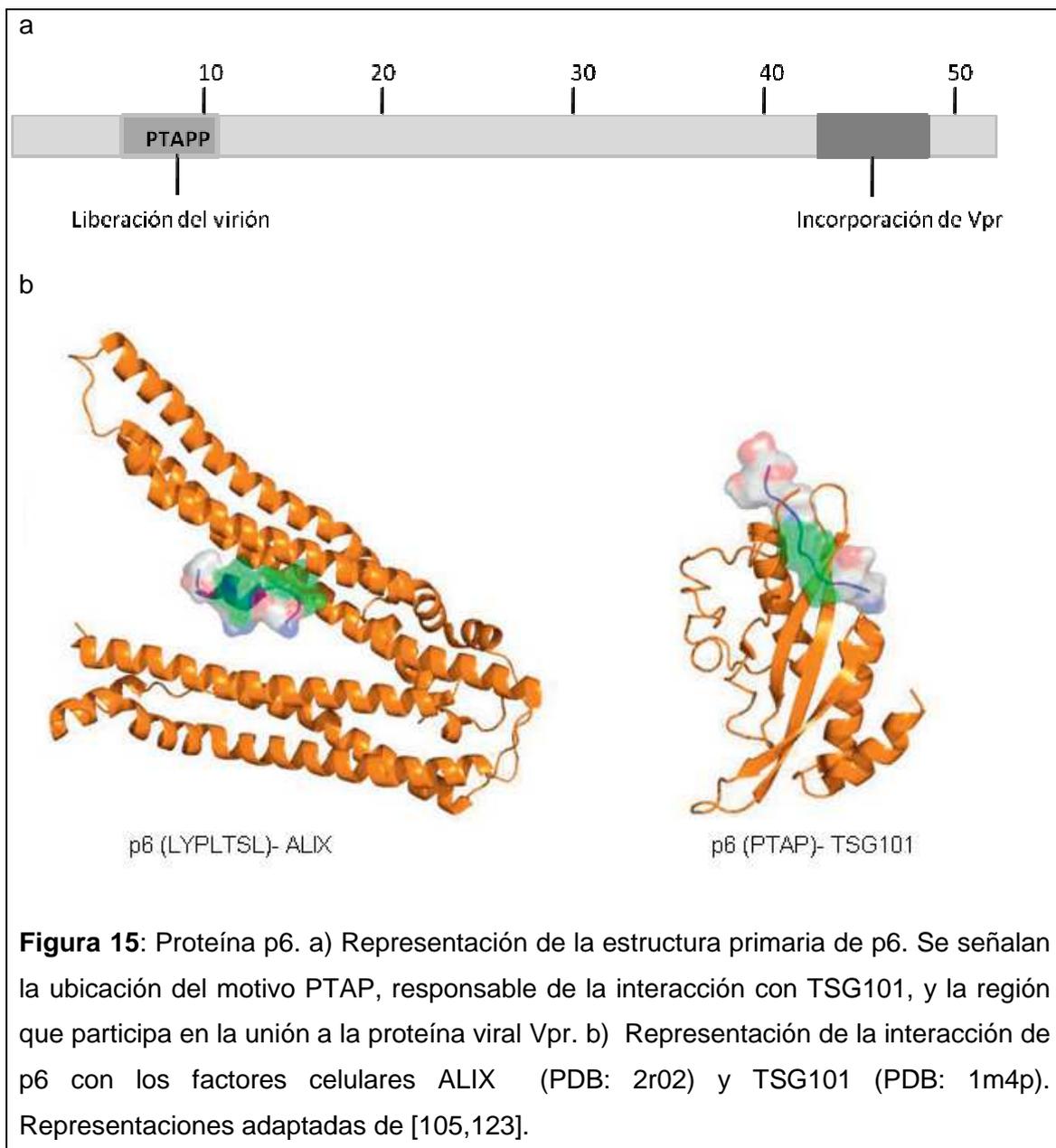
#### ***1.3.3.1.A.6. p6***

La región C-terminal de *gag* contiene al dominio p6 a partir del cual se traducen dos proteínas, la proteína p6 en el marco de lectura de Gag y la proteína p6pol (o p6\*) en el marco de lectura de GagPol. Los primeros estudios sobre las funciones de p6 durante el ciclo de replicación del virus mostraron que el truncamiento de esta proteína alteraba la liberación de viriones, provocando la acumulación de virus en la MP [127]. Estudios posteriores mostraron que el motivo Pro-Thr-Ala-Pro-Pro (PTAP), ubicado en la región N-terminal de la proteína, era crítico para la liberación de la partícula viral. Este rol de Gag en la liberación de la partícula viral fue descrito en otros Retrovirus por lo que estas regiones fueron agrupadas bajo el nombre de dominios tardíos o dominios L (*Late*) (Figura 15).

En HIV-1, p6 está formado por dos hélices, la hélice 18, adyacente al primer dominio L y sitio de unión de TSG101, y la hélice 19 que conforma la región

conocida por unirse tanto a ALIX, por medio del segundo dominio L, como a la proteína viral Vpr (Figura 15). Además, p6 es la mayor fosfoproteína de HIV-1 dado que los residuos Ser, Thr y Tyr sirven de sustrato para quinasas celulares.

Por su lado, la proteína p6\* parece ser una proteína poco estructurada y probablemente no sea capaz de unirse a TSG101, ALIX o Vpr [123].

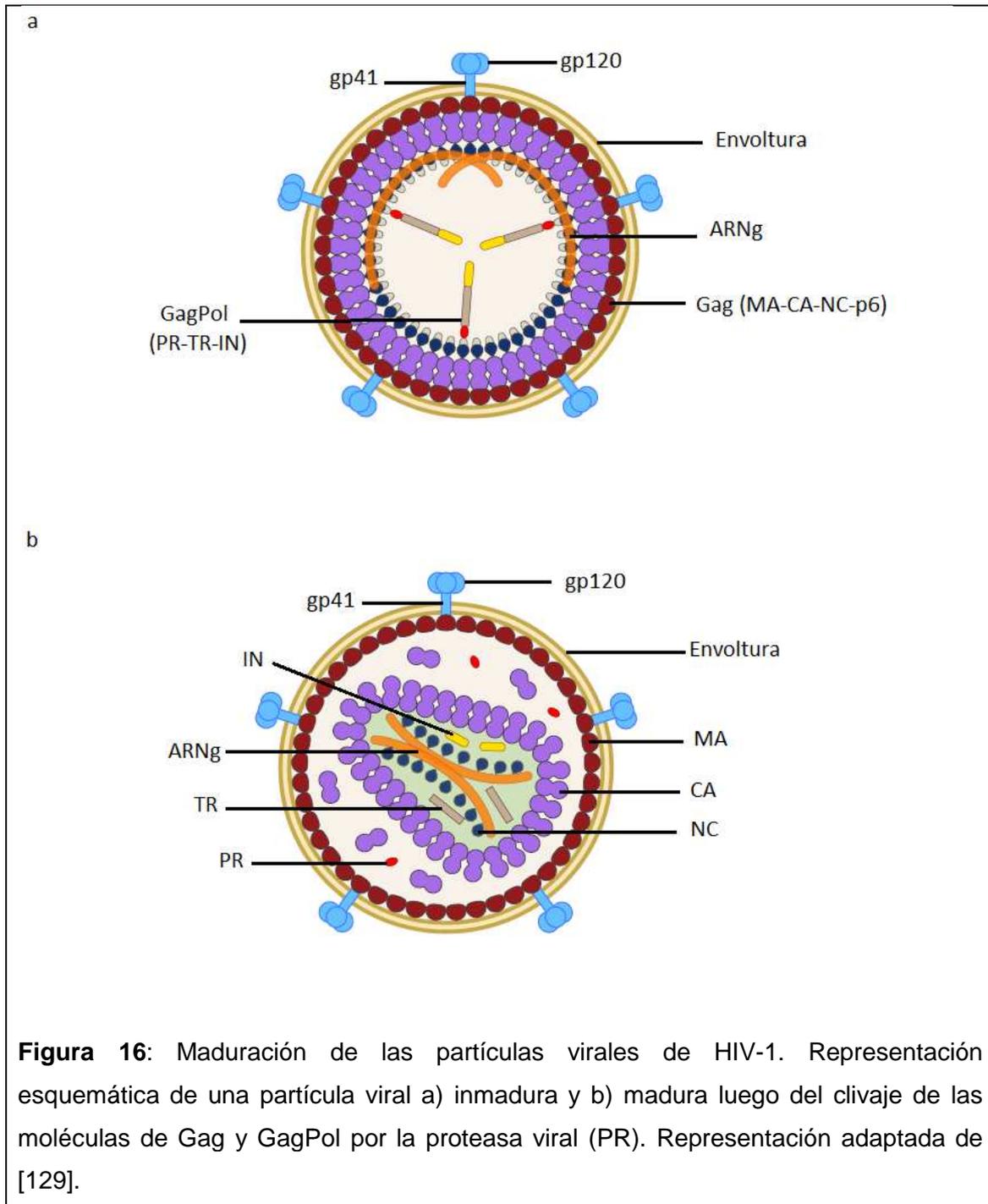


### ***1.3.3.1.B. Ensamblaje y maduración de la partícula viral***

Brevemente, el ciclo de replicación del HIV-1 puede ser organizado en las siguientes etapas: i) Fusión del virión a la membrana plasmática de la célula huésped, ii) Desnudamiento, iii) Transcripción inversa del genoma viral, iv) Integración, v) Transcripción del genoma proviral, vi) Traducción de las proteínas virales, vii) Ensamblado de la partícula viral, viii) Brotación y, finalmente ix) Maduración de la partícula viral (Figura 5).

El ensamblaje y maduración de la partícula viral son procesos complejos, dirigidos y coordinados por Gag. Más aún, se ha demostrado que la incorporación de GagPol al virión es esencial para su infectividad [128]. Durante el ensamblado del nuevo virión, las moléculas de Gag son reclutadas en la membrana de la célula huésped dirigidas por el dominio MA a través de: i) la incorporación de un grupo miristilo, ii) el *cluster* de residuos básicos y iii) una serie de residuos que secuestran PIP2 [110,129]. Luego, el dominio NC incorpora selectivamente ARNg a los nuevos viriones a través de su interacción directa con una señal de empaquetamiento en el genoma viral [130,131]. El proceso se completa con la oligomerización de miles de moléculas de Gag alrededor del complejo Gag:ARNg, proceso dirigido por los dominios CA y NC [132,133,134], la incorporación de moléculas de GagPol [128] y el reclutamiento de factores celulares que interactúan con el dominio p6 permitiendo la brotación del virión [135,136]. El resultado es una partícula esférica inmadura con la región N-terminal de Gag ordenada radialmente en contacto con la envoltura y la región C-terminal orientada hacia el centro del virión (Figura 16). Al mismo tiempo o inmediatamente después de la brotación, la partícula sufre un cambio morfológico debido al clivaje de las moléculas de Gag y GagPol por

la PR, proceso conocido como maduración del virión. El clivaje de Gag da lugar a la formación de 4 proteínas estructurales: Matriz (MA, p17), Cápside (CA, p24), Nucleocápside (NC, p7) y p6, más dos péptidos espaciadores (p2 y p1). Por su lado, el clivaje de GagPol da origen a MA, CA, p2 y NC, TFP (*transframe protein*) y p6pol, más las enzimas virales, PR, RT e IN. La partícula viral es ahora infecciosa, la MA permanece asociada a la envoltura mientras que las moléculas de CA se re-ensamblan formando el *core* cónico característico de HIV-1 [133] (Figura 16).

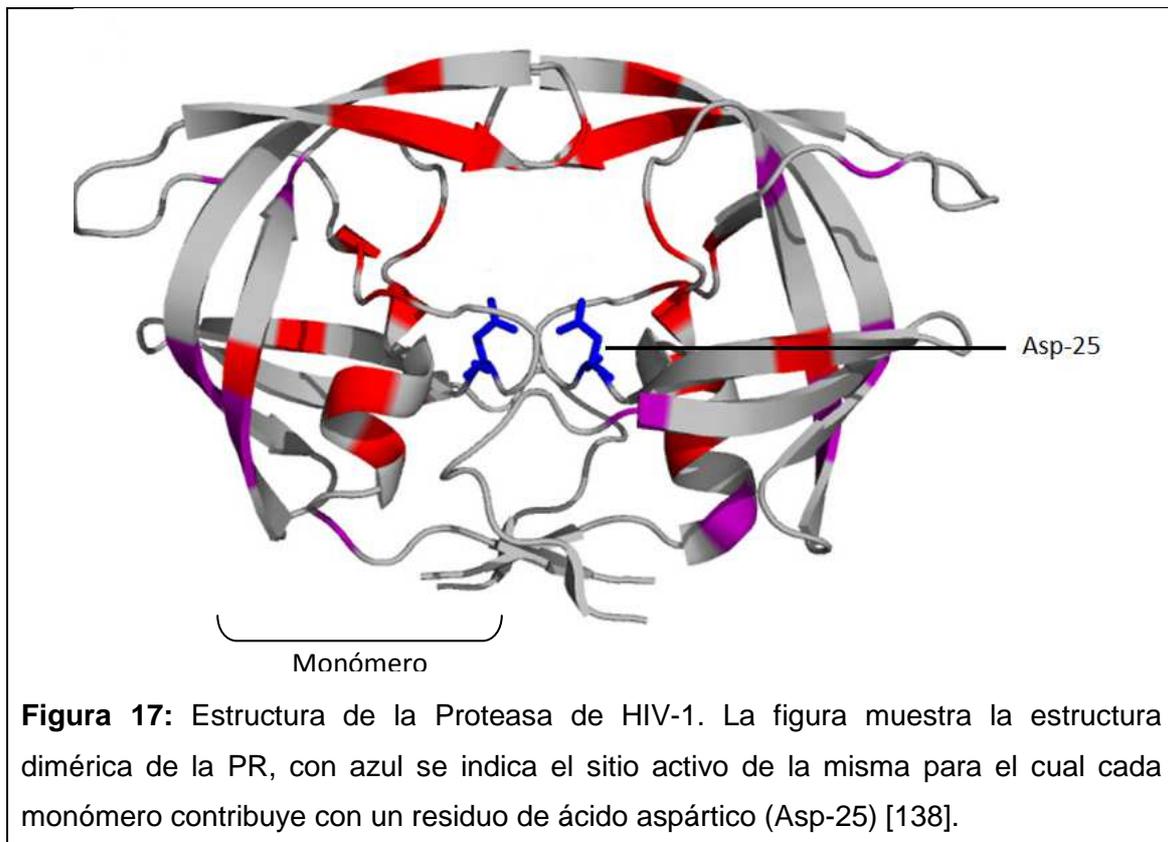


**Figura 16:** Maduración de las partículas virales de HIV-1. Representación esquemática de una partícula viral a) inmadura y b) madura luego del clivaje de las moléculas de Gag y GagPol por la proteasa viral (PR). Representación adaptada de [129].

### ***1.3.3.1.C. Proteasa Viral***

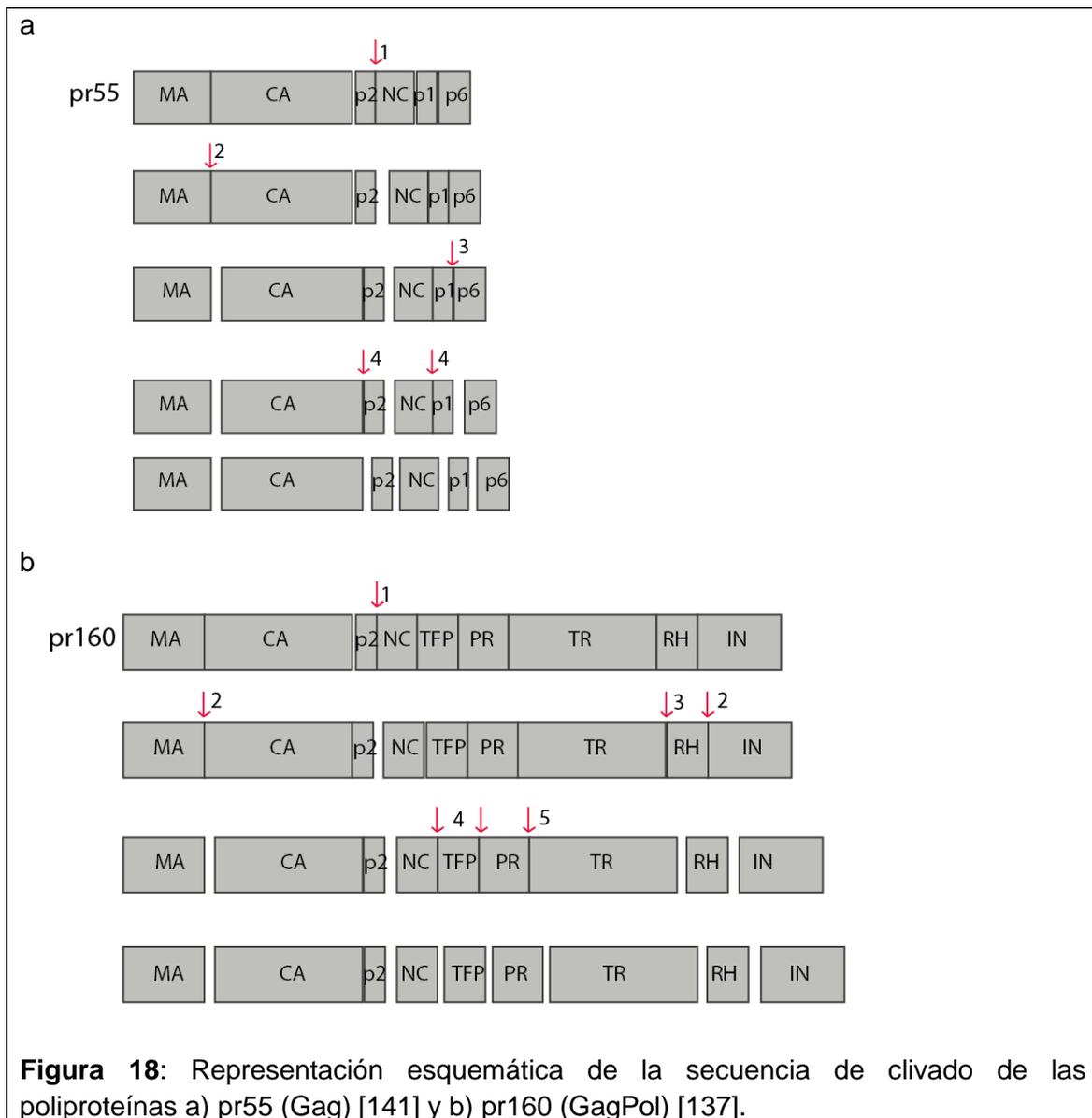
La maduración del virión es un proceso complejo en el cual el orden y la cinética de clivaje, como así también la cantidad de precursor procesado, son pasos críticos en la generación de partículas virales infecciosas [137]. El procesamiento de estos precursores, estos es, Gag y GagPol, es llevado a cabo por la PR sin intervención de proteasas celulares.

La PR de HIV-1 pertenece a la familia de proteasas aspárticas y consiste en un homodímero simétrico formado por la asociación de dos monómeros de 99 amino ácidos. Ambas subunidades contribuyen con un residuo de ácido aspártico en la posición 25 (Asp-25) para la formación del sitio activo [138](Figura 17).



La ubicación de la PR dentro de su precursor en combinación con el requerimiento de que la enzima debe ser dimérica para ser activa indica que, en las etapas iniciales del procesamiento de los precursores, la PR está aún embebida en su propio precursor. De esta forma, los primeros clivajes en GagPol son intramoleculares en *cis* [139].

El procesamiento de Gag comienza con el clivaje del enlace entre p2 y NC (MA-CA-p2 // NC-p1-p6) seguido por la separación de la MA de CA-p2 (MA // CA-p2). Inmediatamente, p6 es separado de NC-p1 (NC-p1 // p6) y, en último lugar, se remueven los dos péptidos separadores (NC // p1, CA // p2) (Figura 18). Se ha demostrado que esta secuencia de clivaje está regulada principalmente por los residuos aminoacídicos del sustrato que entran en contacto directo con la proteasa, la cual, al parecer, reconoce la estructura tridimensional de su sustrato más que una secuencia peptídica dada [140]. Poco se sabe de la secuencia de clivaje de la poliproteína GagPol, a pesar de la extensa caracterización de sus productos. Sin embargo, Pettit et al (2005) observaron en un sistema *in vitro* de clivaje en *trans* la siguiente secuencia de clivaje; i) separación de p2 de NC (MA-CA-p2 // NC-TFP-PR-TR-IN), ii) clivaje de MA (MA // CA-p2) y de la IN (NC-TFP-PR-TR.RH // IN), iii) clivaje de RH de la TR (NC-TFP-PR-TR // RH), iv) clivaje de TFP y NC (NC // TFP // PR-TR) y, v) separación de PR y TR (PR // TR) [137] (Figura 18).



### ***1.3.3.1.D. Inhibidores de Proteasa***

El avance en el conocimiento de la estructura de la PR de HIV-1 y de sus sustratos permitió el desarrollo de inhibidores específicos de la proteasa viral (IP). Hasta la fecha, 9 IP han sido aprobados para su uso clínico: saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), (fos) amprenavir (FPV/ APV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATV), tripanavir (TPV) y darunavir (DRV). Todos estos inhibidores, a excepción del TPV, son inhibidores

peptidomiméticos competitivos, es decir, simulan la estructura del sustrato natural de la PR.

Un IP ideal sería aquel que inhibiera la maduración del virión en sus estadios iniciales, es decir, cuando la proteasa aún se encuentra embebida en su propio precursor. Sin embargo, todos los IP aprobados han sido desarrollados para unirse al sitio activo de la PR en su forma dimérica madura. Además, se ha demostrado que la PR inmadura, embebida en su precursor, es 10000 veces menos sensible a RTV que su contraparte madura [139]. Recientemente, dos grupos de investigación independientes demostraron que, de los 9 IP aprobados, DRV y SQV son los inhibidores de autoprosesamiento de la PR más potentes. Sin embargo, ambos IP son tres órdenes de magnitud menos activos en contra de la PR inmadura en comparación con la PR madura [142,143].

Actualmente, los regímenes de primera línea de terapia antirretroviral de alto impacto (HAART) consisten en una combinación de dos inhibidores nucleosídicos de la TR (NRTIs) más un inhibidor no nucleosídico de la TR (NNRTIs), un inhibidor de la integrasa o un inhibidor de proteasa. La implementación de la terapia HAART ha reducido significativamente la morbilidad y mortalidad relacionada a HIV-1. Sin embargo, la emergencia de mutaciones de resistencia a estos compuestos disminuye dramáticamente la efectividad del tratamiento.

En general, la evolución de resistencia a IP se desarrolla en dos fases. Inicialmente, las mutaciones de resistencia emergen en o en las proximidades del sitio de unión del sustrato de la PR viral. Se ha demostrado que las mutaciones de resistencia aparecen principalmente en residuos que entran en

contacto directo con el IP y no con el sustrato natural de la enzima. Estas mutaciones disminuyen la afinidad de la enzima por la droga reduciendo la susceptibilidad al inhibidor, dando como resultado un virus resistente. Sin embargo, los cambios que se producen en el sitio de unión al sustrato alteran, ligeramente, la afinidad de la PR por su sustrato natural (Gag) disminuyendo el *fitness* viral [144,145]. En una segunda fase, se seleccionan mutaciones compensatorias o secundarias que restauran la replicación viral y/o aumentan la resistencia a IP. Estas mutaciones se ubican no sólo en la PR propiamente dicha sino también en Gag, particularmente, en los sitios de clivaje (SC) NC/p1 y p1/p6 [146,147,148]. Aunque las sustituciones en los SC de Gag fueron descritas en un primer momento en individuos bajo tratamiento con IP, estudios recientes demostraron la presencia de estas sustituciones en individuos *naïve* de tratamiento antirretroviral. Además, en aislamientos virales que carecían de mutaciones de resistencia en la PR, la presencia de sustituciones en los SC de Gag estuvo asociada a la disminución en la susceptibilidad a IP [149]. Por lo tanto, en individuos *naïve* que inicien una terapia antirretroviral de primera línea, la presencia de sustituciones en los SC podría disminuir la efectividad de regímenes con IP [150].

Las primeras descripciones de sustituciones en Gag, al igual de lo que ocurrió en Pol, surgieron a partir del análisis de secuencias de subtipo B. Sin embargo, dos grupos de trabajo independientes describieron, recientemente, la frecuencia de sustituciones en los SC y en determinadas posiciones a lo largo de Gag en aislamientos correspondientes a subtipos No-B [150,151]. En ambos trabajos se demostró que las variantes No-B son altamente polimórficas, aún en individuos *naïve* de tratamiento. En Argentina, como se

dijo anteriormente, circulan mayoritariamente variantes de subtipo B y recombinantes BF. Sin embargo, no se ha realizado una descripción exhaustiva de polimorfismos de los SC y posiciones asociadas a resistencia a lo largo de Gag en individuos *naïve*.

## ***II. OBJETIVOS E HIPOTESIS***

### ***II.1 Objetivo***

#### ***II.1.1. Objetivos generales***

1. Analizar a lo largo del tiempo, la variabilidad genómica del HIV-1 en individuos con infección múltiple y sus posibles implicancias en la dinámica de la población viral, en comparación con lo observado en individuos con infección simple.
2. Analizar *in vitro* las variaciones en la replicación viral relacionadas con la recombinación intersubtipo en la región Gag-Proteasa de HIV-1 en modelos de infección simple e infección doble.

#### ***II.1.2. Objetivos particulares***

1. Analizar a lo largo del tiempo, la variabilidad genómica del HIV-1 en individuos con riesgo múltiple para la infección por este virus.
2. Caracterizar las variantes provirales detectadas, los patrones de mutaciones de resistencia a drogas ARVs y los parámetros virológicos e inmunológicos de los individuos infectados con más de una variante viral.
3. Comparar la variabilidad en la estructura primaria de secuencias de *gag* y *gagpol* en posiciones asociadas en la bibliografía con exposición y/o

- resistencia a IP entre secuencias de subtipo B, F y recombinantes BF provenientes de individuos argentinos y *naïve* de tratamiento antirretroviral
4. Evaluar el impacto de la recombinación intersubtipo sobre la capacidad replicativa *in vitro* asociada a la región genómica Gag-Proteasa en modelos de infección simple e infección doble.

## ***II.2. Hipótesis***

1. En Argentina, la distinta prevalencia de subtipos de HIV-1 (B, BF y otros) en diferentes grupos de riesgo brinda el marco propicio para que ocurran infecciones múltiples en individuos HIV positivos con conductas de alto riesgo para la infección.

2. Las diferencias estructurales de las formas recombinantes intersubtipo BF de la región Gag-Proteasa se traducen en cambios funcionales, diferenciándose de las formas parentales de subtipo puro y modificando la capacidad replicativa del virus que la porta.

### ***III. MATERIALES Y MÉTODOS***

## ***III.1. Caracterización de infecciones múltiples***

### ***III.1.1. Población de estudio y obtención de muestras***

Los individuos incorporados en este estudio eran pacientes regulares de la Fundación de Ayuda al Inmunodeficiente (FUNDAI), ubicado en el Hospital de Enfermedades Infecciosas “Dr. Francisco Javier Muñiz”. Se seleccionó un grupo de 27 individuos HIV positivos pertenecientes a los grupos HSH, UDIs y HS, de acuerdo a un cuestionario que se entregó para conocer su/s factor/es de riesgo y probable vía de contagio. Cuando los pacientes seleccionados asistieron por primera vez para consultar por su infección, el médico clínico asistente les proporcionó y obtuvo el consentimiento informado.

Muestras de sangre con y sin anticoagulante (EDTA) fueron colectadas en condiciones estériles, siguiendo los protocolos estándar y las precauciones de seguridad. El transporte de las muestras se realizó según las normas de bioseguridad vigentes (Leyes Nacionales 23.798 y 24.051).

A partir de una muestra de 10 ml de sangre entera con EDTA, se recuperó el plasma y la fracción de células mononucleares (CMSP) por centrifugación a 1.900 rpm por 10 minutos y se conservaron a -80°C hasta su uso. Las muestras de sangre coagulada fueron centrifugadas bajo las mismas condiciones, se recuperó el suero y se guardó a -80°C.

Las muestras de los pacientes se ingresaron con un código formado por las iniciales del nombre y la fecha de nacimiento según la Ley de sida 23.798

Esta investigación fue revisada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y se siguieron las normas

nacionales e internacionales para investigaciones biomédicas que involucran seres humanos (CIOMS, 2002; CIOMS, 1991).

Los análisis subsiguientes se realizaron en aquellos individuos en los que se pudo obtener al menos 2 muestras en un periodo entre 6-9 meses.

### ***III.1.2. Análisis de la evolución clínica de los individuos analizados***

Se determinaron la carga viral (CV) en plasma, el recuento de linfocitos T CD4 (+) en sangre y la presencia de enfermedades oportunistas. Se estudió en forma prospectiva la evolución y fluctuaciones de la CV en aquellos individuos que estaban bajo tratamiento. Asimismo, se analizó el perfil de mutaciones asociadas a resistencia a drogas antirretrovirales. Se evaluó la asociación entre predominio del subtipo infectante y el patrón de resistencia a antirretrovirales.

#### ***III.1.2.1. Técnica de carga viral***

Las copias genómicas de ARN/ml de plasma (CV) se cuantificaron mediante la hibridación de ácidos nucleicos (Quantiplex XTm HIV RNA 3.0 Assay bDNA Chiron Corp) en los laboratorios de FUNDAI.

#### ***III.1.2.2. Recuento de Linfocitos T CD4+***

El recuento se realizó usando un Citómetro de Flujo Beckman Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, Miami, USA) en los laboratorios de FUNDAI.

### ***III.1.2.3. Estudios de resistencia al tratamiento antirretroviral***

La secuencia obtenida de *pol* de cada clon de la población viral de cada individuo fue comparada con la secuencia conocida de un virus sensible (HXB2), mediante programas específicos. Las mutaciones asociadas a resistencia (MARs) detectadas se determinaron mediante la utilización de bancos de datos internacionales (<http://hivdb.stanford.edu/>).

### ***III.1.3. Análisis moleculares en muestras seriadas***

#### ***III.1.3.1. Extracción de ácidos nucleicos y amplificación de *pol****

La extracción de ADN total se realizó a partir de una alícuota de la fracción leucocitaria de sangre anticoagulada mediante equipos comerciales (QIAamp Viral DNA Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento del gen *pol* (1.600 pb, 2174-3316 posición en HXB2), que incluye la región codificante para la PR y los primeros 340 codones de la TR, según el método de amplificación de genoma único (SGA, *Single Genome Amplification*). El mismo consiste en utilizar diluciones seriadas del ADN extraído para la PCR anidada y elegir la dilución anterior a la primera dilución negativa para repetir la PCR de 10-15 veces. El producto del segundo round de amplificación se purificó usando columnas Microcon YM-50 (Millipore Corporation, Bedford, MA). Los cebadores diseñados para tal fin y las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 1 y 2, respectivamente.

**Tabla 1: Nombre, posición y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen *pol* de HIV-1**

ID	Posición (HXB2)	Secuencia
<b>1<sup>era</sup> ronda</b>		
<b>Pro 5F</b>	1996 → 2018	5'-AGAAATTGCAGGGCCCCTAGGAA
<b>RT3474R</b>	3477 → 3453	5'-GAATCTCTCTGTTTTCTGCCAGTTC
<b>2<sup>da</sup> ronda</b>		
<b>Pro3F</b>	2153 → 2166	5'-AGANCAGAGCCAACAGCCCCCA
<b>ProRT</b>	3338 → 3308	5'-TTTCCCCACTA ACTTCTGTATGTCATTGACA

**Tabla 2: Condiciones de ciclado para la amplificación del gen *pol* de HIV-1**

	<b>1<sup>era</sup> ronda</b>		<b>2<sup>da</sup> ronda</b>	
<b>30 ciclos</b>	95 °C	3 min	95 °C	3 min
	94 °C	30 seg	94 °C	30 seg
	55 °C	30 seg	58 °C	30 seg
	72 °C	1,5 min	72 °C	1,5 min
	72 °C	5 min	72 °C	5 min

Los productos de amplificación se visualizaron sembrando 5µl del producto de PCR de la segunda ronda en un gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio 0,5g/ml utilizando un marcador de peso molecular de 1000 pb (Fermentas) en solución buffer de tris- borato-EDTA (TBE) 1X. La corrida duró unos 15 minutos aproximadamente y se realizó con un voltaje de 90-100 volts. Las bandas se visualizaron en un transiluminador con UV.

### ***III.1.3.2. Detección y seguimiento de infecciones dobles***

Para determinar la presencia de más de una variante viral en un individuo se utilizó el método de dilución límite seguida de *Single Genome Amplification* (SGA). Como se mencionó arriba, se repitió de 10-15 veces la PCR de la dilución de ADN inmediatamente anterior a la primera PCR negativa, procediéndose luego a la secuenciación directa del producto de PCR.

### ***III.1.3.3. Secuenciación***

Ambas cadenas de cada amplicón se secuenciaron mediante el método de terminadores de cadena, utilizando el kit comercial *BigDye Terminator v.3* (Applied Biosystem, USA) y un secuenciador automático ABI 3100. Las secuencias obtenidas se editaron y ensamblaron utilizando el programa *Sequencher 5.0* (GeneCodes Corporation, USA)

### ***III.1.3.4. Análisis de las secuencias***

#### ***III.1.3.4.1. Análisis filogenético***

Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa Clustal X, incorporando secuencias de referencia de la base de datos de Los Alamos ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)) y secuencias argentinas publicadas previamente [152]. El análisis filogenético posterior se efectuó con el programa MEGA v. 4.0.2 aplicando el método de *Neighbor-joining* (NJ) bajo el modelo de dos parámetros de Kimura (K-2p) de evolución molecular. Además, el sustento estadístico de los agrupamientos obtenidos se evaluó aplicando el test de *bootstrap* con 1000 réplicas. Se consideró que un valor de *bootstrap* mayor o igual al 60% era soporte suficiente para el nodo en cuestión.

Los árboles filogenéticos se editaron usando el programa FigTree v.1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

#### ***III.1.3.4.2. Caracterización de subtipo y patrón de recombinación***

Los subtipos se determinaron por Simplot v.3.5.1 y fueron confirmados por programas de acceso libre en internet: i) *jumping profile Hidden Markov Model* (jpHMM, <http://jphmm.gobics.de/>) y ii) *NCBI Genotyping Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping>).

La determinación de los puntos de recombinación se realizó mediante el uso de 3 programas: a) jpHMM (*jumping profile Hidden Markov Model*): disponible *online* en <http://jphmm.gobics.de>, utiliza un método probabilístico que permite comparar una secuencia de un alineamiento múltiple contra una matriz de secuencias clasificadas en subtipos virales [153]; b) herramienta *Bootscanning del programa Simplot* v.3.5.1 (<http://www.welch.jhu.edu>), (Ventana: 200 pb Pasos: 20 pb); c) NCBI GenotypingTool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>), cada ventana se compara mediante BLAST con cada una de las secuencias de referencia para cada virus (Ventana: 200 pb Pasos: 20 pb % de similitud: 50%). En todos los casos, las secuencias de referencia utilizadas para el análisis fueron las recomendadas en la base de datos de Los Alamos.

## ***III.2. Impacto de la recombinación intersubtipo en la región genómica Gag-Proteasa sobre la capacidad replicativa de HIV-1***

### ***III.2.1. Análisis de mutaciones en Gag y Proteasa asociadas a exposición y/o resistencia a Inhibidores de Proteasa***

#### ***III.2.1.1. Determinación de subtipo y estructura recombinante***

Sobre un total de 88 secuencias nucleotídicas de *gag* pertenecientes a individuos *naïve* de tratamiento antirretroviral obtenidas de la base de datos de Los Alamos (Los Alamos HIV *sequence database*, <http://www.hiv.lanl.gov>), incluyendo la secuencia de referencia de *gag-pol* CRF12\_BF ARMA 159, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa MAFFT v.7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) seguido de la corrección visual mediante el programa BioEdit versión 5.0.9 (<http://mbio.ncsu.edu>).

Para 67 individuos, se obtuvo la secuencia de *gag* y su correspondiente secuencia de *proteasa* de la base de datos de Los Alamos.

Los subtipos se confirmaron por Simplot y su estructura recombinante fue analizada siguiendo 3 estrategias: a) jpHMM, b) herramienta *bootscanning* del programa SIMPLOT y c) NCBI *Genotyping Tool*, como se describe en la sección III.1.3.4.2.

### **III.2.1.2. Análisis de variabilidad aminoacídica**

La estructura aminoacídica primaria de cada secuencia de *gag* y proteasa se obtuvo utilizando el programa BioEdit versión 5.0.9 (<http://mbio.ncsu.edu>).

Todas las secuencias se alinearon junto con la secuencia de HXB2 como referencia de posición utilizando el programa MAFFT v.7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

En las secuencias de Gag, se evaluó la frecuencia de sustituciones en posiciones reportadas en la bibliografía como asociadas tanto a exposición previa a IP, *in vivo* e *in vitro*, como a resistencia a IP [141].

En las secuencias de Proteasa se analizó la frecuencia de sustituciones en las posiciones que figuran en el banco de datos internacional *Stanford* (<http://hivdb.stanford.edu>).

Se calcularon las frecuencias totales de cada sustitución como así también la frecuencia de cada sustitución por subtipo, de la siguiente manera:

$$\mathbf{F \text{ total de sustitución } X} = \frac{\text{núm de secuencias con la sustitución}}{\text{núm total de secuencias}}$$

$$\mathbf{F \text{ de sustitución en el subtipo } Y} = \frac{\text{núm de sec de subtipo Y con la sustitución}}{\text{núm total de sec de subtipo Y}}$$

### ***III.2.1.3. Análisis estadístico***

Los datos son presentados como frecuencia media. La comparación entre las frecuencias obtenidas se realizó por medio de un *test*  $\chi^2$ , utilizando el paquete estadístico Spss v.15. En todos los análisis estadísticos se consideró un nivel de significancia de 0.01 ( $p < 0.01$ ).

## ***III.2.2. Evaluación de la capacidad replicativa asociada a la región Gag-Proteasa***

### ***III.2.2.1. Amplificación y clonado de la región Gag-Proteasa***

A partir de una alícuota de CMSP, mediante equipos comerciales, se realizó la extracción de ADN viral y la amplificación por PCR de un fragmento de 2712 pb correspondiente a las regiones genómicas 5' LTR- *gag-pol* (posición relativa a HXB2 623-3301). Posteriormente, se amplificó la región Gag/Pro de dichas muestras con cebadores diseñados para introducir sitios de restricción para las enzimas BssHII y BstBI (posiciones relativas a HXB2 703 y 2540, respectivamente). Los cebadores y condiciones de ciclado se detallan en las tablas 4 y 5, respectivamente.

Los amplicones obtenidos fueron purificados (QIAquick gel purification kit, QIAGEN) y ligados en el vector comercial pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de ligación se usó para transformar la cepa comercial de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  químicamente competente. La selección del inserto de 5'LTR-Gag-Proteasa se realizó en placas con medio LB- Agar suplementado con ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$ , X-Gal 50

ng/ml e IPTG 10  $\mu$ M. Las colonias blancas obtenidas se sometieron a *screening* mediante PCR directa sobre lisado de las mismas (Tabla 5) y subsiguiente secuenciación directa de los productos obtenidos.

Se seleccionaron 3 clones denominados, pGag/Pro-F1, pGag/Pro-12BF-*like*, y pGag/Pro-28BF- *like*.

**Tabla 3: Nombre, posición y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento 5' LTR-Gag-Proteasa de HIV-1**

ID	Posición (HXB2)	Secuencia
<b>1<sup>era</sup> ronda</b>		
<b>Msf12b</b>	623 → 649	5'-AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG
<b>F2</b>	3321→3301	5'-GTATGTCATTGACAGTCCAGC
<b>2<sup>da</sup> ronda</b>		
<b>BssHII</b>	703 → 719	5'-TTGCTGAAGCGCGCACG
<b>BstBI</b>	2570 → 2542	5'-AGTTTCAATAGGACTAATTCGAAAATTTA

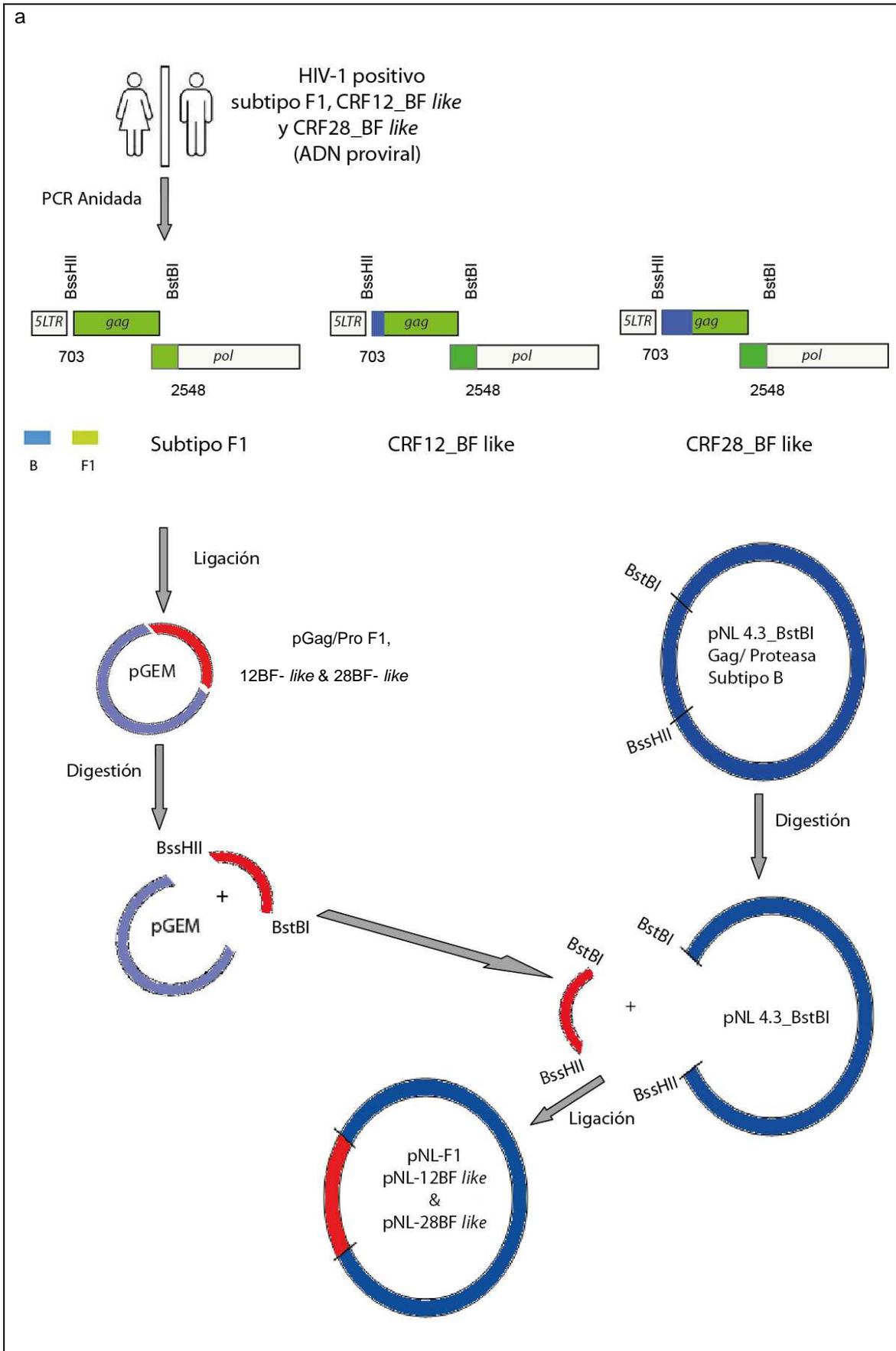
**Tabla 4 a: Condiciones para la amplificación del fragmento 5'LTR-gag-proteasa**

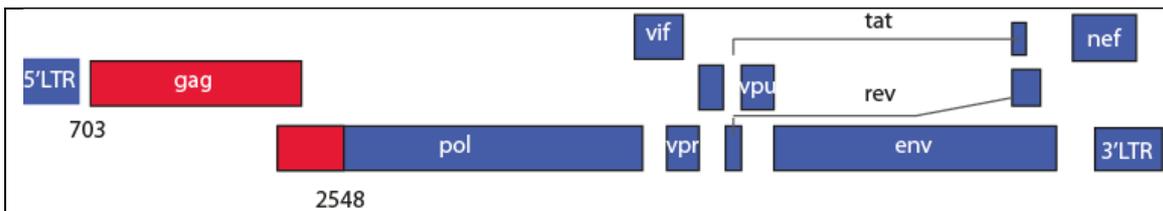
	A partir de ADN total	A partir de lisado de bacteria
<b>Buffer de reacción</b>	1X	1X
<b>Mg<sup>++</sup></b>	1.5 mM	1.5 mM
<b>dNTP</b>	0.2 mM cada uno	0.2 mM cada uno
<b>Cebador Fw</b>	0.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
<b>Cebador Rv</b>	0.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
<b>ADN polimerasa</b>	1 U	1 U

**Tabla 4 b: Condiciones de ciclado para la amplificación del fragmento 5'LTR-Gag-Proteasa de HIV-1**

	1 <sup>era</sup> ronda		2 <sup>da</sup> ronda	
<b>30 ciclos</b>	94 °C	3 min	94 °C	3 min
	94 °C	30 seg	94 °C	30 seg
	55 °C	30 seg	58 °C	30 seg
	72 °C	1 min	72 °C	1 min
	72 °C	3 min	72 °C	3 min

\*Condiciones de ciclado para la amplificación del fragmento a partir del lisado de bacterias





**Figura 19:** a) Representación esquemática de la estrategia utilizada para la construcción de los genomas recombinantes NL-F1, NL-12BF *like* y NL-28BF *like*. A partir de CMSP de individuos infectados con las variantes F1, CFR12\_BF *like* y CRF28\_BF *like*, se amplificó por PCR anidada la región codificante para Gag/ Pro con *primers* diseñados para introducir sitios de restricción para las enzimas BssHII y BstBI. En la figura se representa el patrón de recombinación de la región Gag/Pro de acuerdo al programa jpHMM. El producto de PCR fue clonado en pGEM-T y se obtuvieron los plásmidos pGag/Pro-F1, pGag/Pro-12BF *like* y pGag/Pro-28BF *like*. Por otro lado, el plásmido pNL 4-3 con los sitios de restricción BssHII (posición 703 en HXB2) y BstBI (posición 2548 en HXB2), cedido por un grupo de investigación de San Pablo, corresponde a un genoma clonal de subtipo B portador del sitio BstBI al inicio de la TR. Ambos plásmidos (pGag/Pro\_ y pNL4-3\_BstBI) fueron sometidos a digestión enzimática con las enzimas de restricción BssHII y BstBI procediéndose posteriormente a la ligación del vector pNL 4-3 digerido con el fragmento Gag.Pro F1 y BFs de interés (representado en color rojo en la figura). b) Representación esquemática de los genomas recombinantes obtenidos, NL-F1, NL12BF-*like* y NL28BF-*like*, los cuales consisten en un esqueleto de subtipo B (pNL 4.3) en el que la región Gag/Pro fue reemplazada por aquel de subtipo F1, CRF12\_BF- *like* o CRF28\_BF- *like*.

### III.2.2.2. Generación de clones moleculares recombinantes

Mediante digestión enzimática con BssHII y BstBI (NEB) se obtuvieron los insertos Gag/Pro de cada uno de los vectores pGEM-Gag/Pro generados previamente que fueron utilizados para reemplazar la región genómica correspondiente en el vector pNL4-3 (GenBank: AF324493.2) que contiene el genoma completo de una cepa de referencia subtipo B. Este vector fue cedido por un grupo de investigación de la Universidad de San Pablo, Brasil. Consiste

en clon de NL4-3 previamente modificado para que porte el sitio de restricción de la enzima BstBI al inicio de la TR (Figura 19).

Los clones moleculares construidos fueron los siguientes:

- pNL4-3 BssHII/ BstBI, que será mencionado como NL-B, fue utilizado como variante de subtipo B.
- pNL-F1, será mencionado de aquí en adelante como NL-F1, en el que la región Gag/Pro del plásmido NL-B fue reemplazada por la región amplificada a partir de la muestra de un individuo argentino infectado con virus de subtipo F1.
- pNL CRF12 BF-like, llamado NL-12BF-like: en el que la región Gag/Pro del plásmido pNL-B fue reemplazada por la región amplificada a partir de la muestra de un individuo argentino infectado con virus recombinante relacionado a la CRF12\_BF.
- pNL CRF28 BF-like, llamado NL-28BF-like: en el que la región Gag/Pro del plásmido NL-B fue reemplazada por la región amplificada a partir de la muestra de un individuo argentino infectado con una variante semejante a la CRF28\_BF.

Todos los clones moleculares obtenidos fueron secuenciados para confirmar la incorporación e integridad de cada uno de los insertos. La Figura 19 resume la estrategia utilizada para obtener los genomas recombinantes NL-F1, NL 12BF-like y NL- 28BF-like.

### ***III.2.2.3. Cultivos celulares***

Las líneas celulares utilizadas fueron: HEK 293T, GHOST X4/ R5, CEM GFP y MT2. Las líneas HEK 293T y GHOST son células de origen epitelial derivadas de riñón humano y osteosarcoma humano, respectivamente. La línea HEK293T presenta una elevada susceptibilidad a la transfección. Las células de la línea GHOST X4/ R5 están transducidas establemente con el vector retroviral MV7neo-T4 y co-transfectadas de manera estable con los constructos LTR<sup>HIV-2</sup>/GFP y CMV IE, que dirigen la expresión de GFP dependiente de HIV y la resistencia a higromicina, respectivamente. Estas células expresan de manera estable el receptor CD4 y los co-receptores CXCR4 y CCR5 que son mantenidos mediante selección con antibióticos [154]. Por lo tanto, la infección viral de estas células puede evaluarse mediante la cuantificación por citometría de flujo (*Flourescence Activated Cell Sorting*, FACS) de células que expresen la proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP).

Las líneas CEM-GFP y MT2 son células linfoblásticas T CD4<sup>+</sup> humanas derivadas de leucemias linfoides agudas. La línea indicadora CEM-GFP fue transducida con el vector retroviral MV7neo-T4 y transfectada de manera estable con un vector que incluye la construcción LTR<sup>HIV-1</sup>/GFP [155]. Al igual que en las células GHOST, la infección viral de estas células puede evaluarse por cuantificación de la expresión de GFP mediante FACS. La línea MT2 está persistentemente infectada con el virus HTLV-1 y se caracteriza por formar sincicios durante la infección por HIV.

Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C, en atmósfera húmeda y con 5% CO<sub>2</sub>. Las células HEK 293T y GHOST X4/ R5 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle, Gibco® Life Technologies™) suplementado

con 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco®), 2mM L-glutamina (Gibco®), 100 U/ml penicilina (Gibco®) y 100 µg/ml estreptomicina (Gibco®). El medio de cultivo de las células GHOST contiene además 100 ug/ml higromicina, 500 ug/ml G418 (Sigma) y 1 ug/ml puromicina (Sigma). La línea MT2 fue cultivada en medio RPMI (Gibco®) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco®), 2mM L-glutamina (Gibco®), 100 U/ml penicilina (Gibco®) y 100 µg/ml estreptomicina (Gibco®). La línea CEM GFP fue cultivada en RPMI (Gibco®) completo suplementado con 500 ug/ml G418 (Sigma).

Todas las líneas usadas en este trabajo fueron obtenidas a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*.

#### ***III.2.2.4. Obtención de virus recombinante***

La línea celular 293T fue transfectada usando Lipoanfectamina 2000 (Invitrogen Life Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron  $1,5 \times 10^5$  células en placa de 12 pocillos las cuales fueron co-transfectadas con 1,2 ug del vector pNL correspondiente y 0,4 ug de pGFP como control de transfección. Luego de 48 h, las células fueron tripsinizadas, lavadas en PBS1x y resuspendidas en PBS1x. La expresión de GFP se determinó por FACS. El sobrenadante se guardó a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la determinación de antígeno (Ag) p24 por ELISA.

#### ***III.2.2.5. Preparación de stocks virales***

Los *stocks* virales fueron obtenidos a partir del sobrenadante de la transfección mencionada arriba.  $1.5 \times 10^6$  células de la línea MT2 fueron infectadas en un

volumen de 500 uL del sobrenadante de transfección. Luego de 3 días, los sobrenadantes de dichos cultivos fueron cosechados, clarificados, alicuotados y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser usados. Se determinó la concentración de Ag p24 por ELISA (Murex, Abbot).

### ***III.2.2.6. Evaluación de infectividad y capacidad replicativa***

La infectividad de los virus recombinantes se evaluó utilizando la línea celular GHOST X4/ R5 mediante citometría de flujo; la infección promueve la expresión de GFP y permite identificar las células infectadas por su fluorescencia.. Brevemente,  $1.25 \times 10^5$  células fueron infectadas por triplicado con cantidades crecientes de Ag p24 de cada *stock* viral. Las infecciones se llevaron a cabo por incubación durante 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera húmeda y 5%  $\text{CO}_2$ . Luego, las células se lavaron con PBS 1x para retirar el inóculo y se incubaron en DMEM 10% SFB. Cuarenta y ocho horas post-infección (p.i.), las células fueron tripsinizadas, lavadas en PBS 1x y fijadas en PFA 1% en PBS 1x. Luego de un lavado final con PBS 1x, el pellet final se resuspendió en PBS1x y se evaluó el porcentaje de células fluorescentes por FACS. En los siguientes experimentos (Capacidad replicativa y Competencia *in vitro*), se utilizó una concentración de Ag p24 de los stocks virales que fuera capaz de infectar el 10% de las células GHOST.

Para evaluar la capacidad replicativa, cultivos de células linfoides MT2 fueron infectados por triplicado con los *stocks* virales utilizando la cantidad necesaria para obtener 10% de infección, siguiendo los valores de infectividad obtenidos

en el punto anterior. Las infecciones se llevaron a cabo por incubación durante 2 horas a 37°C en atmosfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> con los *stocks* virales. Luego de la infección, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x y se mantuvieron en medio de cultivo RPMIc. A diferentes tiempos post-infección se obtuvieron alícuotas de los sobrenadantes de los cultivos celulares para evaluar la capacidad replicativa, mediante la determinación cuantitativa de producción de Ag p24, utilizando un ELISA comercial específico (Murex, Abbot). Se realizaron 3 ensayos independientes, cada uno por triplicado.

### ***III.2.2.7. Evaluación de procesamiento de Gag***

Cultivos de la línea celular MT2 fueron infectados con cada uno de los virus recombinantes obtenidos (NL-Gag/Pro), y con el virus NL4-3 tipo salvaje como control, como se describió en la sección anterior. A diferentes tiempos post-infección, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo, conteniendo partículas virales libres, y las células de cada cultivo realizado. Las partículas virales fueron purificadas por centrifugación en colchón de sacarosa 20% y se estandarizó el contenido de p24 de cada uno por ELISA (Kit). Las células fueron lisadas con *buffer* RIPA y *cocktail* de inhibidores de proteasa. Los lisados fueron clarificados por centrifugación y cuantificados sus contenidos proteicos (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Las proteínas solubilizadas y las preparaciones de partículas virales purificadas, fueron utilizadas para su separación por SDS-PAGE y análisis por *Western blotting* (WB). Los productos resultantes del procesamiento de Pr55Gag fueron

analizados por inmunoblot cualitativo [156], utilizando anticuerpos específicos contra CA (Sigma-Aldrich, Santa Cruz Biotechnology Inc, Pierce).

### ***III.2.2.8. Ensayo de competición viral in vitro***

El ensayo de competición viral *in vitro* fue realizado infectando, por duplicado, células CEM-GFP con los stocks virales NL-B, NL-F, NL-12BF-*like* y NL-28BF-*like*. Luego de 48 h p.i. se evaluó el porcentaje de células fluorescentes por FACS y el número total de células viables en cada cultivo por *Trypan Blue*. Posteriormente, se realizaron las mezclas de las células infectadas previamente con los *stocks* virales NL- B, NL- F1, NL-12BF-*like* y NL-28BF-*like*, en una relación 1:1. Las infecciones se llevaron a cabo por incubación durante 2 horas a 37°C en atmosfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> con las mezclas de células infectadas. Luego de la infección, las células se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 10% SFB. Cada 72 h la mitad del cultivo era cosechado y reemplazado por células y medio de cultivo fresco. Las infecciones fueron mantenidas durante 15 días, realizándose toma de sobrenadante de cultivo en los días 1, 5 y 11 pi. El ARN total fue extraído a partir de sobrenadante de cultivo usando un kit comercial (QIAamp ARN Mini kit, QIAgen), y se amplificó por RT-PCR la región codificante para Gag (posición 623 a 2040 del genoma de HIV-1 HXB2) usando la Transcriptasa Reversa M-MLV (Invitrogen™, Life Technologies™) y luego una ADN polimerasa de alta fidelidad (Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen™, Life Technologies™). Los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de ciclado se muestran en las tablas 5, 6 y 7, respectivamente.

**Tabla 5: Nombre, posición y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen *gag* de HIV-1**

ID	Posición (HXB2)	Secuencia
<b>1<sup>era</sup> ronda</b>		
LTR3	128 → 148	5'-AGAAATTGCAGGGCCCCTAGGAA
F2	3321→3301	5'-GTATGTCATTGACAGTCCAGC
<b>2<sup>da</sup> ronda</b>		
Msf12b	623 → 649	5'- AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG
g17	2040 → 2017	5'-TCCACATTTCCAACAGCCCTTTTT

**Tabla 6: Condiciones para la transcripción reversa del fragmento *gag* de HIV-1**

1 ciclo	65 °C	5 min
	4 °C	5 min
	37 °C	50 min
	70 °C	15 min

**Tabla 7: Condiciones de ciclado para la amplificación del fragmento *gag* de HIV-1**

	1 <sup>era</sup> ronda		2 <sup>da</sup> ronda*	
<b>30 ciclos</b>	94 °C	3 min	94 °C	3 min
	94 °C	30 seg	94 °C	30 seg
	55 °C	30 seg	58 °C	30 seg
	72 °C	1 min	72 °C	1 min
	72 °C	2 min	72 °C	2 min

\*Condiciones de ciclado para la amplificación del fragmento a partir del lisado de bacterias

El amplicón obtenido (1417 pb), fue purificado (QIAquick gel purification kit, QIAGEN) y ligado en el vector comercial pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de ligación se utilizó para transformar la cepa de *Escherichia coli* DH5α químicamente competente. La selección del inserto de *gag* se realizó en placas con medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml, X-Gal 50 ng/ml e IPTG 10 µM. Las colonias blancas

obtenidas se sometieron a un *screening* mediante PCR directa sobre lisado de las mismas. Un promedio de 30 colonias positivas por cada día de toma de muestra fue secuenciado, lo que permitió evaluar la frecuencia de cada variante en la población viral en función del tiempo transcurrido post- infección.

### ***III.2.2.9. Análisis estadístico***

Los datos son presentados como medias  $\pm$  DS. La comparación entre las medias obtenidas se realizó por medio de un *test* paramétrico (*T test*), utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism 4. En todos los análisis estadísticos se consideró un nivel de significancia de 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## ***IV. RESULTADOS***

## ***IV. 1. Caracterización de infecciones dobles***

Con el objetivo de analizar la variabilidad genómica de HIV-1 a lo largo del tiempo en individuos positivos con conductas de alto riesgo para la infección, se obtuvieron los consentimientos informados y muestras de sangre, de 27 individuos. De todos ellos, se obtuvo información sobre conductas, carga viral, recuento de linfocitos T CD4+, co-infecciones y tratamiento antirretroviral.

### ***IV. 1.1. Características generales de la población***

El tiempo promedio de infección entre los individuos incluidos en el estudio fue de 9 años. La edad media de los participantes fue de 40 años, con un intervalo de 18 a 66 años, y el 82.27 % de ellos fueron hombres. Del total de individuos reclutados, se obtuvieron 2 o más muestras de 7 individuos con un periodo de 6-9 meses entre cada muestra. Los datos de los individuos estudiados se resumen en la Tabla 8.

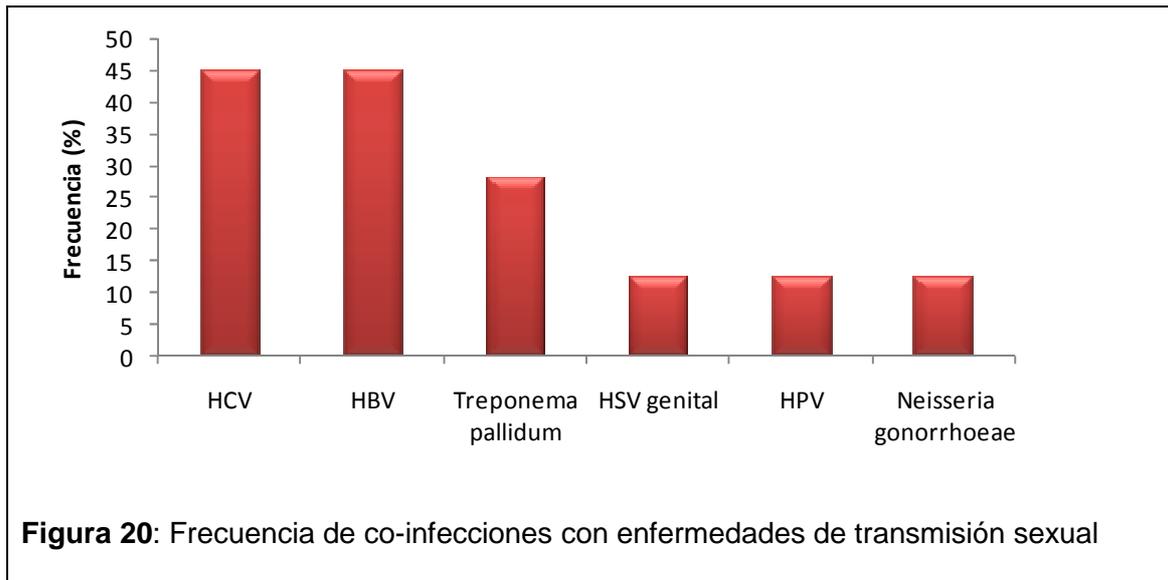
**Tabla 8:** Características clínicas de los individuos estudiados

ID	Fecha de diagnóstico	Tiempo desde el diagnóstico positivo	Factor de riesgo	CD4 <sup>+</sup>	Carga viral	Tratamiento
I01	2000	6	HSH- HSM	>400	<50	AZT/ 3TC/7 EFV <sup>(*)</sup>
				>400	<50	
I02	1993	6	HSH- HSM	400	50	Sin tratamiento
				400	50	
I03	1998	4	UDI	400	200	Sin tratamiento <sup>(**)</sup>
				680	200	
I04	1989	19	UDI- múltiples intercambios sexuales sin protección	573	216	3TC/ ABC/ SQV/r
				344	2905	
I05	1993	12	UDI- pareja bisexual	368	<50	AZT/3TC/EFV
				431	<50	
I06	2000	19	UDI, HSH- HSM	335	76234	ZDV/ 3TC/ EFV
				235	2028	
I07	2000	8	UDI- encuentros esporádicos con hombres	250	<50	ddl/ d4T/ NVP
				250	>50	d4T/ 3TC/ NfV

En los casos en los cuales no se conoce el tiempo de seroconversión, se estimó, de acuerdo a la historia clínica del individuo, la fecha más probable de infección. Se indica el número de linfocitos CD4<sup>+</sup>/ ml de sangre al momento de la toma de muestra. La carga viral se expresa en número de copias de ARN viral/ ml de plasma. En la tabla se indica el tratamiento antirretroviral en el momento de la toma de la muestra: AZT, zidovudina; 3TC, lamivudina; ddl, didanosina; ABV, abacavir; EFV, efavirenz; KLT, kaletra; d4T, estavudina; SQV/r, saquinavir/ lopinavir; NVP, nevirapina.

(\*) Interrupción de tratamiento 1 años antes; (\*\*) Tratamiento anterior: ddl/ d4T/ NVP.

Las co-infecciones más frecuentes fueron HCV (45,16%), HBV (45,16%), *Treponema pallidum* (28,12%), HSV genital (12,5%), HPV (12,5%) y *Neisseria gonorrhoeae* (12,5%) (Figura 20). Entre los participantes, el 53,12 % admitieron utilizar drogas inyectables y el 68,75 % declararon tener relaciones con individuos de ambos sexos.



#### ***IV. 1.2. Detección y características generales de infecciones dobles***

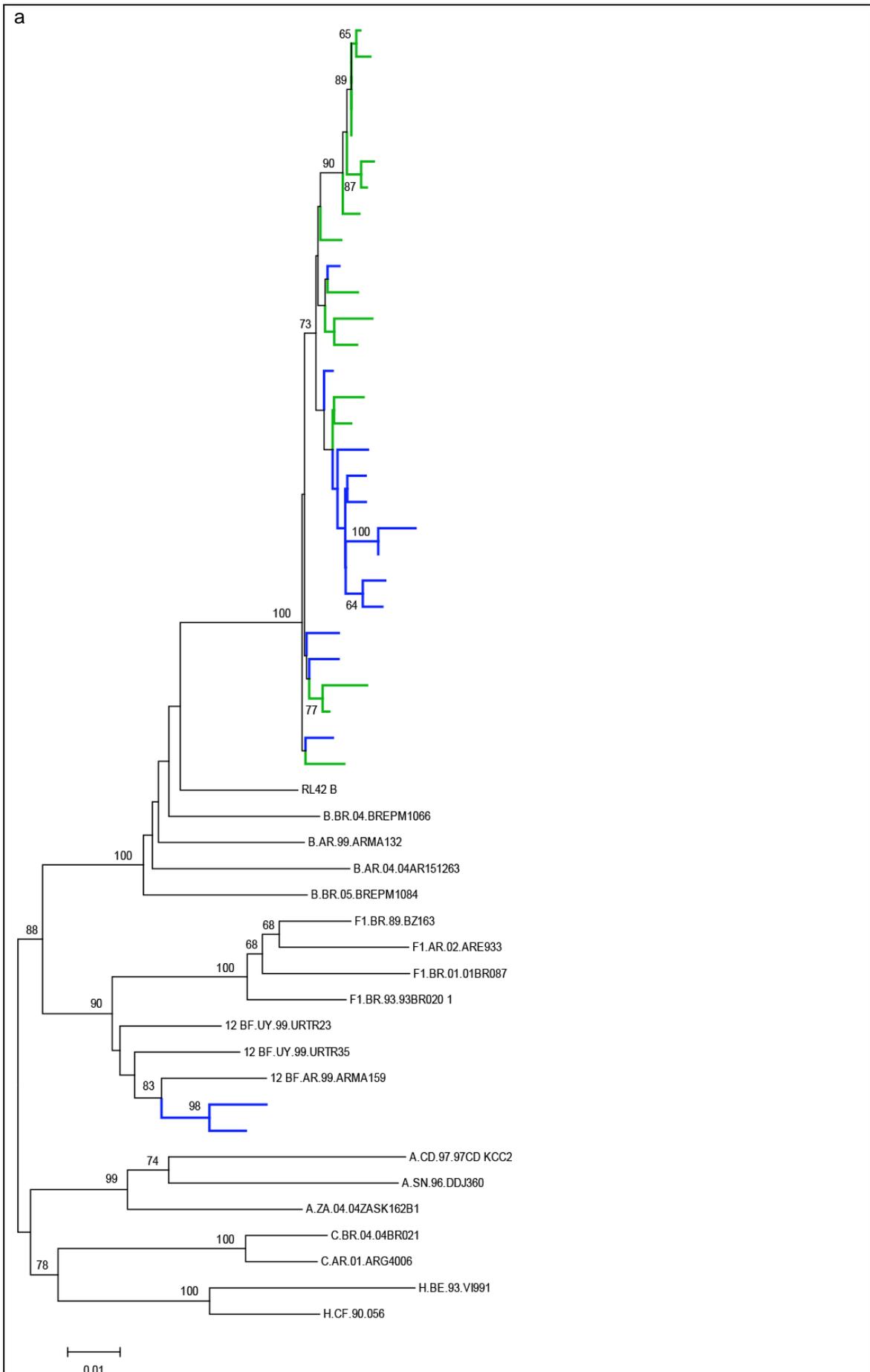
Para determinar la presencia de secuencias virales correspondientes a distintos subtipos en una misma muestra de ADN se realizaron diluciones seriadas hasta encontrar la menor dilución en la que aproximadamente el 50% de las repeticiones fueran positivas para la PCR de un fragmento de 1141 pb de *pol*. Cada amplicón se secuenció utilizando 8 cebadores específicos para la región de interés. Las secuencias fueron alineadas con secuencias de referencia de distintos subtipos y con secuencias de Argentina. Los árboles filogenéticos se obtuvieron mediante el método de NJ utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura ( $t_s/t_v=2$ ) con el programa Mega 4.1. Los análisis filogenéticos revelaron la presencia de 3 individuos con infecciones duales de los 7 analizados (I01, I02 y I03).

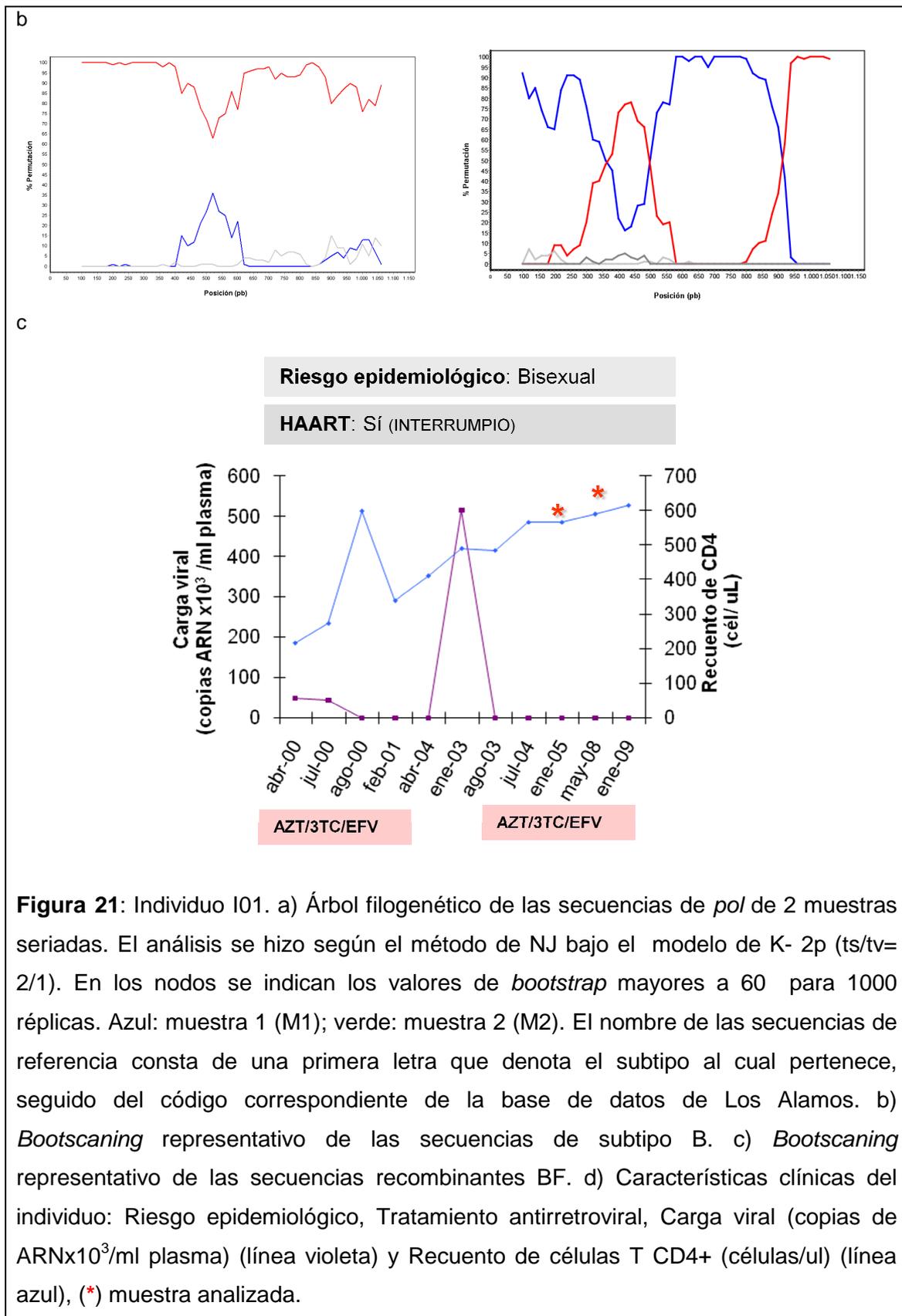
### ***IV.1.2.1. Individuo I01***

Quince secuencias de la primera muestra (M1) y 16 secuencias de la segunda muestra (M2) se obtuvieron mediante SGA. Dos secuencias de M1 agruparon junto con el *cluster* de secuencias recombinantes BF mientras que las 13 restantes lo hicieron con secuencias de referencia de subtipo B (*bootstrap*>60). El patrón de recombinación de estas dos secuencias fue confirmado usando la herramienta *bootscanning* del programa SIMPLOT v3.5.1 (Figura 21).

El diagnóstico de la infección por HIV-1 en este individuo se realizó en el año 2000 y el mismo declaró como factor de riesgo haber mantenido relaciones sexuales con personas de ambos sexos (Tabla 8). El tratamiento antirretroviral con ZDV, 3TC y EFV se inició a partir de la fecha de diagnóstico y fue discontinuado, sin indicación médica, en el año 2002 durante un periodo de 1 año y medio. Sin embargo, durante el periodo de toma de muestra el individuo estaba nuevamente bajo tratamiento, con CV indetectable, recuento de CD4 > 400 células/uL y clínicamente asintomático (Figura 21).

Sólo secuencias de subtipo B presentaron las mutaciones de resistencia K103N (NNRTI) y M184V (NRTI), en M1 y M2, respectivamente (Tabla 9).

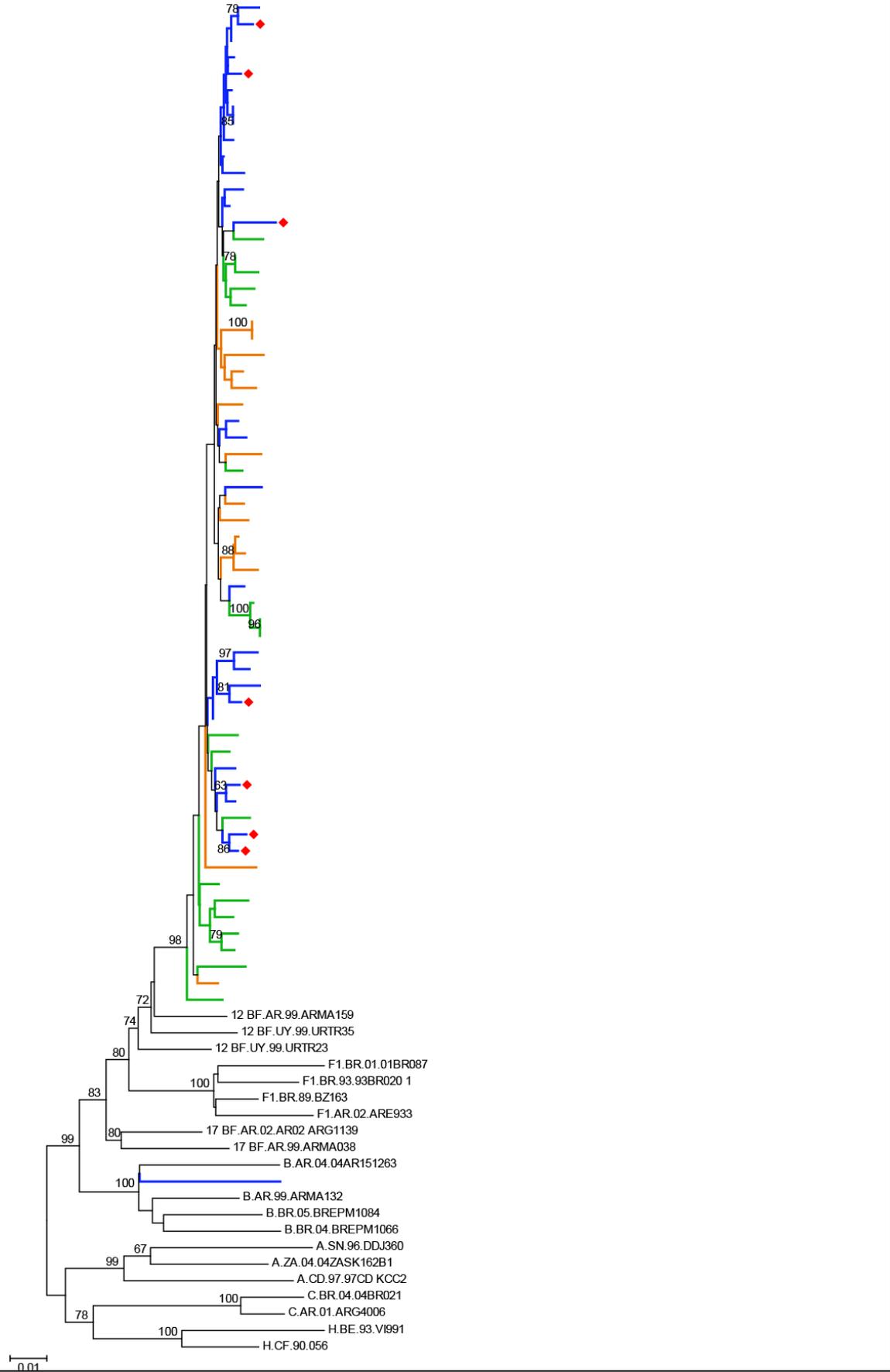


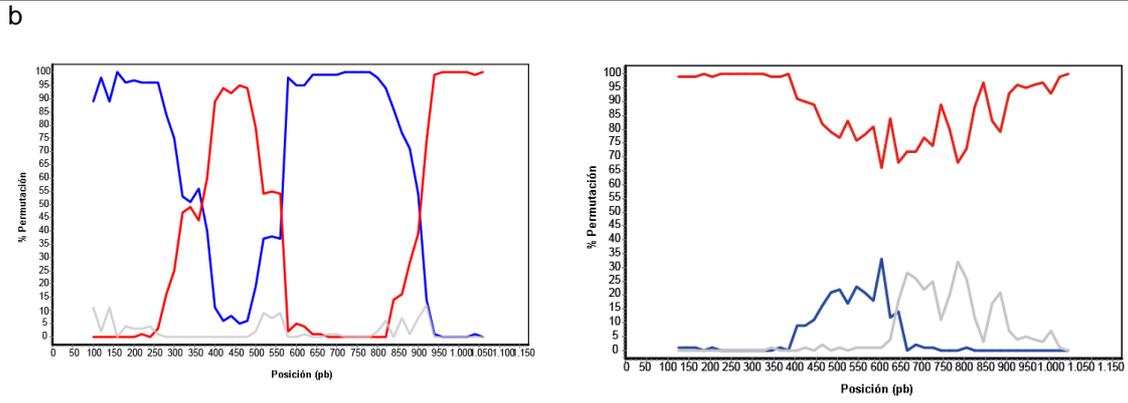


#### ***IV. 1.2.2. Individuo I02***

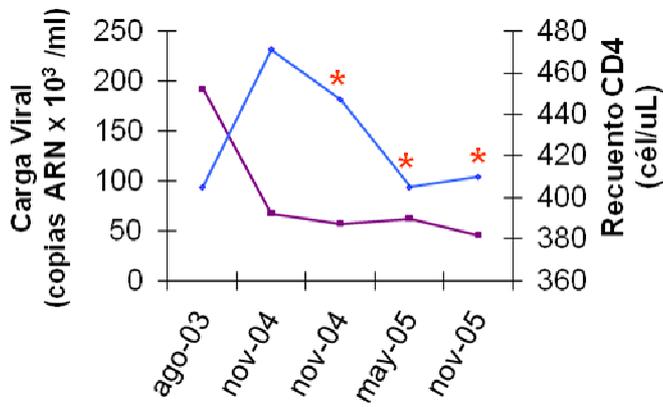
Treinta y dos secuencias amplificadas a partir de ADN (20 secuencias) y ARN (11 secuencias) de la M1 fueron obtenidas mediante SGA. Como se observa en la figura 22, una secuencia agrupó junto a las referencias de subtipo B mientras que las restantes formaron parte del *cluster* de las recombinantes BF (*bootstrap* >60%). Tanto la subtipificación como el patrón de recombinación fueron confirmadas por *bootscanning* (Figura 22 b). La segunda muestra fue obtenida 6 meses después y se obtuvieron 22 secuencias amplificadas a partir de ADN proviral. Todas las secuencias agruparon con referencias de recombinantes BF con un valor de *bootstrap* >60%. Luego de 18 meses, se tomó la tercer muestra (M3) y se obtuvieron 22 secuencias amplificadas a partir de ADN proviral. Al igual que las secuencias de las muestras anteriores, todas las secuencias agruparon con el *cluster* de recombinantes BF (*bootstrap* >60%). Este individuo fue diagnosticado en 1993 pero de acuerdo a las conductas declaradas por él mismo, es probable que la fecha de infección fuera anterior. Quince años antes de la toma de la primera muestra, este individuo se encontraba cumpliendo una condena, durante la cual declaró haber tenido intercambio sexual con hombres, sin embargo, desde su liberación declaró sólo relaciones heterosexuales. Su pareja femenina también era HIV+ con infecciones con HBV y HCV y reportó como conducta de riesgo ser UDI. I02 era un paciente clínicamente asintomático durante el periodo de muestreo, con valores de carga viral  $\leq 50$  copias/ml y recuento de linfocitos T CD4 alrededor de las 400 células/ul. Este individuo nunca estuvo bajo HAART (Tabla 9) y el análisis de resistencia mostró que sólo una secuencia CRF12\_BF de M2 tenía la mutación K70R.

a





**Riesgo epidemiológico: UDI/Bisexual**  
**HAART: No**

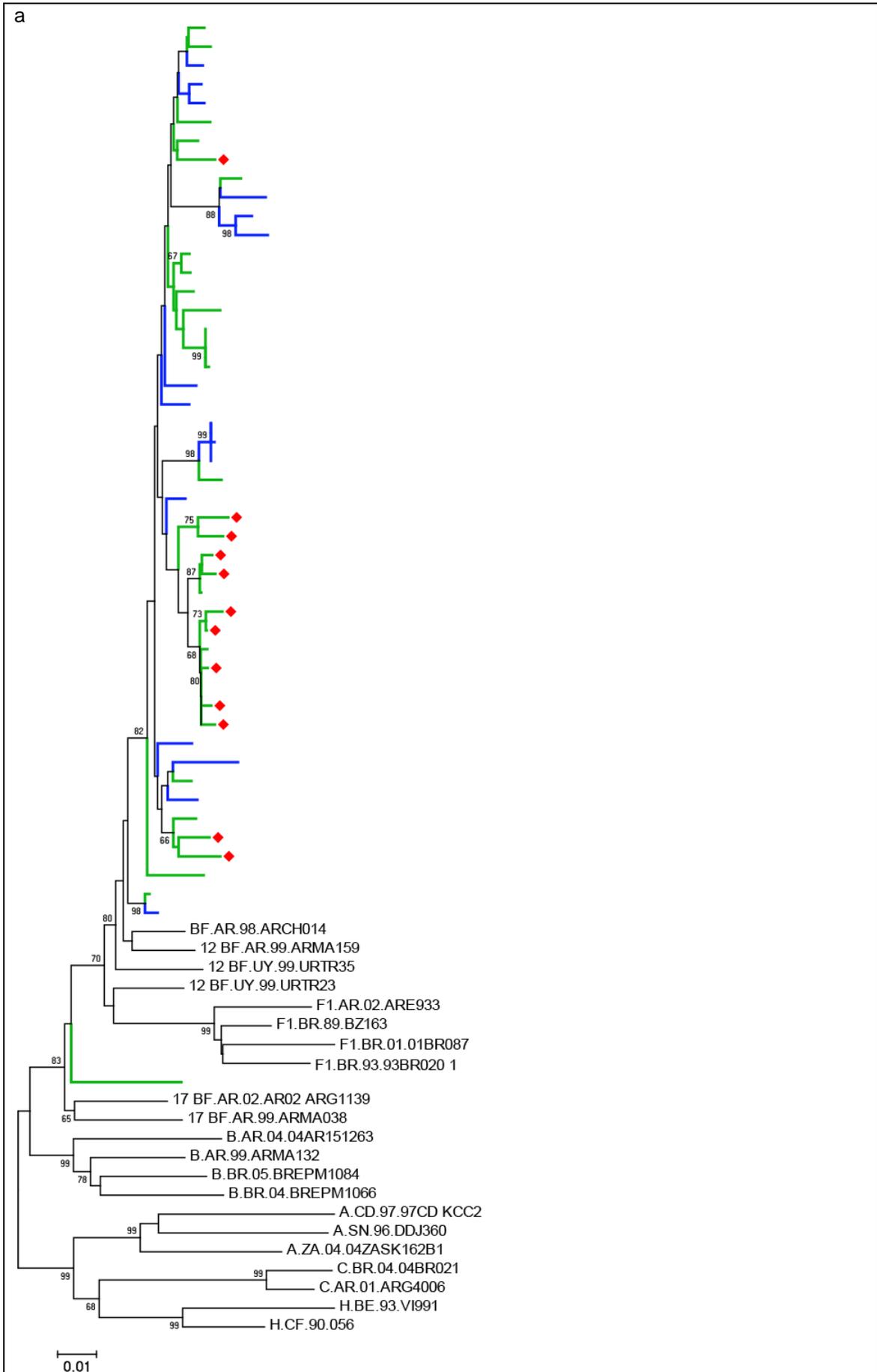


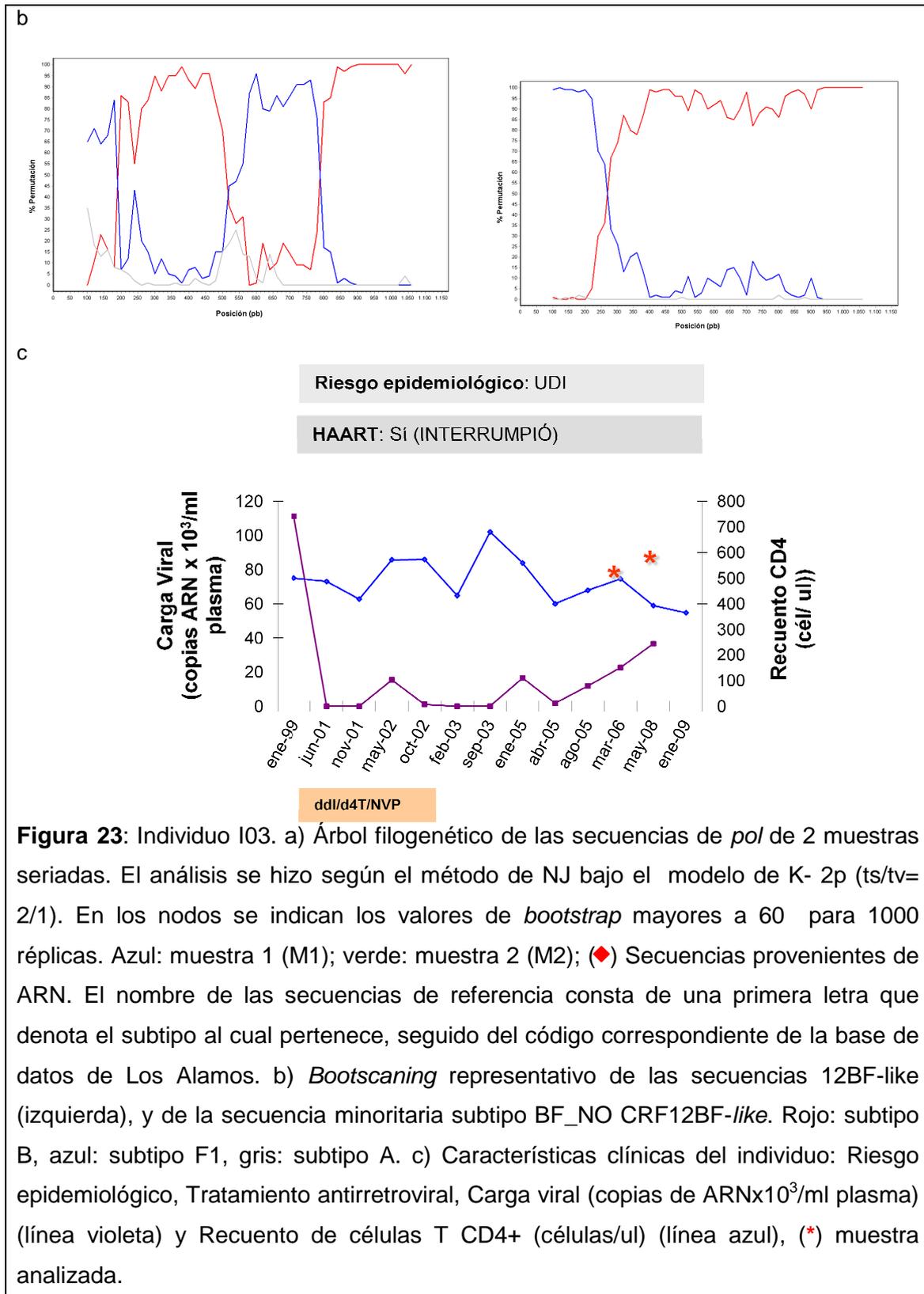
**Figura 22:** Individuo I02. a) Árbol filogenético de las secuencias de *pol* de 3 muestras seriadas. El análisis se hizo según el método de NJ bajo el modelo de K- 2p (ts/tv= 2/1). En los nodos se indican los valores de *bootstrap* mayores a 60 para 1000 réplicas. Azul: muestra 1 (M1); verde: muestra 2 (M2); naranja: muestra 3 (M3); (♦) secuencias provenientes de ARN. El nombre de las secuencias de referencia consta de una primera letra que denota el subtipo al cual pertenece, seguido del código correspondiente de la base de datos de Los Alamos. b) *Bootscaning* representativo de las secuencias BF (izquierda), y de la secuencia minoritaria subtipo B. Rojo: subtipo B, azul: subtipo F1, gris: subtipo A. c) Características clínicas del individuo: Riesgo epidemiológico, Tratamiento antirretroviral, Carga viral (copias de ARNx10<sup>3</sup>/ml plasma) (línea violeta) y Recuento de linfocitos T CD4+ (células/uL) (línea azul), (\*) muestra analizada.

### ***IV. 1.2.3. Individuo I03***

Doce secuencias de M1 amplificadas a partir de ADN proviral mediante SGA agruparon junto con referencias de recombinantes CRF12\_BF con un valor de *bootstrap* significativo (>60%). En M2, además de ADN proviral, se analizaron 8 secuencias obtenidas a partir de ARN circulante. Todas las secuencias, a excepción de una, agruparon con referencias de la CRF12\_BF. El análisis del patrón de recombinación mostró que esta secuencia era una recombinante BF con un patrón de recombinación diferente al de la CRF12\_BF (Figura 23).

Este individuo fue diagnosticado en 1998, declaró ser UDI como único factor de riesgo y estaba coinfectado con HCV. Durante el periodo del estudio, este individuo se mantuvo asintomático con CV alrededor de las 200 copias/ml y valores de CD4 relativamente altos (entre 400 y 680 células/uL). El paciente recibió tratamiento antirretroviral a partir del año 2001 (ddl, d4T y NVP) pero fue interrumpido por recomendación médica. En 2 secuencias de M1 y una secuencia de M2 se encontraron las mutaciones Y181C y H221Y, mientras que 1 secuencia de M2 portaba la mutación D67G (Tabla 9).



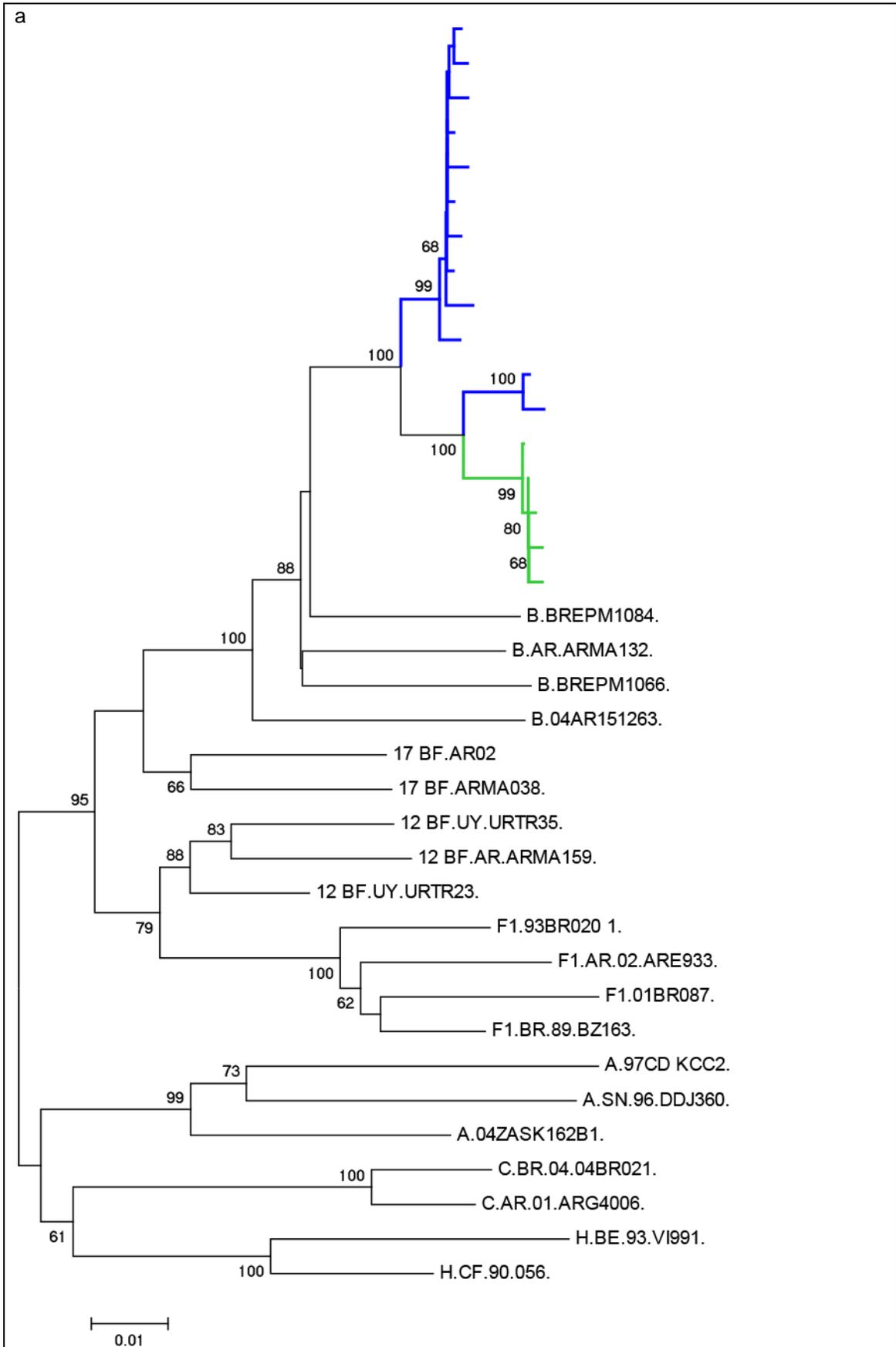


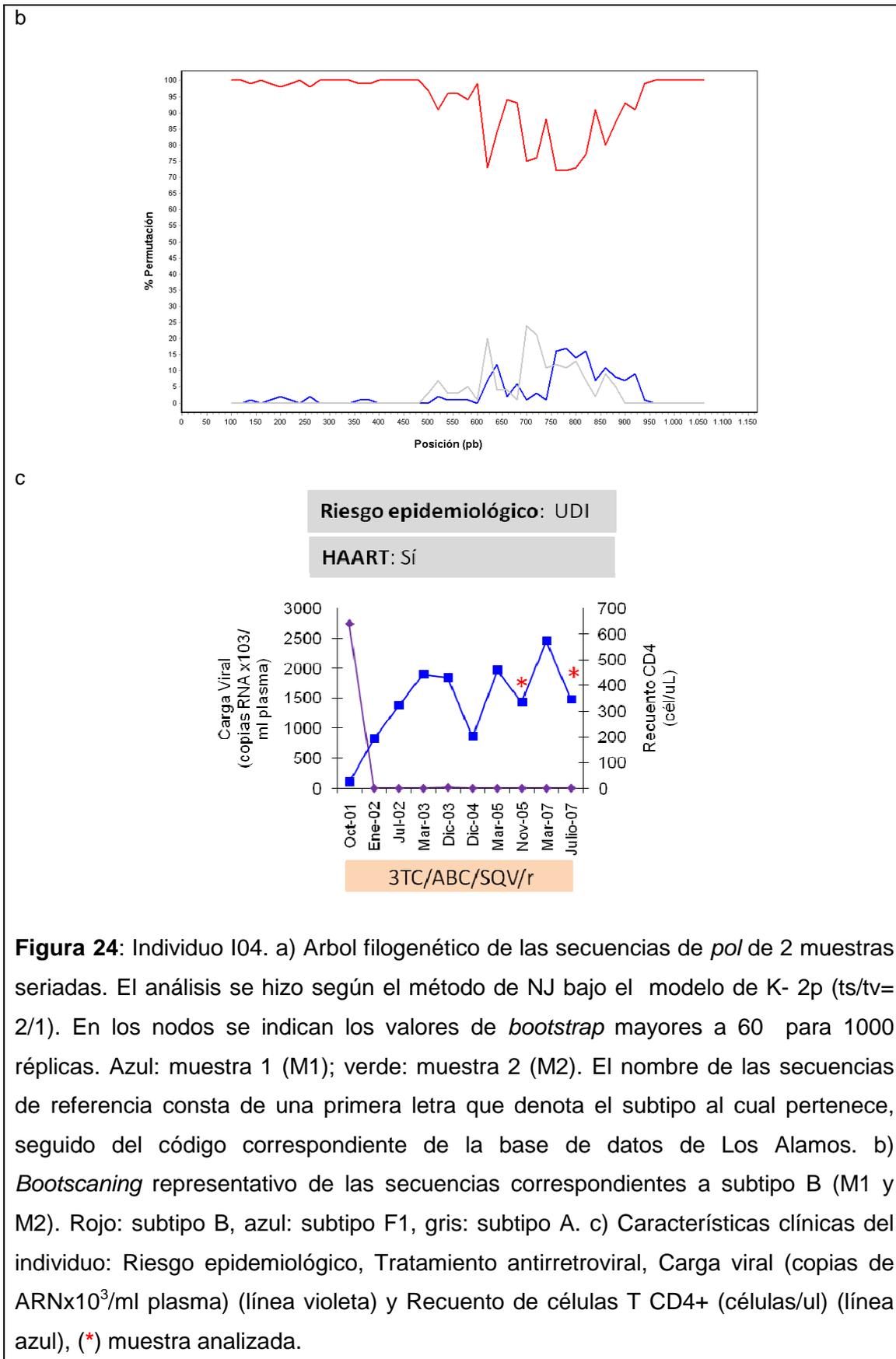
### ***IV.1.3. Características generales de individuos con infección simple para HIV-1***

#### ***IV.1.3.1. Individuo I04***

Doce secuencias de la M1 y 5 secuencias de la M2 fueron obtenidas mediante SGA. Todas las secuencias agruparon en el *cluster* de las referencias de subtipo B con un valor de *bootstrap* >60%. Asimismo, las secuencias de M1 y de M2 se separaron en *clusters* diferentes con un valor de *bootstrap* significativamente alto (100%) (Figura 8). Sin embargo, el análisis de distancia arrojó un valor menor al 5% ( $d= 2.5 \%$ ). El análisis de mutaciones de resistencia en las secuencias de ambas muestras mostró que la mayoría de las secuencias de M1 no poseían mutaciones de resistencia a excepción de dos que presentaron las mutaciones M184V y K219Q a NRTI y la mutación A98G de resistencia a NNRT. Por el contrario, todas las secuencias de M2 poseían las mutaciones de resistencia a NRTI D67N, K70R, M184V y K219Q y la mutación A98G de resistencia a NNRTI.

Este individuo fue diagnosticado en 1989. Como factores de riesgo para la infección, declaró ser UDI y mantener relaciones sexuales tanto con hombres como con mujeres. Antes de la toma de la primera muestra presentó coinfección con HBV y tuvo un episodio de sífilis. Desde el año 2000 se encontraba bajo tratamiento antirretroviral con 3TC/ ABC/ SQV/r. Según su historia clínica y sus propias declaraciones nunca había discontinuado el tratamiento. Sus valores de células T CD4+ fueron mayores a 350 células/ul y su CV se mantuvo alrededor de las 100 copias/ ml durante el estudio.



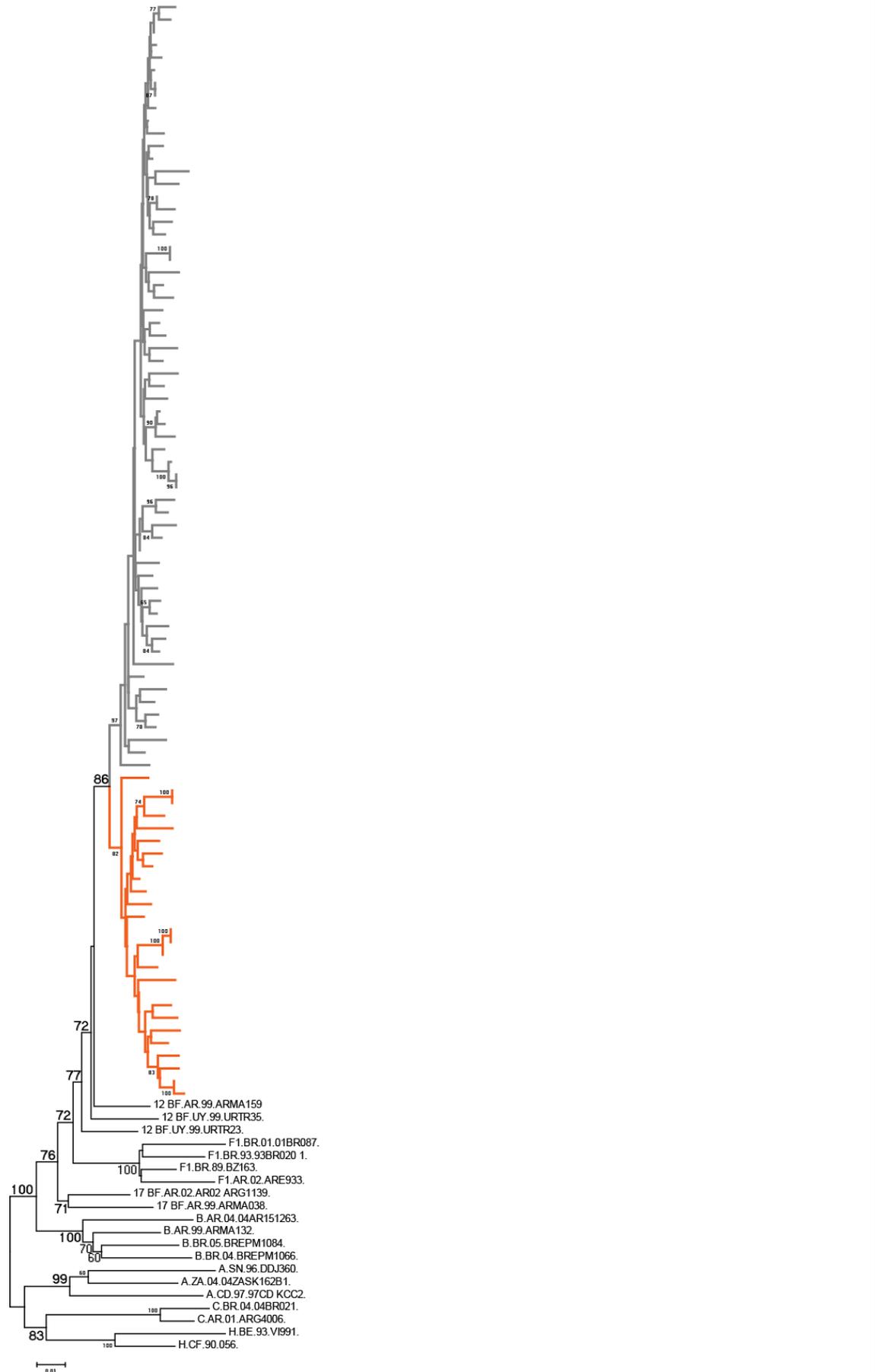


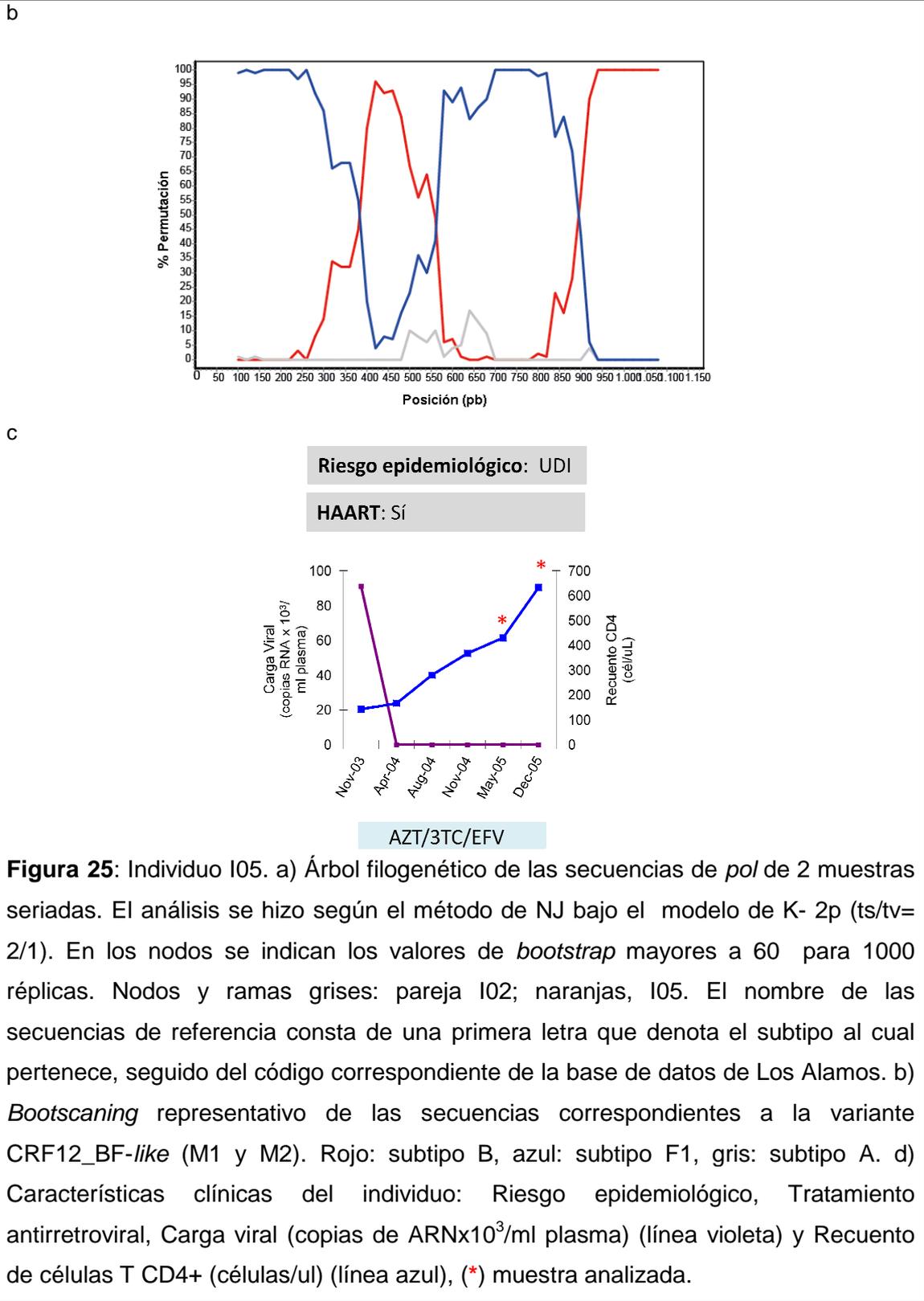
#### ***IV. 1.3.2. Individuo I05***

Trece secuencias de M1 y M2 fueron obtenidas mediante SGA y todas se entremezclaron en el mismo *cluster* de las referencias CRF12\_BFs. El patrón de recombinación de la región de *pol* amplificada se confirmó por *bootscanning* (Figura 25).

Esta paciente fue diagnosticada en 1993. Sin embargo, no concurrió a ningún centro asistencial desde esa fecha hasta el año 2003 cuando empezó a asistir a FUNDAI. Su pareja era un UDI y mantenía relaciones sexuales con hombres y mujeres descrito bajo el nombre de I02. El análisis conjunto de las secuencias de ambos individuos sugirió un origen en común entre ellas (Figura 25). Su CV siempre fue menor a 50 copias/ ml de plasma y su conteo de células T CD4+ era mayor a 500 células/ul y. Desde el año 2003 y durante el tiempo de muestreo se encontraba bajo tratamiento con ATZ/ 3TC/ EFV. Sin embargo, no se detectaron mutaciones de resistencia en ninguna muestra analizada.

a



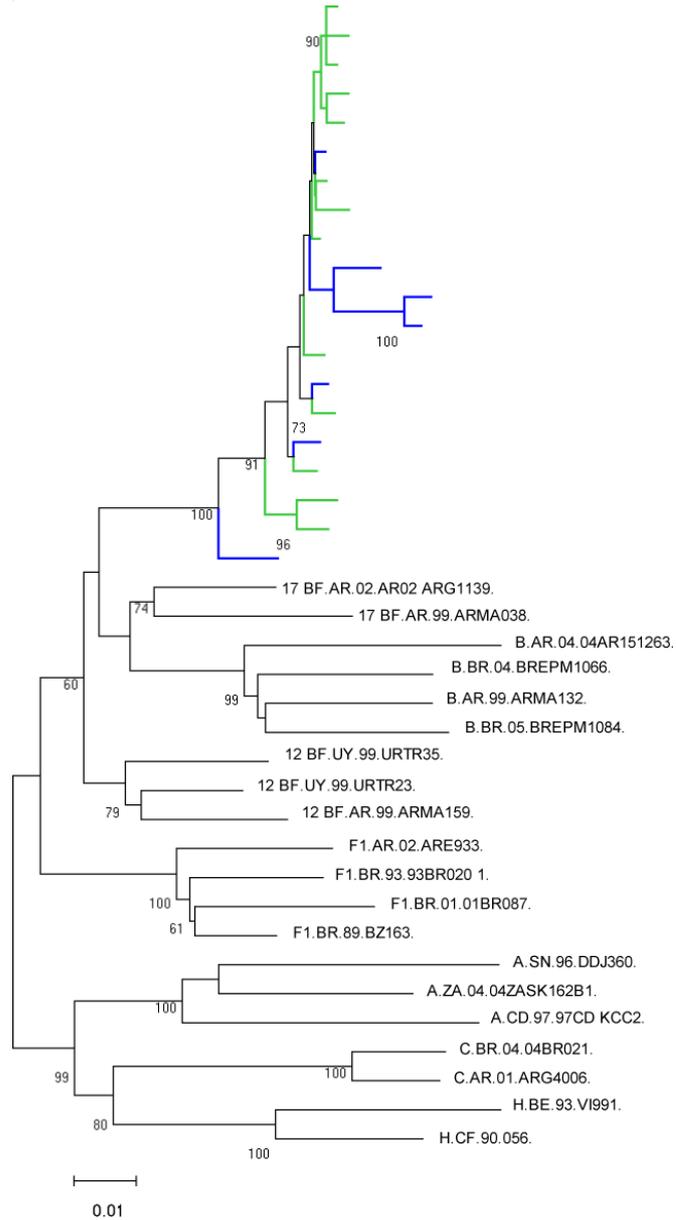


### ***IV.1.3.3. Individuo I06***

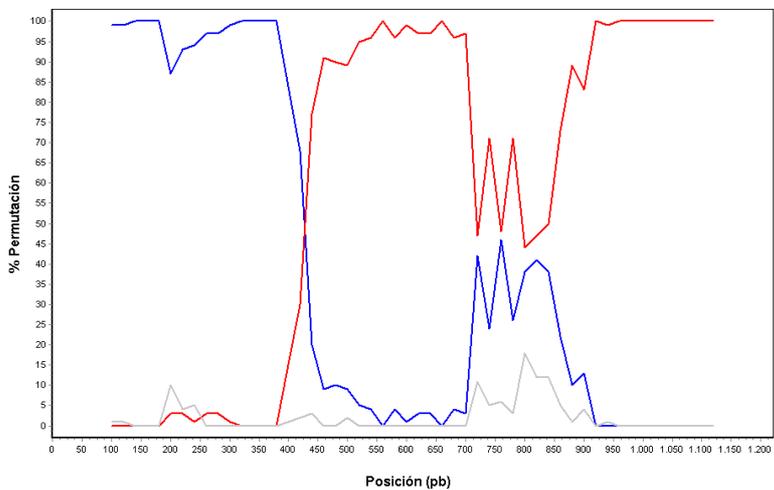
Siete secuencias de la M1 y 13 secuencias de la M2 se obtuvieron mediante SGA. Todas las secuencias se entremezclaron en un solo *cluster* cercano a las referencias de recombinantes BF. El análisis de *bootscanning* reveló que las secuencias de ambas muestras poseían un patrón de recombinación diferente al de la CRF12\_BF (Figura 26). Además, todas las secuencias analizadas presentaban la mutación de resistencia a PI L10V.

Este individuo fue diagnosticado en 1989 y reportó como conducta de riesgo ser UDI y mantener relaciones sexuales con individuos de ambos sexos. En su historia clínica se registraron co-infecciones con HBV y HCV. Desde el año 2000 se encontraba bajo tratamiento con diferentes combinaciones de antirretrovirales y sus cargas virales eran fluctuantes. En el momento de la toma de M1 había interrumpido el tratamiento sin indicación médica y su carga viral era de 76000 copias/ml. El tratamiento antirretroviral anterior a la interrupción había consistido en LPV/r/ ABV/ EFV. Durante el periodo que se tomó la segunda muestra el tratamiento había sido retomado, esta vez con ddI/ ABV/ KLT. Su conteo de células T CD4+ durante M1 había descendido de >600 células/ ml a 300 células/ ml y su carga viral había aumentado de <50 copias/ ml a 76000 copias/ ml.

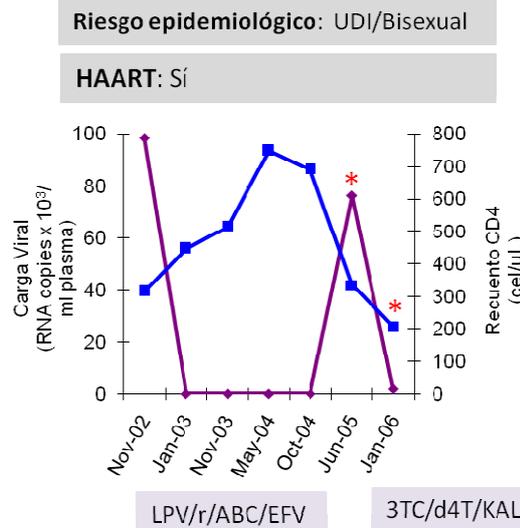
a



b



c



**Figura 26:** Individuo I06. a) Arbol filogenético de las secuencias de *pol* de 2 muestras seriadas. El análisis se hizo según el método de NJ bajo el modelo de K- 2p (ts/tv= 2/1). En los nodos se indican los valores de *bootstrap* mayores a 60 para 1000 réplicas. Azul: muestra 1 (M1); verde: muestra 2 (M2). El nombre de las secuencias de referencia consta de una primera letra que denota el subtipo al cual pertenece, seguido del código correspondiente de la base de datos de Los Alamos. b) *Bootscreening* representativo de las secuencias correspondientes a la variante BF NO-CRF12BF-*like* (M1 y M2). Rojo: subtipo B, azul: subtipo F1, gris: subtipo A. c) Características clínicas del individuo: Riesgo epidemiológico, Tratamiento antirretroviral, Carga viral (copias de ARN $\times 10^3$ /ml plasma) (línea violeta) y Recuento de células T CD4+ (células/ul) (línea azul), (\*) muestra analizada.

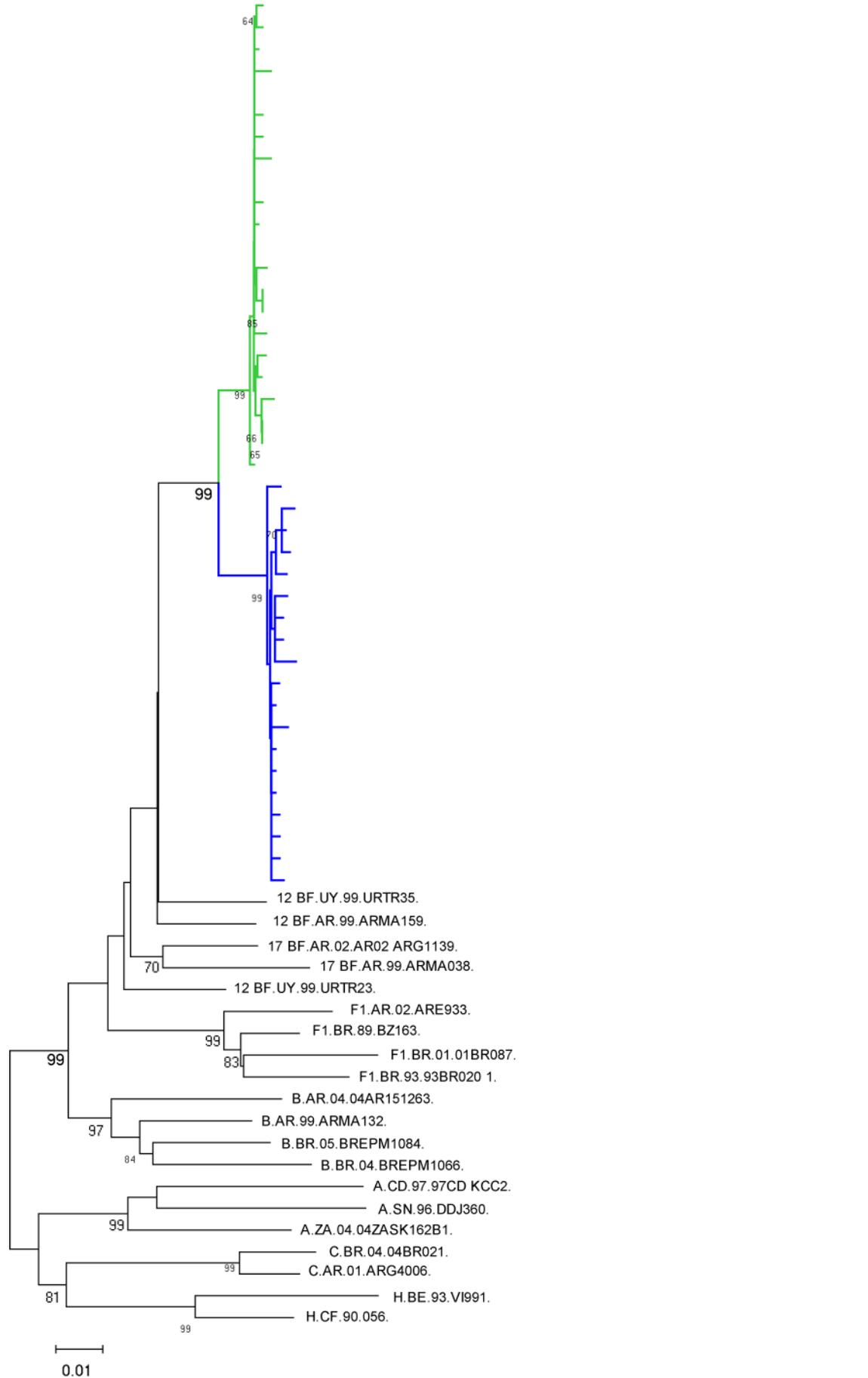
#### IV.1.3.4. Individuo I07

Diecinueve secuencias de cada muestra fueron obtenidas por SGA. Las secuencias de cada muestra se agruparon en *clusters* distintos, soportado por un valor de *bootstrap* significativamente alto (>90%). Sin embargo, la distancia entre las secuencias de ambas muestras fue menor a 5% (d=2.3%). El análisis del patrón de recombinación del fragmento analizado mostró que las secuencias correspondían a la CRF12\_BF (Figura 11).

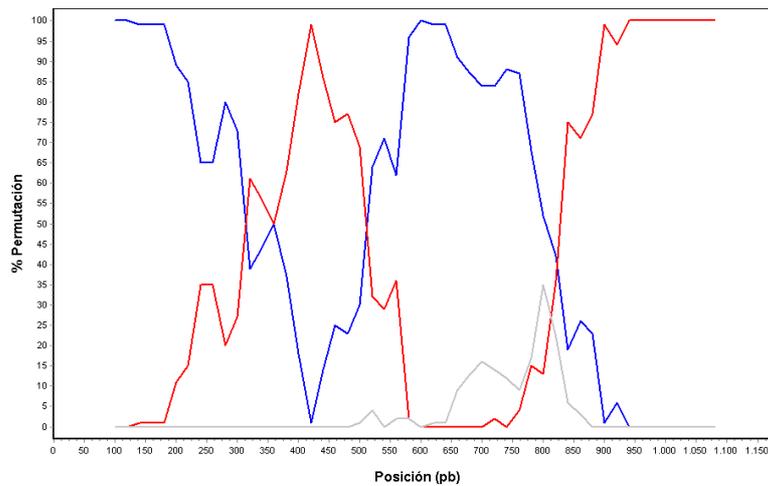
Este individuo fue diagnosticado en el año 2000 y reportó ser UDI con encuentros sexuales esporádicos con hombres. Desde el año 2001 se encontraba bajo tratamiento con diferentes combinaciones de antirretrovirales (ddl/ d4T/ NVP, d4T/ 3TC/ NFV) y sus cargas virales se mantuvieron en >50 copias/ml (Figura 27). Al momento del estudio, su conteo de células T CD4+ se mantenía alrededor de 250 células/ul. Curiosamente, todas las secuencias de M1 tenían las mutaciones D30N y M184V, las cuales se corresponden al tratamiento en curso. Sin embargo, ninguna secuencia de la M2 presentó mutaciones de resistencia.

En la tabla 9 se resumen las mutaciones de resistencia de todos los individuos analizados.

a



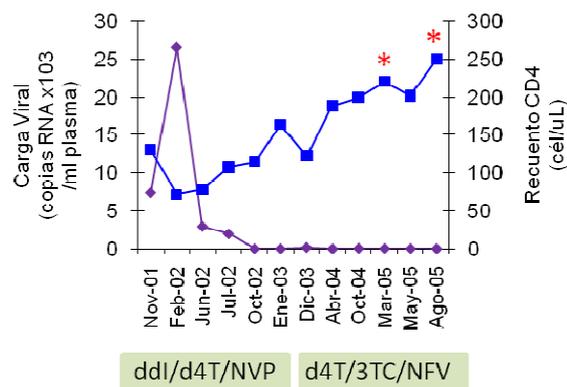
b



c

Riesgo epidemiológico: UDI/HSH

HAART: Sí



**Figura 27:** Individuo I07. a) Árbol filogenético de las secuencias de *pol* de 2 muestras seriadas. El análisis se hizo según el método de NJ bajo el modelo de K- 2p (ts/tv= 2/1). En los nodos se indican los valores de *bootstrap* mayores a 60 para 1000 réplicas. Azul: muestra 1 (M1); verde: muestra 2 (M2). El nombre de las secuencias de referencia consta de una primera letra que denota el subtipo al cual pertenece, seguido del código correspondiente de la base de datos de Los Alamos. b) *Bootscreening* representativo de las secuencias correspondientes a la variante BF NO-CRF12BF-*like* (M1 y M2). Rojo: subtipo B, azul: subtipo F1, gris: subtipo A. c) Características clínicas del individuo: Riesgo epidemiológico, Tratamiento antirretroviral, Carga viral (copias de ARNx10<sup>3</sup>/ml plasma) (línea violeta) y Recuento de células T CD4+ (células/ul) (línea azul), (\*) muestra analizada.

**Tabla 9:** Evolución del perfil de resistencia en los individuos con infecciones dobles vs infección simple

Individuo	Muestra	Subtipo principal		Subtipo minoritario	
		Prot	RT	Prot	RT
			<b>Subtipo B</b>		<b>CRF12_BF-like</b>
I01	M1	Ninguna	K103N, M184V	Ninguna	Ninguna
	M2	Ninguna	K103N, M184V		No detectado
			<b>CRF12_BF-like</b>		<b>Subtipo B</b>
I02	M1	I47V	Ninguna	Ninguna	Ninguna
	M2	Ninguna	K70R		No detectado
			<b>CRF12_BF-like</b>		<b>Recombinante BF (no CRF12)</b>
I03	M1	Ninguna	Y181C/ H221Y		No detectado
	M2	Ninguna	Y181C	Ninguna	Ninguna
			<b>Subtipo B</b>		-
I04	M1	Ninguna	Ninguna		
	M2	Ninguna	Ninguna		
			<b>CRF12_BF-like</b>		-
I05	M1	Ninguna	Ninguna		
	M2	Ninguna	Ninguna		
			<b>Recombinante BF (no CRF12)</b>		-
I06	M1	Ninguna	Ninguna		
	M2	Ninguna	Ninguna		
			<b>CRF12_BF-like</b>		-
I07	M1	D30N	M184V		
	M2	Ninguna	Ninguna		

## ***IV.2. Impacto de la recombinación intersubtipo en la región genómica Gag-Proteasa sobre la capacidad replicativa de HIV-1***

Habiendo identificado dos casos de infección doble entre variantes de subtipo B y recombinantes BF y un caso entre dos variantes recombinantes BF, nos propusimos comparar la capacidad replicativa *in vitro* entre variantes recombinantes BF y sus parentales, tanto en modelos de infección simple como de infección doble. La evaluación del impacto de la recombinación intersubtipo sobre la capacidad replicativa del virus se enfocó en la región genómica gag/proteasa, dado que la recombinación ha sido reportada frecuentemente en esta región genómica [157,158], lo que podría alterar no solo los componentes estructurales de la partícula viral sino también la actividad de las enzimas virales involucradas en la replicación viral.

## ***IV.2.1. Análisis de mutaciones en Gag y Proteasa asociadas a exposición y/o resistencia a Inhibidores de Proteasa***

Con el objetivo de comparar la variabilidad de *gag* y *proteasa* en posiciones asociadas en la bibliografía con exposición y/o resistencia a IP entre secuencias de subtipo B, F y recombinantes BF provenientes de individuos argentinos y *naïve* de tratamiento antirretroviral, se calculó para cada posición la frecuencia de sustitución total y por subtipo.

Las secuencias analizadas fueron aquellas registradas en la base de datos de Los Alamos que contaban con información acerca de su origen. Así, 88 secuencias de *gag* y 67 de *proteasa*, fueron seleccionadas para su posterior análisis.

### ***IV.2.1.1. Análisis de la variabilidad en la estructura primaria de gag***

Como se mencionó anteriormente, con el objetivo de comparar la variabilidad de *gag* en posiciones aminoacídicas relacionadas con exposición y/o resistencia a IP [141], entre secuencias de subtipo B y de subtipo F y recombinantes BF, se realizó una búsqueda exhaustiva, en la base de datos de Los Alamos, de secuencias provenientes de individuos *naïve* de tratamiento antirretroviral. Ochenta y ocho secuencias fueron seleccionadas y la distribución de subtipos fue la siguiente: subtipo B: 36,4% (n= 32), subtipo F: 20,5% (n= 18) y recombinantes BF: 43,2% (n= 38).

El número medio total de sustituciones fue 10 (rango: 2-17), en las secuencias de subtipo B la media fue de 6 (rango: 2-12), en las de subtipo F fue de 12 (rango: 9-14) y, por último, en las recombinantes BF fue de 11 (rango: 6-17).

Las sustituciones en Gag se distribuyeron de la siguiente manera: el número medio de sustituciones en la MA fue de 2 (rango 1-6), en p2 de 0,4 (rango 0,3-0,5), en NC de 2 (rango 0-4) y de 1 en p6 (rango 0-3). 20/88 secuencias portaban una sustitución en CA y 10/88 en p1.

#### ***IV.2.1.1.1. Sitios de clivaje de Gag***

El clivaje de Gag por la PR es un proceso altamente ordenado y regulado, principalmente por aquellos residuos de Gag que entran en contacto directo con la enzima. Sin embargo, se ha demostrado que residuos localizados hasta 5 posiciones *upstream* y *downstream* del sitio de clivaje (SC) pueden afectar la eficiencia del mismo [141]. Por lo tanto, estas posiciones fueron incluidas en el análisis.

El 92% de las secuencias (81/88) portaron al menos una sustitución en los SC de Gag y se distribuyeron de la siguiente manera: 10 secuencias portaban sustituciones en el sitio MA/CA (V128A, Y132F), 80 en p2/NC (S373P/Q/T, A374P/S, T375N/S, I376V, M377L y G381S), 10 en NC/p1 (K436E/R, I437T/V) y 51 en p1/p6 (L449F/P/V, S451N).

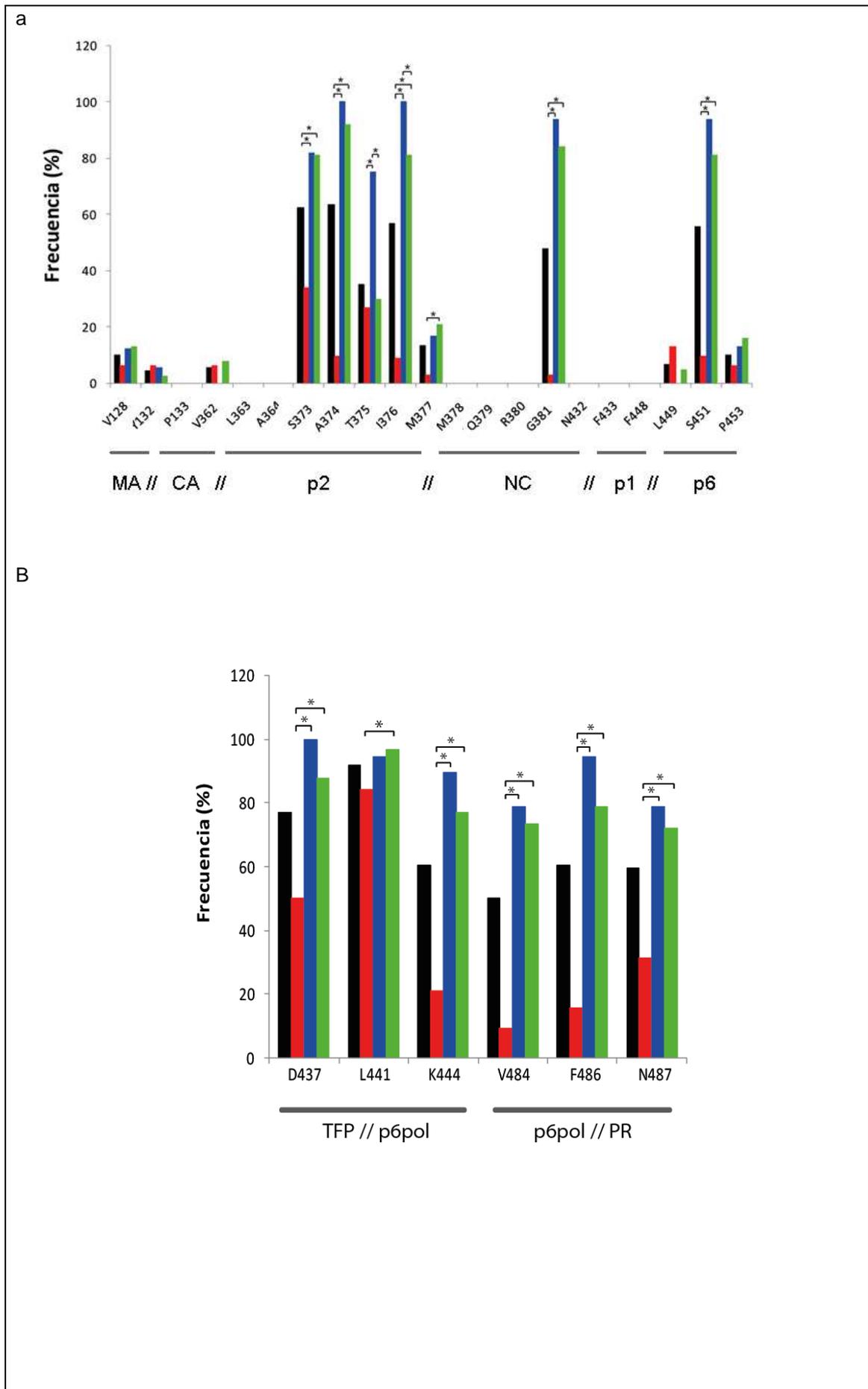
Posteriormente, se procedió al análisis de estas sustituciones de acuerdo al subtipo de cada secuencia. Las mutaciones V128A, Y132F, K436E/R, I437T/V, L449F/P/V y P453A/L/T mostraron frecuencias totales de 10,2%, 4,5%, 6,8%, 8%, 6,89% y 10,2%, respectivamente, pero sin diferencias significativas entre

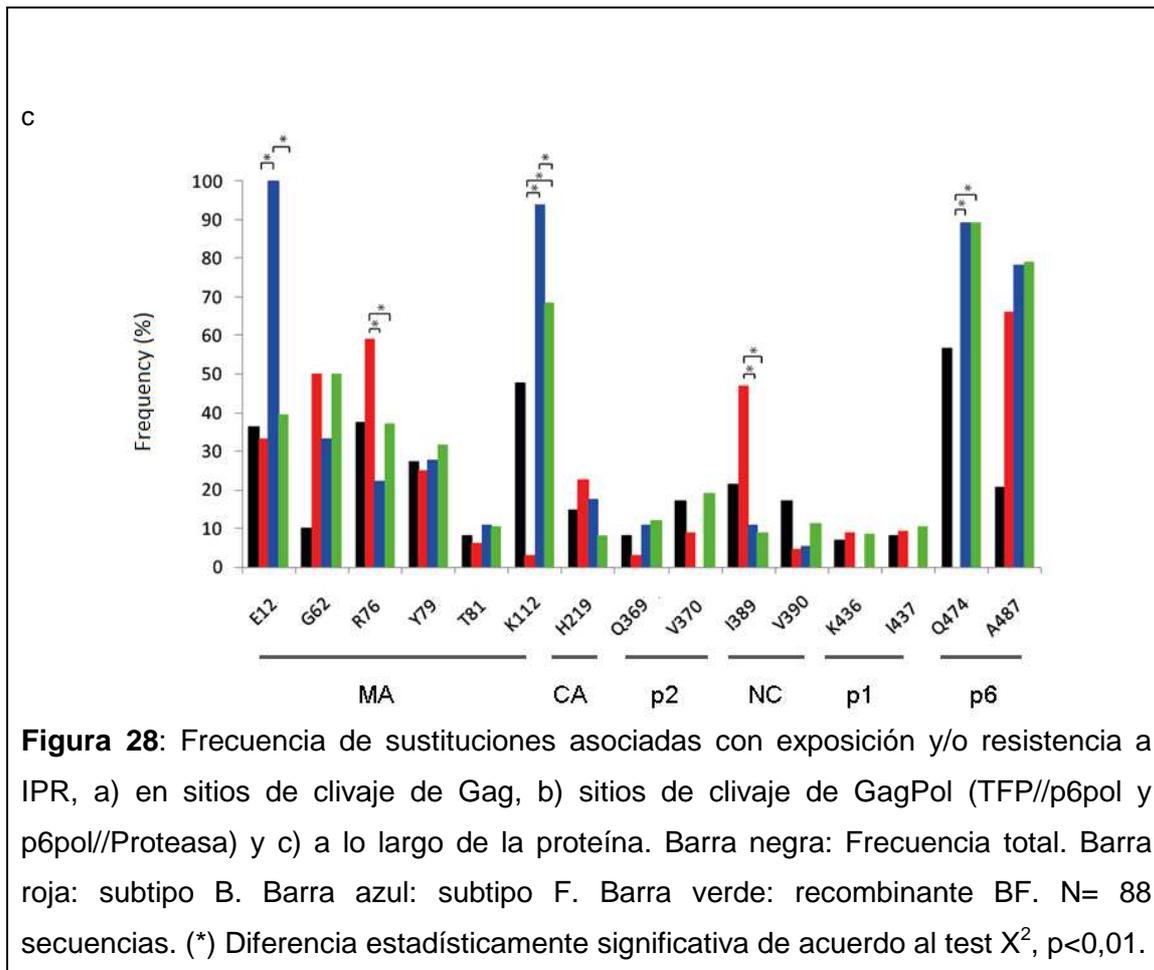
subtipos (Figura 28). La sustitución S451N en el SC p1/p6, aunque no ha sido relacionada con exposición y/o resistencia a IP, fue significativamente más frecuente en secuencias de subtipo F1 y recombinantes BF en comparación con secuencias de subtipo B (F1= 94, BF= 81 y B=9,7%,  $p<0,0001$ ). Además, en el mismo sitio de clivaje, la sustitución P453A/L/T fue más frecuente en secuencias recombinantes BF, pero sin significancia estadística (BF=16, F1= 13, B= 6,5%,  $p>0,05$ ). Por su lado, en el SC p2/NC, la mutación M377L fue significativamente más frecuente en secuencias recombinantes BF (BF= 21, B= 3%,  $p= 0,02$ ) en comparación con secuencias de subtipo B. Mutaciones en las posiciones S373, A374 e I376 mostraron una frecuencia total de 62,5, 63,6 y 56,8%, respectivamente, y fueron significativamente más frecuentes en secuencias recombinantes BF (S373= 81%, A374= 92%, I376= 81%) respecto a secuencias de subtipo B (S373= 34%,  $p<0,0001$ ; A374= 9,7%,  $p<0,001$ ; I376= 9%,  $p<0,0001$ ). La sustitución en la posición T375 tuvo una frecuencia total de 32,2% y fue significativamente más frecuente en secuencias de subtipo F1 respecto a secuencias de subtipo B y recombinantes BF (F1= 75, B= 27, BF= 30%,  $p=0,002$ ). Finalmente, la sustitución G381S fue significativamente más frecuente en secuencias de subtipo F1 en relación a secuencias de subtipo B y recombinantes BF (F1= 84, B= 84, BF= 3%,  $p<0,0001$ ).

#### ***IV.2.1.1.2. Sitios de clivaje de GagPol***

Todas las secuencias analizadas mostraron al menos una sustitución en el marco de lectura de GagPol. El número medio total de sustituciones fue de 5, las secuencias de subtipo B presentaron un número medio de 4, mientras que en las de subtipo F y recombinantes BF fue de 5,8.

Sustituciones en las posiciones D437 (F1= 100%, BF= 95% vs B= 60%,  $p < 0,05$ ), L441 (F1= 94,7%, BF= 96,5% vs B= 84,2%  $p = 0,01$ ) y K444 (F1= 89,5%, BF= 77,2 vs B= 21%  $p < 0,0001$ ) del SC TFP/p6pol fueron significativamente más frecuentes en secuencias de subtipo F y recombinantes BF respecto a las de subtipo B. La misma tendencia se observó en las posiciones V484 (F1= 78,9%, BF= 73,6% vs B= 10%,  $p < 0,0001$ ), F486 (F1= 94,5%, BF= 78,9% vs B= 15,7%,  $p < 0,0001$ ) y N487 (F1= 78,9%, BF= 71,9% vs B= 31,5%,  $p < 0,05$ ) del sitio de clivaje p6pol/ PR.





### ***IV.2.1.1.3. Análisis de la variabilidad en la estructura primaria de Gag***

El análisis de sustituciones relacionadas a exposición y/o resistencia a IP no sólo incluyó los sitios de clivaje, si no también posiciones individuales a lo largo de la proteína, relacionadas también con exposición y/o resistencia a IP en la bibliografía (Figura 28). La mutación E12K mostró una frecuencia significativamente mayor en secuencias de subtipo F1 en comparación con secuencias de subtipo B y recombinantes BF (F1= 100, B= 33, BF= 39,5%,  $p < 0,0001$ ). Las sustituciones G62R, R76K, Y79F y T81A tuvieron una

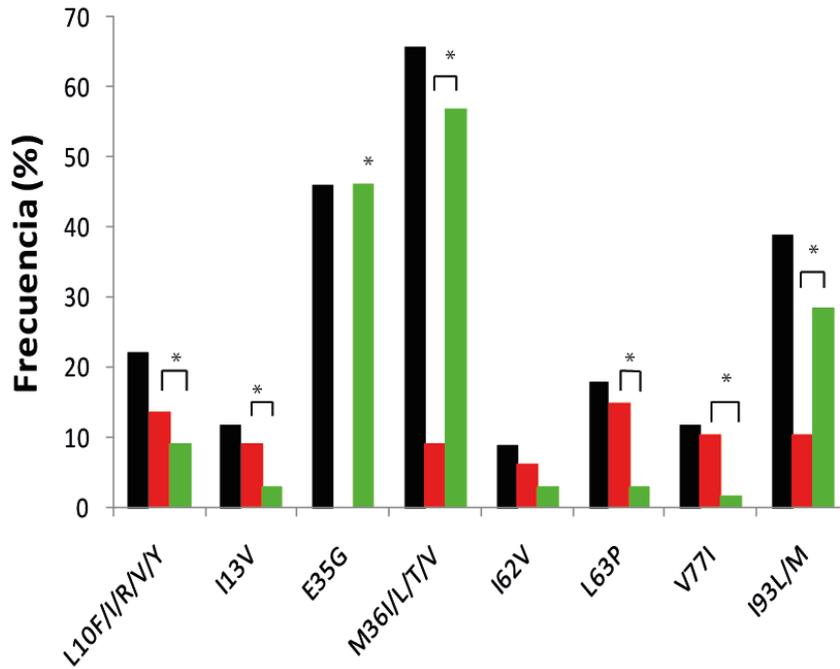
frecuencia total de 10,2, 37,5, 27,3 y 7,9%, respectivamente, pero sin diferencias entre subtipos. Aunque la sustitución K112E ha sido relacionada con exposición a IP *in vitro*, en secuencias de *gag* argentinas pudo observarse la mutación K112Q con una frecuencia significativamente mayor en secuencias de subtipo F1 y recombinantes BF respecto a secuencias de subtipo B (F1= 94, BF= 68,4, B= 3%,  $p < 0,0001$ ). Además, la mutación V370A/M/del mostró una frecuencia total de 17,05% y no se observaron diferencias significativas entre subtipos. La sustitución I389T fue significativamente más frecuente en secuencias de subtipo B en comparación con secuencias de subtipo F1 y recombinantes BF (B= 47, F1= 11, BF= 9%,  $p < 0,001$ ). Por último, y de manera similar a lo observado para la mutación K112E, la mutación Q474L ha sido relacionada con exposición a IP, sin embargo, en las secuencias argentinas analizadas se observó la mutación Q474P en secuencias de subtipo F1 y recombinantes BF (F1= 89, BF= 89%).

#### ***IV.2.1.2. Análisis de la variabilidad en la estructura primaria de la proteasa***

Con el objetivo de comparar la variabilidad en la *proteasa* de posiciones asociadas a resistencia a IP, se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias provenientes de individuos *naïve* en la base de datos de Los Alamos. Así, 62 secuencias fueron seleccionadas con la siguiente distribución de subtipos: subtipo B, 32,2 % (n= 20); recombinantes BF, 67,8% (n= 42).

No se observaron mutaciones de resistencia primaria en ninguna de las secuencias analizadas. Sin embargo, se observaron mutaciones accesorias y

con diferencias en su frecuencia entre las secuencias de subtipo B y las recombinantes BF (Figura 29). La mutación L10V presentó una frecuencia total de 22,4% y fue significativamente más frecuente en secuencias de subtipo B respecto a secuencias recombinantes BF (B= 13,4, BF= 8,9,  $p<0,01$ ). Asimismo, la mutación I13V presentó una frecuencia total de 11,9% y la misma fue significativamente mayor en secuencias de subtipo B en comparación con recombinantes BF (B= 8,95, BF= 2,9%,  $p<0,001$ ). Las mutaciones L63P y V77I se observaron a una frecuencia total de 18 y 12%, respectivamente, y fueron significativamente más frecuentes en secuencias de subtipo B en relación a secuencias recombinantes BF (L63P: B= 15, BF= 3,  $p<0,001$ ; V77I: B= 10,4, BF= 1,5%,  $p<0,001$ ). En contraste, la mutación E35G sólo se presentó en secuencias recombinantes BF con una frecuencia de 46,2%. Por su lado, la mutación M36I/L/T/V presentó una frecuencia total de 65,7% y fue significativamente más frecuente en secuencias recombinantes BF respecto a secuencias de subtipo B (BF= 56,7, B= 8,9%,  $p<0,0001$ ). Por último, la mutación I93L/M presentó una frecuencia total de 39% y su frecuencia fue significativamente mayor en secuencias recombinantes BF, respecto a secuencias de subtipo B (BF= 28,3, B= 10,4%,  $p<0,01$ ).

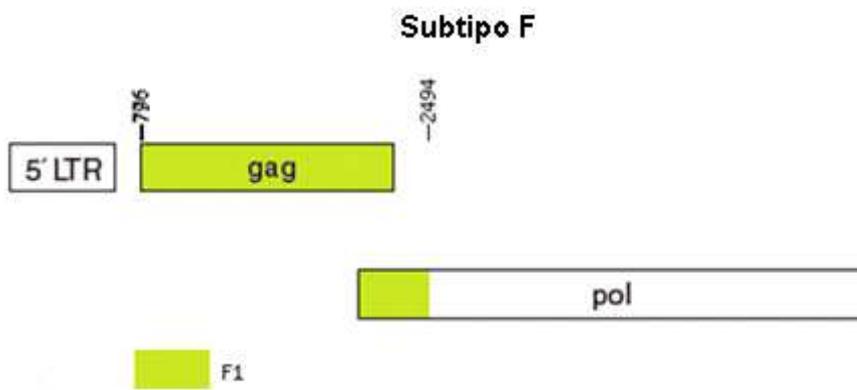


**Figura 29:** Frecuencia de sustituciones en la Proteasa. Barra negra: Frecuencia total. Barra roja: subtipo B. Barra verde: recombinante BF. N= 67 secuencias. (\*) Diferencia estadísticamente significativa de acuerdo al test  $X^2$ ,  $p < 0,01$ .

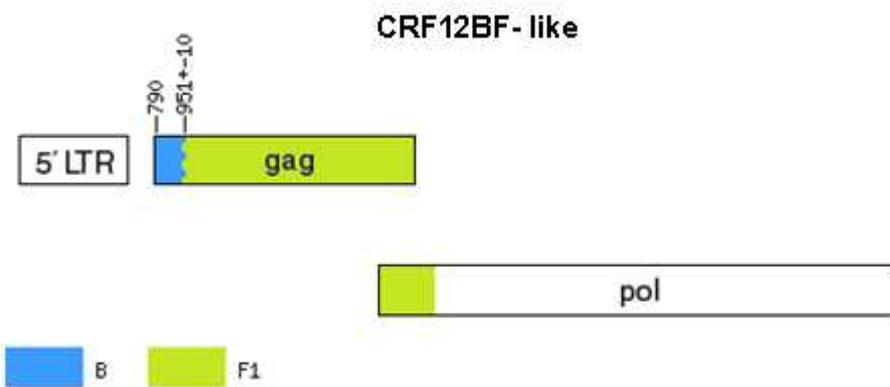
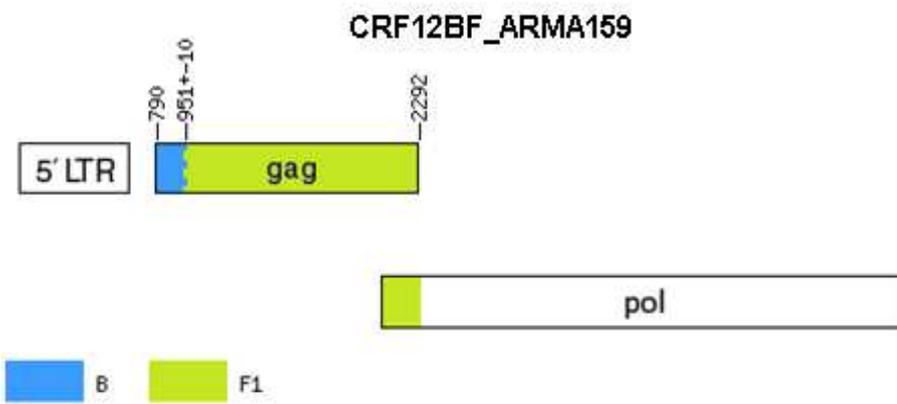
## ***IV.2.2. Evaluación de la capacidad replicativa asociada a la región genómica Gag-Proteasa de HIV-1***

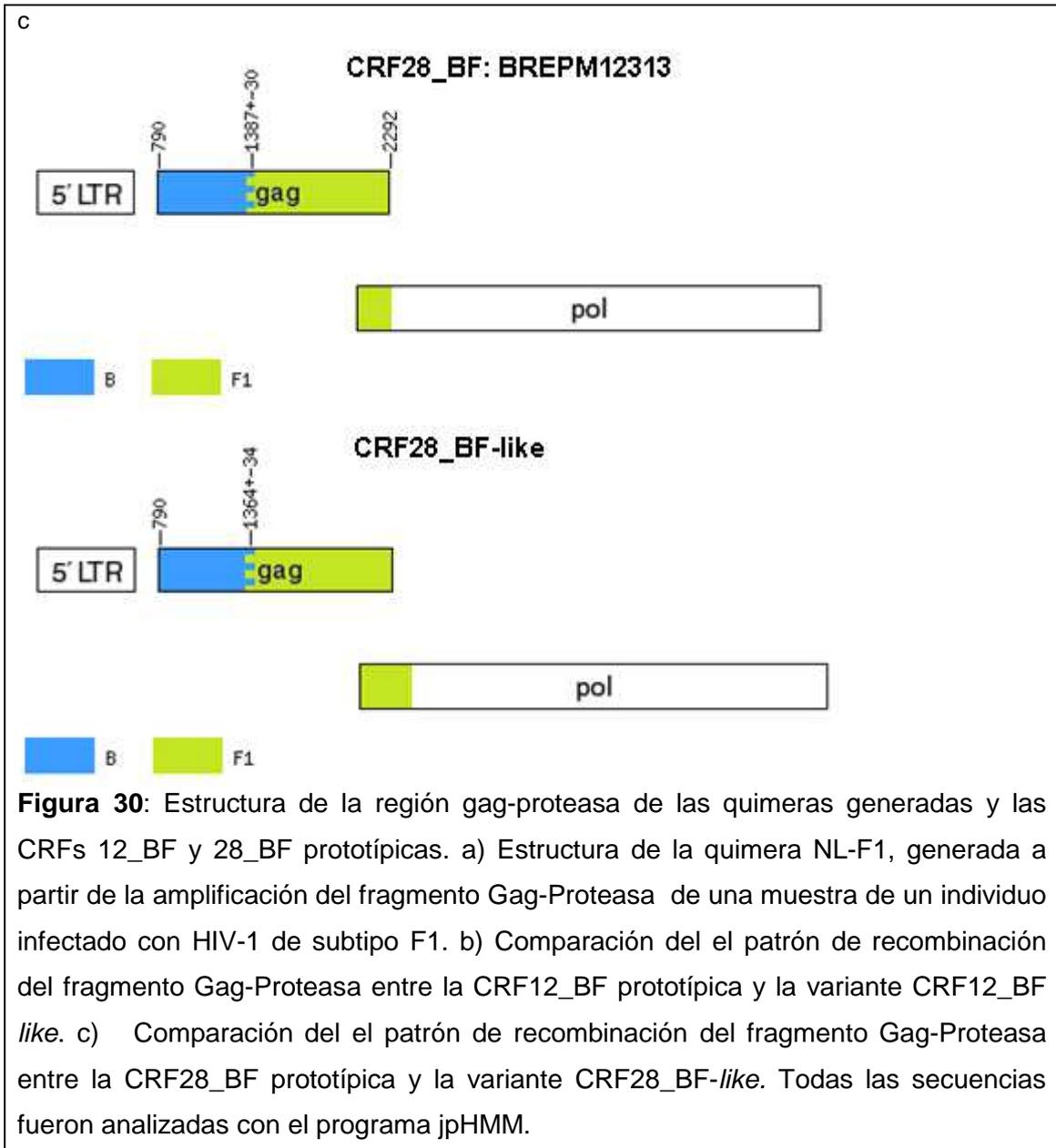
Con el objetivo de evaluar el impacto de la recombinación intersubtipo BF en la región Gag-Proteasa durante el ciclo replicativo de HIV-1, se generaron 3 quimeras virales: i) NL-F1, portadora de una variante de subtipo F1 argentina, ii) NL-12BF-*like*, portadora de una variante BF similar a la CRF12\_BF prototípica y iii) NL-28BF-*like*, portadora de una variante BF semejante a la CRF28\_BF prototípica. En la figura 30 se compara el patrón de recombinación entre las CRF\_BF prototípicas (CRF12\_BF: ARMA159 y CRF28\_BF: BREPM12313) vs las CRF\_BF-*like* utilizadas para la construcción de las quimeras virales.

a



b





### ***IV. 2.2.1. Caracterización de la estructura primaria de Gag-Proteasa de las variantes CRF12\_BF-like y CRF28\_BF-like***

Con el objetivo de evaluar las propiedades biológicas de las variantes recombinantes BF utilizadas para la construcción de las quimeras, se realizó, en primera instancia, la caracterización exhaustiva de su estructura primaria.

La comparación aminoacídica entre las CRF12\_BF prototípica (CRF12\_BF ARMA159) y la variante CRF12\_BF-like, mostró que 42 de los 599 (7%) residuos de la región Gag-Proteasa diferían entre ellas. Estos residuos se distribuyeron de la siguiente manera: i) en la MA, 8 cambios (S54T, G63E, F79Y, V82I, A83V, C87Y, I92V, T115I, más una inserción de tres amino ácidos, VAA); ii) en la CA, 6 cambios (Q141H, D211E, E245D, T280V, N315G, S339P); iii) en p2, 4 cambios (A370V, T371Q, del372T, A375T) y en p1, 1 cambio (N441H); iv) en la NC, 7 cambios (S382N, N384K, G396S, T398E, K403R, K406G, K418R, P427T); v) en p6, 7 cambios (N451S, I469M, S472L, S473P, R476Q, Q478K, Q483L) más una inserción de 5 amino ácidos (EQSRP); vi) en p6pol, 5 cambios (Q9P, N39D, L40P, L41P, A46E) más una inserción de 5 residuos (EQARA); y vii) en la Proteasa, 4 cambios (V62I, L63P, I72T, I77V) (Figura 31).

Por su lado, la comparación entre la CRF28\_BF prototípica (CRF28\_BF BREPM12313) y la CRF28\_BF-like, mostró que ambas diferían en 54 residuos del total de 599 (9%). La distribución de estas diferencias fue la siguiente: i) en la MA, 12 cambios (S9G, R30Q, V34I, E62G, K69G, K69Q, V82I, V84T, D102E, A115V, D121G, A122T, V128A) más una inserción de 2 amino ácidos, AA; ii)

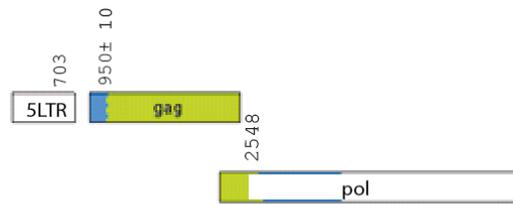
en la CA, 6 cambios (L138I, N242T, A248Q, T303C, C309A, P339T); iii) en p2, 3 cambios (N372S, T374A, V376A) y en p1, 1 cambio (H441N); iv) en la NC, 8 cambios (G381S, Q386P, R387K, K388R, I389N, K397R, R403K, R418K) más una duplicación de G; v) en p6, 8 cambios (N451S, T456S, R464G, T471A, E480A, A488D, P498Q, Q501K); vi) en p6pol, 10 cambios (P9Q, R14G, A21T, N24L, S28G, Q32W, N39S, R48S, g49R, S55G) y vii) en la Proteasa, 6 cambios (L10V, T12K, R20K, D61N, D65E, V82I).



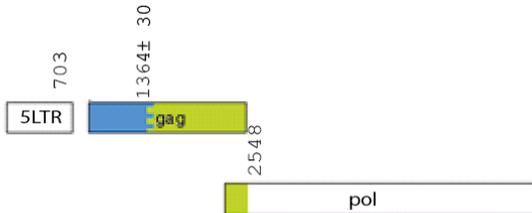


C

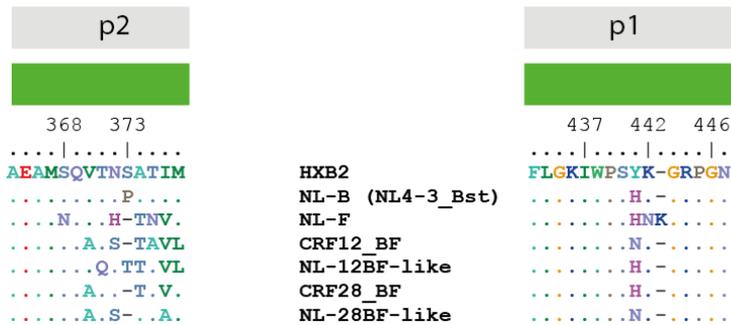
NL-12BF-like



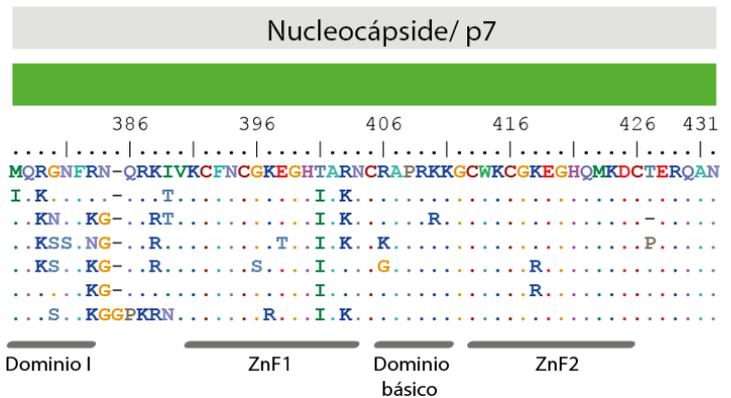
NL-28BF-like



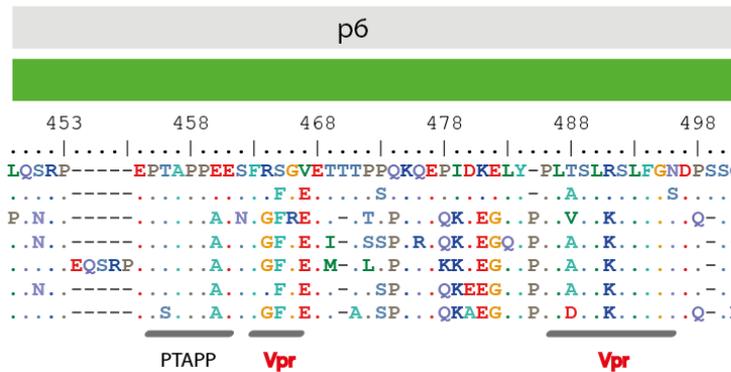
NL-12BF y  
NL-28BF-like



NL-12BF y  
NL-28BF-like



NL-12BF y  
NL-28BF-like





**Figura 31:** Patrón de recombinación y estructura primaria de la región Gag-Proteasa. a) Patrón de recombinación y estructura primaria de la Matriz/p17 de Gag. b) Patrón de recombinación y estructura primaria de la Cápside/p24 de Gag. c) Patrón de recombinación y estructura primaria de los péptidos p2 y p1, de la Nucleocápside/p7 y de p6 de Gag. d) Patrón de recombinación y estructura primaria de p6pol de GagPol y de la Proteasa viral de las variantes CRF12BF-*like* y CRF28BF-*like*. En la figura se representa la estructura recombinante de las variantes CRF12BF-*like* y CRF28BF-*like* utilizadas para la construcción de las quimeras NL-12BF-*like* y NL-28BF-*like* de acuerdo a la herramienta la jpHMM de la base de Los Alamos de la región Gag-Proteasa (azul: subtipo B; verde: subtipo F1). La estructura primaria se obtuvo a partir de la secuencia nucleotídica de la misma, utilizando el programa BioEdit v.7.1.3.0 y la numeración de los residuos se hizo de acuerdo a HXB2. En la figura se señalan los distintos dominios estructurales de la región genómica Gag-Proteasa.

El análisis de 124 secuencias recombinantes BF de la base de Los Alamos demostró que, tanto en la variante CRF12\_BF-*like* como CRF28\_BF-*like*, sólo 2 de los cambios observados con respecto a la CRF prototípicas respectivas, fueron exclusivos de las mismas (CRF12\_BF-*like*: Q141H y G396S; CRF28\_BF-*like*: A115V, I376).

### ***IV.2.2.2. Capacidad replicativa asociada a la región genómica Gag-Proteasa***

Con el objetivo de evaluar la cinética de producción viral de las variantes quiméricas 12BF y 28BF-*like* respecto de las formas puras de subtipo B y subtipo F, las líneas celulares linfoides MT2 y CEM-GFP fueron infectadas con cada stock viral (NL-B, NL-F, NL-12BF-*like* y NL-28BF-*like*). Cada 24 h p.i. se determinó la producción de antígeno p24 mediante ELISA.

Los resultados obtenidos mostraron que, en la línea celular MT2, al iniciar la cinética (24, 48 y 72 h p.i.) la producción viral fue significativamente mayor para las variantes NL-12BF-*like* y NL-F, en comparación con el subtipo B puro. Sin embargo, luego de 96 h p.i., la producción viral fue significativamente mayor en la variante de subtipo B, respecto a las variantes recombinantes 12BF-*like* ( $p=0.002$ ) y 28BF-*like* ( $p=0.0002$ ) y subtipo F ( $p=0.001$ ) (Figura 32) (Tabla 10), registrando un incremento de más del 200%. No se observaron diferencias significativas en la producción viral entre las variantes NL-12BF-*like* y NL-F ( $p=0.2$ ). Además, la variante recombinante NL-28BF-*like* fue la que presentó menor valor de producción viral en todos los tiempos analizados.

Además del análisis de producción viral en células MT2, el sobrenadante de los cultivos infectados con cada stock viral fue cosechado y guardado para evaluar la infectividad de los mismos. Para ello, células GHOST X4/R5 reporteras fueron infectadas con 50 ng de ag p24 de cada stock viral. Luego de 48 h, se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células positivas para la expresión de GFP. Como se muestra en la figura 32, la expresión de GFP fue significativamente mayor en los cultivos infectados con la variante de subtipo B

respecto a los infectados con subtipo F ( $p=0,01$ ) y las variantes recombinantes NL-12BF-*like* ( $p=0,005$ ) y NL-28BF-*like* ( $p=0,0008$ ). Asimismo, la expresión de GFP fue mayor en los cultivos infectados con la variante de subtipo F en relación a la de las variantes recombinantes NL-12BF-*like* ( $p= 0,02$ ) y NL-28BF-*like* ( $p=0,002$ ). Por su lado, el porcentaje de células que expresaron GFP fue mayor en los cultivos infectados con la variante recombinante NL-12BF- *like* respecto a la variante NL-28BF- *like* ( $p=0,01$ ).

Por otra parte, cuando células CEM GFP fueron infectadas con los stocks virales correspondientes, luego de 24 y 48 h, la producción de ag p24 fue significativamente mayor en la variante de subtipo F, respecto a la del subtipo B ( $p= 0,002$ ) y las variantes recombinantes NL-12BF-*like* ( $p= 0,0005$ ) y NL-28BF-*like* ( $p= 0,0004$ ) (Figura 32, Tabla 11). Además, la producción viral de la variante de subtipo B puro fue significativamente mayor a la de las variantes recombinantes NL-12BF-*like* y NL-28BF-*like* ( $p=0,015$  y  $p= 0,0095$ , respectivamente). Luego, al igual que lo observado para la línea celular MT2, a partir de las 72 h p.i., la producción viral de la variante de subtipo B puro fue significativamente mayor respecto a la de la variante de subtipo F y las variantes recombinantes NL-12BF-*like* y NL-28BF-*like*. Además, la producción de ag p24 de la variante de subtipo F fue significativamente mayor a la de las variantes recombinantes NL-12BF-*like* y NL-28 BF-*like*. Cabe destacar que, la producción viral de la variante recombinante NL-28BF-*like* fue significativamente menor con respecto a la variante NL-12BF-*like* en todos los tiempos analizados ( $p<0,05$ ). Luego de 96 h, además de determinar la producción de p24 en el sobrenadante del cultivo, las células CEM GFP fueron cosechadas y la expresión de GFP fue determinada por citometría de flujo.

Como se muestra en la figura 32, y en concordancia con los resultados de producción de Ag p24, el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> en los cultivos infectados con la variante de subtipo B puro fue mayor respecto al de los cultivos infectados con subtipo F (p=0.07) y las variantes recombinantes NL-12BF-*like* (p=0.02) y NL-28BF-*like* (p=0.003).

**Tabla 10:** Cinética de producción viral en la línea celular linfoide MT2

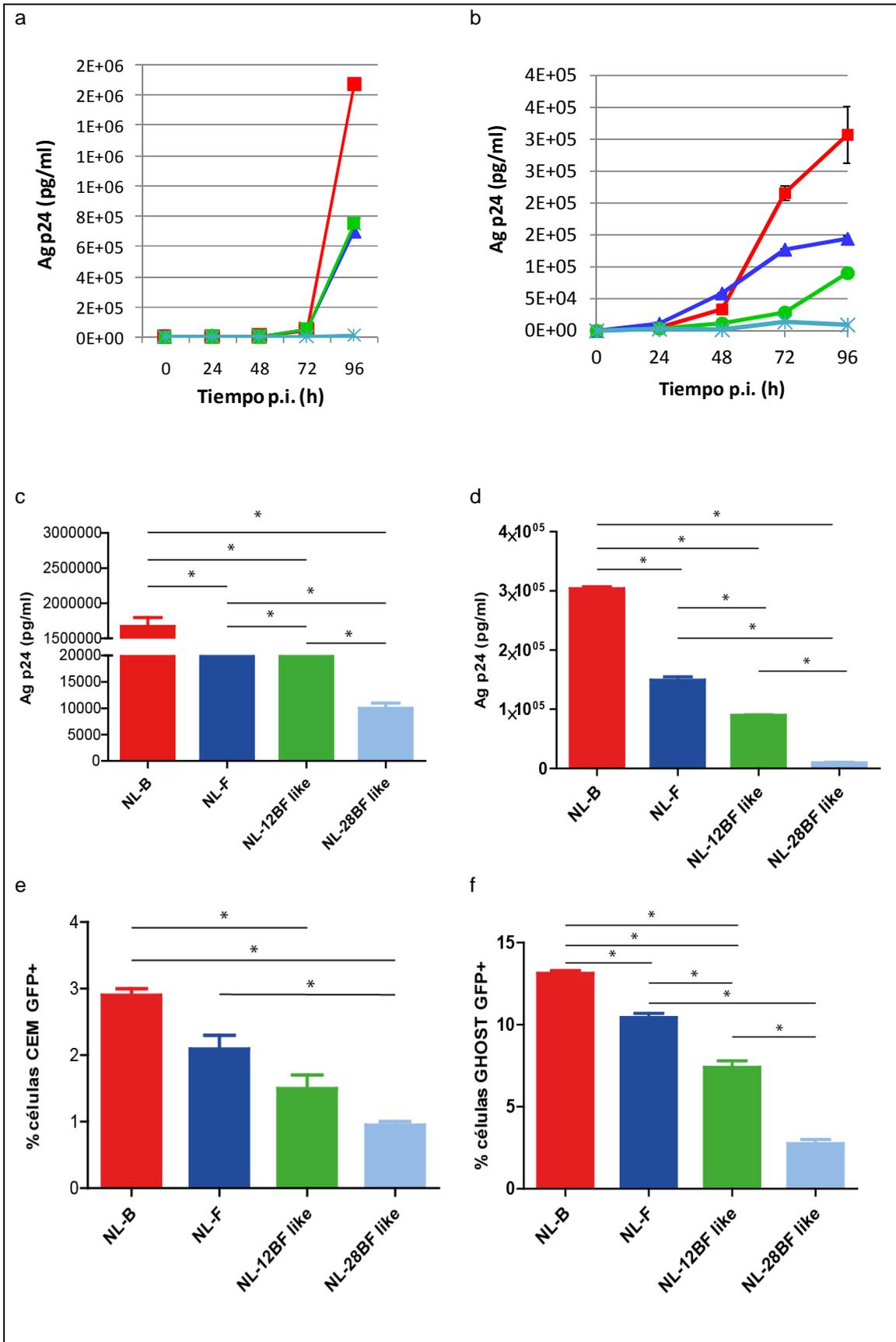
Producción viral (pg p24/ml ± DE)				
Variante	24 h	48 h	72 h	96 h
<b>NL-B</b>	548 ± 129	1690 ± 50	41067 ± 7027	1672000 ± 214028
<b>NL-F</b>	1700 ± 50	3000 ± 125	45860 ± 8800	698666 ± 60542
<b>NL-12BF-<i>like</i></b>	1786 ± 49	3490 ± 298	52000 ± 10606	749333 ± 63791
<b>NL-28BF-<i>like</i></b>	380 ± 66	583 ± 62	2097 ± 287	9983 ± 1708

**Tabla 11:** Cinética de producción viral en la línea celular linfoide CEM GFP

Producción viral (pg p24/ml ± DE)				
Variante	24 h	48 h	72 h	96 h
<b>NL-B</b>	4990 ± 161	32827 ± 1187	208000 ± 11313	338822 ± 44483
<b>NL-F</b>	11652 ± 476	59303 ± 1136	126484 ± 1250	147477 ± 4446
<b>NL-12BF-<i>like</i></b>	3589 ± 126	12604 ± 1561	29182 ± 729	91063 ± 759
<b>NL-28BF-<i>like</i></b>	2786 ± 137	1950 ± 354	14739 ± 1328	9927 ± 1013

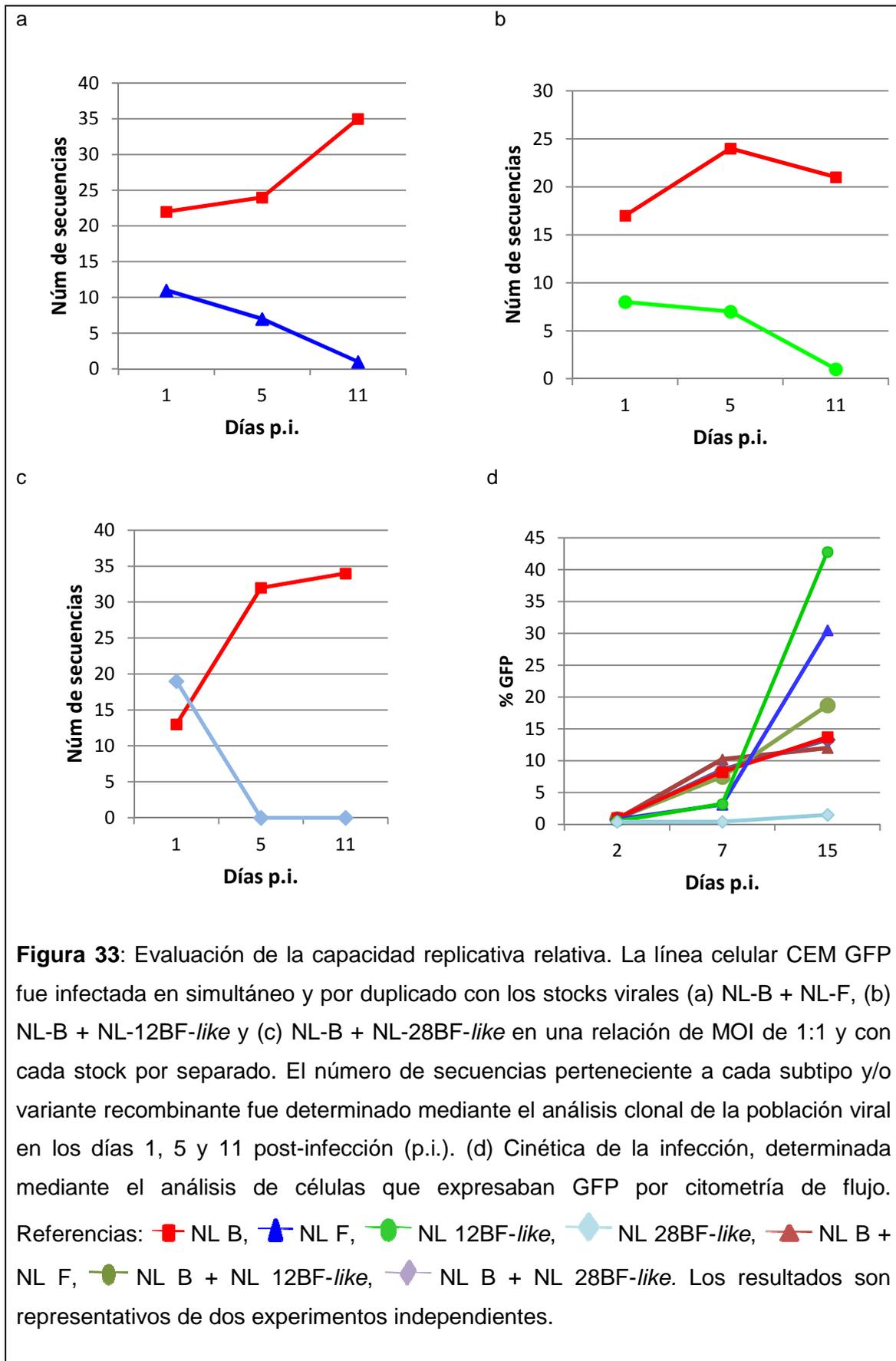
### ***IV.2.2.3. Evaluación de la capacidad replicativa relativa***

Dado los resultados obtenidos en la cinética de producción viral, se decidió llevar a cabo un ensayo *in vitro* de evaluación del *fitness* o capacidad replicativa relativa. Este análisis mostró que, en una relación 1:1, la variante de subtipo B puro predominó cuando se infectó en forma simultánea con la variante de subtipo F y ambas variantes recombinantes BF (Figura 33). Cabe destacar que, en las competencias NL-B vs NL-F y NL-B vs NL-12BF-*like* se observó la aparición de secuencias recombinantes entre las variantes mencionadas. Sin embargo, ninguna de estas variantes recombinantes predominó y/o permaneció durante el periodo de cultivo. La cinética de la infección fue monitoreada mediante la determinación del porcentaje de células fluorescentes por FACS.



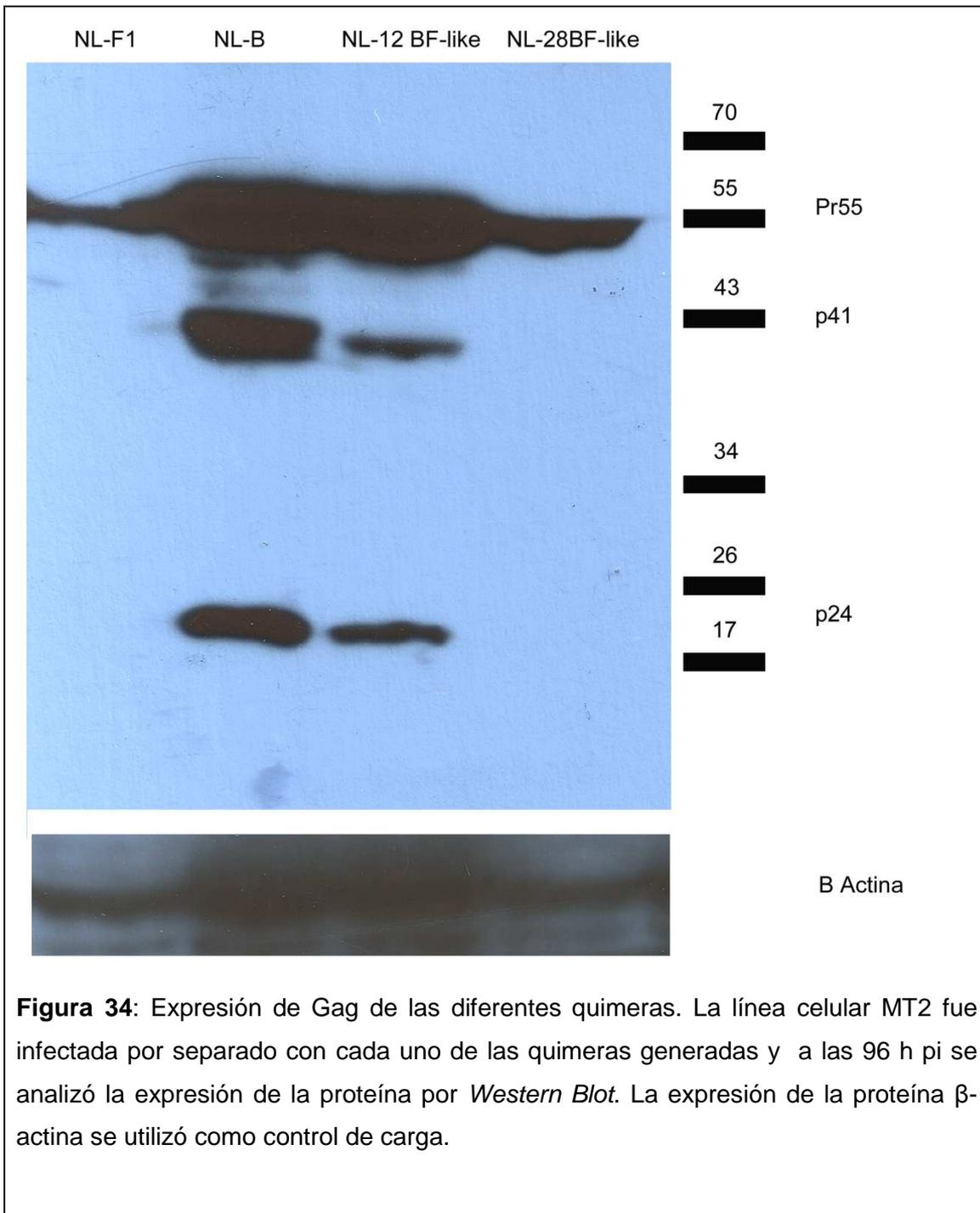
**Figura 32:** Evaluación de la cinética de producción viral en líneas celulares linfoides infectadas. Células MT2 (a) y CEM-GFP (b) fueron infectadas por separado con cada con stock viral utilizando la concentración necesaria de Ag p24 correspondiente a un valor de 10% de infectividad en células GHOST (Ver detalles en M&M). La cinética de producción viral fue evaluada mediante la determinación cuantitativa del antígeno p24 en sobrenadantes de cultivo. Las barras de error indican el desvío estándar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Evaluación de las medias de los experimentos a las 96 h p.i. mediante la prueba *t* de Student para muestras independientes en las líneas celulares MT2 (c) y CEM-GFP (d). (e) Evaluación de la expresión de GFP en células CEM GFP luego de 96 h p.i. (f) Evaluación de la infectividad de sobrenadantes de infección de células MT2 a las 96 h p.i. Células GHOST X4/R5 fueron infectadas con 50 ng de Ag p24 de los sobrenadantes de la infección de células MT2. Luego de 48 h, se determinó el porcentaje de células que expresaban GFP por FACS. Referencias: NL-B: rojo, NL-F: azul; NL-12BF-*like*: verde; NL-28BF-*like*: celeste.



#### ***IV. 2.2.4. Expresión de Gag y sus intermediarios***

La expresión de Gag Pr55, y los productos de su clivaje proteolítico p41 y p24, de las quimeras NL-B, NL-F1, NL-12BF-*like* y NL-28BF-*like* se corroboró por *Western blot* (Figura 34). Como puede observarse en la figura, la expresión de Gag en las variantes de subtipo B y la recombinante NL-12BF-*like* fue semejante. Sin embargo, la expresión de Gag de las variantes NL-F1 y NL-28BF-*like* fue menor.



**Figura 34:** Expresión de Gag de las diferentes quimeras. La línea celular MT2 fue infectada por separado con cada uno de las quimeras generadas y a las 96 h pi se analizó la expresión de la proteína por *Western Blot*. La expresión de la proteína  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga.

## ***V. DISCUSIÓN***

La variabilidad genética y heterogeneidad de HIV-1, resultado de la alta tasa de mutación y recombinación de la transcriptasa reversa, y de la elevada tasa de replicación viral, es una de sus principales características. Así, la variabilidad de HIV-1 impacta significativamente sobre varios aspectos de la infección, entre ellos, el diagnóstico, transmisión, patogénesis, progresión de la infección, respuesta al tratamiento antirretroviral y diseño de una vacuna eficaz [159,160]. En la actualidad, se reconocen alrededor de 50 Formas Recombinantes Circulantes (CRF) y más de 100 Formas Recombinantes Únicas (URF), las cuales contienen secuencias derivadas de dos o más subtipos (<http://www.hiv.lanl.gov>). En Argentina, los estudios realizados hasta la fecha han permitido reconocer un patrón complejo y dinámico en la epidemiología molecular del virus en nuestro país, con predominio de variantes subtipo B en poblaciones de HSH y de formas recombinantes BF en heterosexuales y UDIs [53,54,62,161]. Asimismo, en la mayoría de los países de Sudamérica, las recombinantes BF han ido ganando importancia, llegando en Argentina a representar entre el 50 a 85% de las nuevas infecciones a través de la vía heterosexual [162,163,164].

Estudios moleculares realizados previamente por nuestro grupo de trabajo, han mostrado que la recombinación intersubtipo BF frecuentemente afecta regiones genómicas implicadas en la regulación de la expresión de los genes virales, la replicación y la interacción con el sistema inmune del huésped [165,166,167,168,169,170,171]. En conjunto, estos resultados sugieren que el fenómeno de recombinación podría haber jugado un papel importante en la propagación exitosa de las variantes virales recombinantes BF.

Las poliproteínas Gag y GagPol juegan un rol fundamental durante el ensamblado de la partícula viral, la maduración y en eventos tempranos post-entrada [172]. Inicialmente, Gag fue descrita como una simple proteína estructural, encargada de la formación del “core” del virión. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha demostrado que esta proteína, además, interacciona con el genoma viral [173,174] y con proteínas tanto virales [175,176] como del huésped [24,177,178]. Además, el procesamiento proteolítico de Gag y GagPol es condición sine qua non para la generación de partículas infecciosas [123]. Cabe destacar que, los productos de ambas poliproteínas, están sometidas a fuertes presiones de selección por parte del sistema inmune del huésped [179,180,181,182,183,184] y del tratamiento antirretroviral [150,185,186]. Aunque el proceso de recombinación ha sido ampliamente descrito en la región *env* de HIV-1 [187,188], la recombinación intersubtipo ha sido reportada frecuentemente también en las regiones *gag* y *pol* [157,158], la cual podría alterar no solo los componentes estructurales de la partícula viral sino también la actividad de las enzimas virales involucradas en la replicación viral.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivos la identificación de infecciones dobles en individuos con riesgo múltiple para la infección por HIV-1 y la comparación *in vitro* de la capacidad replicativa asociada a la región genómica *gag/proteasa* en modelos de infección simple e infección doble con variantes recombinantes BF y sus parentales,

La situación epidemiológica de HIV-1 en Argentina, caracterizada por la circulación diferencial de subtipo B y recombinantes BF, ofrece un campo favorable para la presencia de infecciones dobles en individuos con conductas

de alto riesgo para la infección. En este trabajo, se reclutaron, en colaboración con médicos de la Fundación de Ayuda al Inmunodeficiente (FUNDAI), 27 individuos con estas características. Entre ellos, de 7 se obtuvieron 2 o más muestras seriadas. El análisis de las secuencias de un fragmento de *pol* permitió detectar 3 casos de infección doble.

Se han descrito casos de infecciones múltiples como consecuencia de la interrupción del tratamiento antirretroviral y la re exposición al virus [67,70]. En el individuo I01, la infección con la segunda cepa parece haber ocurrido en el periodo de interrupción de tratamiento, sugiriendo que la presencia del mismo actuaría como factor de prevención de la sobreinfección, particularmente si la cepa del virus a la cual el paciente es expuesto es completamente sensible al mismo. El análisis de mutaciones de resistencia en las secuencias tanto de M1 como de M2, mostró que la variante CRF12\_BF minoritaria era totalmente sensible al tratamiento ARV (Figura 21, Tabla 9). En este sentido, y en concordancia con el concepto de “Tratamiento del HIV-1 como Prevención” [189], los pacientes bajo tratamiento ARV no solo tendrían menor riesgo de transmitir el virus a otras personas, sino que también estarían protegidos frente a eventos de sobreinfección.

El individuo I02 presentaba una evolución clínica de más de 15 años al momento de su participación en este estudio. Sus valores de CD4 se mantenían relativamente estables y nunca había recibido tratamiento ARV. La presencia de mutaciones de resistencia en algunas secuencias sugiere la transmisión de cepas resistentes (Tabla 9). Aunque su evolución clínica no fue desfavorable, las secuencias provenientes de ARN y ADN se entremezclaron

en el análisis filogenético, lo que indicaría replicación activa del virus (Figura 22) [190].

El individuo I03 estuvo bajo tratamiento ARV pero el mismo fue suspendido por indicaciones médicas. La M1 presentó solo secuencias correspondientes a la CRF12\_BF mientras que en la M2 se encontró una secuencia con un patrón de recombinación distinto (Figura 23). Al igual que en I02, las secuencias provenientes de ARN y ADN se entremezclaron en el árbol, sugiriendo replicación viral activa que podría explicar la emergencia de mutaciones de resistencia en la población viral circulante [190]. La infección con esta segunda variante, de acuerdo con la historia clínica del individuo, coincidiría con una recaída en el uso de drogas inyectables, lo que explicaría que la sobreinfección fuera con una variante recombinante BF, dado que son frecuentes en UDIs [45]. Las mutaciones de resistencia encontradas responden al tratamiento anterior al que estuvo sometido y, dado que las secuencias de la M2 no presentaron mutaciones, es posible que, al igual que en I01, la interrupción del tratamiento hubiera posibilitado la sobreinfección [68,84]. Así, este individuo habría adquirido la segunda variante al menos 8 años después de la primera infección. En este sentido, se ha descrito la falta de protección contra la sobreinfección en individuos crónicamente infectados aún en presencia de una respuesta humoral significativa [79,80].

El fenómeno de sobreinfección ha sido reportado también en casos de re-exposición a variantes del mismo subtipo viral de HIV-1. [191]. En este trabajo, se describe por primera vez un caso de infección doble con variantes recombinantes BF... Este resultado refuerza la hipótesis de que la

sobreinfección con HIV-1 ocurre frecuentemente, y que es posible identificarlas aún si se trata de variantes estrechamente relacionadas.

Hay evidencias de que el análisis de más de una región genómica de HIV-1 aumenta la eficiencia en la detección de infecciones múltiples [192]. En nuestro estudio, el análisis de secuencias de *pol* permitió detectar 3 casos de infecciones dobles. Sin embargo, la evaluación de otras regiones del genoma representaría una mejor medida de la frecuencia de sobreinfecciones en esta cohorte y del impacto de los factores de riesgo analizados en este estudio.

Los resultados obtenidos sugieren que en Argentina el estudio en profundidad de la frecuencia de infecciones múltiples en individuos con conductas de alto riesgo es de gran relevancia, puesto que ésta podría ser mayor a lo estimado, con consecuencias importantes en salud pública. Además, la interrupción de tratamiento favorecería la re-infección con una segunda variante. Sin embargo, dadas las limitaciones en el muestreo de esta cohorte, no es posible descartar que la re-infección hubiera ocurrido antes de la interrupción de tratamiento antirretroviral. También, en concordancia con otros reportes, el impacto de la infección múltiple en la progresión clínica de la enfermedad no fue relevante [193].

Posteriormente, con el objetivo de comparar la capacidad replicativa *in vitro* asociada a la región *gag/proteasa* entre variantes recombinantes BF y sus parentales de subtipo puro analizamos, en primer lugar, las variaciones en la estructura aminoacídica de la región *gag/proteasa* de HIV-1 relacionadas con la recombinación intersubtipo y, posteriormente, su impacto sobre la replicación viral.

Desde la incorporación de los IP a la terapia antirretroviral combinada (cART), se han reportado asociaciones entre la aparición de mutaciones en los sitios de clivaje (SC) y en determinadas posiciones de la poliproteína *gag* y la exposición a esta familia de drogas [141,146,194,195,196]. Estas mutaciones aparecen en respuesta a la presión selectiva del tratamiento, como mecanismo de compensación de la replicación viral. Sin embargo, pocos estudios han comparado la variación natural de esta región entre subtipo B y variantes No-B. Ghosn *et al* (2011) mostraron que los SC de *gag* son altamente polimórficos en individuos *naïve*, infectados con variantes distintas a subtipo B y que, además, estas variantes No-B estarían asociadas con mayor riesgo de fallo virológico en individuos tratados con LPV/r [150]. En contraste, Larrouy *et al* (2010), a pesar de haber observado un número significativamente mayor de sustituciones en *gag* en variantes No-B, no observaron asociación entre el subtipo viral y la evolución de su condición clínica [197]. En el presente trabajo, se analizó la variabilidad en composición de amino ácidos de secuencias de subtipo B respecto a secuencias de subtipo F y recombinantes BF circulantes en Argentina. De acuerdo a los resultados obtenidos, el total de las secuencias de *gag* analizadas (n=88) presentaron al menos una sustitución en comparación con la secuencia de referencia HXB2. El grado de conservación (o variación) difirió significativamente entre los distintos SC y posiciones individuales a lo largo de la poliproteína. Los SC p2/NC y p1/p6 fueron los más variables, mientras que el SC MA/CA fue el más conservado. En particular, la frecuencia de mutaciones en las posiciones S373/A374/T375/G381 (p2/NC) y S451 (p1/p6) fue significativamente mayor en secuencias de subtipo F y recombinantes BF, en concordancia con lo observado en otros estudios

[150,151,198]. En este sentido, varios trabajos han reportado que el SC p2/NC es altamente polimórfico [186,199,200] y que existiría una asociación entre estas mutaciones y el desarrollo de resistencia cruzada a IP [186]. Además, Kolli *et al* (2006) mostraron que la selección a favor de la mutación en la posición 373 se correlacionó con una respuesta virológica pobre en el contexto de una proteasa resistente [200]. Por su lado, Ghosn *et al* (2011) demostraron que la presencia de la mutación en la posición 374 en la línea de base y en el contexto de una proteasa de tipo salvaje, resultó buen predictor del fallo virológico en un régimen monoterapia con LPV/r [150].

Las mutaciones K436E/R, I437T/V (NC/p1) y L449F/P/V, P453A/L/T, frecuentemente observadas en aislamientos de individuos tratados con IP [201], presentaron frecuencias totales entre 6-11%, pero sin diferencia significativa entre subtipo B y variantes de subtipo F y recombinantes BF. Sustituciones en las posiciones 436 y 437 han sido reportadas durante el tratamiento con RTV [202], IDV [146] y SQV [186] y han sido asociadas también a ciertas mutaciones en la PR misma. La presencia de la doble mutación K436E/R+I437T/V tiene un impacto significativo en la susceptibilidad a IP [185,196], en nuestro análisis sólo 2 secuencias, ambas correspondientes a subtipo B, presentaron la doble mutación. Con respecto a las mutaciones L449F/P/V y P453A/L/T, ambas han sido descritas como mutaciones asociadas al tratamiento con RTV [203], IDV [146] y SQV [195,197], entre otros. Además se ha demostrado que ambas influyen sobre el *fitness* viral [204].

Además de mutaciones en los SC de *gag*, mutaciones en todas las proteínas de Gag (MA, CA, NC, p6) han sido asociadas con exposición y/o resistencia a

IP. En particular, las sustituciones R76K, Y79F y T81A en la MA de Gag, se han relacionado con cambios en la capacidad replicativa y disminución de la susceptibilidad a IP [205,206]. Nuestros resultados muestran que 25/88 secuencias portaban simultáneamente 2 de estas mutaciones y 10/88 las 3 mutaciones conjuntamente. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de estas sustituciones entre variantes de subtipo B y No-B y las frecuencias medias totales estuvieron entre 8-37% (Figura 29). Por último, no se observaron mutaciones de resistencia primaria en las secuencias de PR analizadas. Las sustituciones observadas en esta proteína correspondieron a polimorfismos comunes en secuencias No-B (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Numerosos estudios de vigilancia de mutaciones de resistencia en *pol* se han llevado a cabo en nuestro país [207,208,209]. Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado una vigilancia de mutaciones en *gag* asociadas a resistencia. Dado que en Buenos Aires, el 38% de los individuos bajo tratamiento ARV reciben al menos un IP y que, en este estudio, la mayoría de las secuencias de *gag* analizadas portaban al menos una sustitución, nuestros resultados resaltan la necesidad de una vigilancia exhaustiva de mutaciones en *gag* en individuos con diagnóstico reciente.

Luego de caracterizar la estructura primaria de la región *gag*-proteasa de variantes de subtipo B y variantes de subtipo F y recombinantes BF, nos propusimos analizar el impacto de esta variabilidad sobre la capacidad replicativa del virus. El conocimiento de la contribución de la región *gag/proteasa* sobre la patogénesis de HIV-1 proviene de estudios en los que se analizó el impacto de la presión del sistema inmune mediada por HLA sobre el

*fitness* viral de aislamientos pertenecientes a subtipo C [181,182] y subtipo B [179]. Además, se ha demostrado que la recombinación intersubtipo es frecuente en esta región [157], lo cual podría afectar la capacidad replicativa de las variantes recombinantes en relación a sus parentales.

Por lo tanto, se evaluó la capacidad replicativa de variantes quiméricas de HIV-1 reemplazando la región codificante para la región *gag/-proteasa* de NL4-3 por la correspondiente a dos variantes recombinantes BF.

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo mostraron que, la recombinación intersubtipo BF en la región genómica reguladora *vpu* otorgó a la variante portadora una ventaja en su capacidad replicativa en relación a la variante de subtipo puro [167,171]. Además, en otro trabajo se observó que la recombinación intersubtipo en las regiones genómicas LTR y *tat* tuvo como consecuencia una mayor actividad transcripcional respecto a las variantes de subtipo puro parentales [170]. Sin embargo, la evaluación *in vitro* de la producción viral de las variantes quiméricas *gag/proteasa* BF y de la variante subtipo B puro permitió determinar que la segunda fue significativamente más eficiente que la primera en términos de capacidad replicativa (Figura 32). Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en el ensayo *in vitro* de evaluación del *fitness* o capacidad replicativa relativa por competición entre ambas variantes (Figura 33). La comparación de la estructura primaria de las variantes recombinantes BF respecto al subtipo B reveló diferencias en posiciones que afectan la producción viral y/o la infectividad. Tal es el caso de la sustitución M377L encontrada en ambas variantes BF, CRF12\_BF-like y CRF28\_BF-like. Al respecto, Kräusslich *et al* (1995) mostraron que el cambio M377V resultaba en la producción de partículas virales con infectividad

reducida [210]. La sustitución observada en nuestras quimeras constituye un cambio conservativo al igual que el utilizado por Kräusslich *et al* (1995) por lo que podría generar un fenotipo similar. Por otro lado, Sandefur *et al* (2000) demostraron que mutaciones en dos argininas del Dominio I de la NC (<sup>378</sup>MQRGNFR<sup>384</sup>) provocan una falla en el patrón puntuado de Gag en la MP e inhiben la producción de partículas, además este fenotipo no se altera aún en el caso de que el cambio fuera por un aminoácido de igual carga [122]. El análisis de la estructura primaria de las quimeras usadas en nuestro estudio, mostró que las variantes F y CRF12\_BF-*like* presentaban sustituciones en ambas argininas (R380K y R384K), mientras que la variante CRF28\_BF-*like* sólo en la segunda (R384K) (Figura 32), lo que podría favorecer la menor eficiencia en la producción viral. Cabe destacar, que el análisis de 61 secuencias BF publicadas en la página de Los Alamos, reveló que ambas sustituciones, M377L y R380K/R384K, no son exclusivas de las variantes de nuestro trabajo, sino que son polimorfismos altamente frecuentes en variantes recombinantes BF. Sin embargo, las hipótesis sobre la posible implicancia de estas sustituciones sobre la capacidad replicativa de las variantes BF deben ser sometidas a evaluación.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la sobreinfección es un fenómeno frecuente en poblaciones con riesgo múltiple, aún entre variantes muy relacionadas. El estudio realizado permitió identificar un caso de sobreinfección con distintas variantes de recombinantes BFs. Por otro lado, se analizó por primera vez el impacto de recombinación intersubtipo en la capacidad replicativa *in vitro* asociada a la región *gag/proteasa*. El estudio de la estructura primaria de secuencias de *gag* provenientes de aislamientos de

variantes recombinantes BF, subtipo F y subtipo B mostró que, las dos primeras presentaban mayor cantidad de sustituciones en sitios relacionados con exposición y/o resistencia a IP. La evaluación de la capacidad replicativa *in vitro* mostró que la variante parental de subtipo B fue más eficiente en términos de producción viral respecto a las variantes recombinantes BF, en modelos de infección simple y de infección doble. Al respecto, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio, no se encontraron diferencias en el *fitness* de variantes de subtipo B, F o recombinantes BF aisladas a partir de muestras de individuos crónicamente infectados con dichas variantes [211]. La diferencia con los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen a sostener la hipótesis de que el fenotipo final de la variante recombinante no sería absoluto en términos de las regiones genómicas afectadas, sino que resultaría de la sumatoria de los efectos asociados a cada región genómica.

## ***VI. CONCLUSIONES***

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que:

- i. Nuestros resultados sugieren que la sobreinfección es un fenómeno frecuente en poblaciones con riesgo múltiple, aún entre variantes muy relacionadas
- ii. El estudio de la estructura primaria de secuencias de *gag/pol* provenientes de aislamientos de variantes recombinantes BF, subtipo F y subtipo B mostró que, las dos primeras presentaban mayor cantidad de sustituciones en sitios relacionados con exposición y/o resistencia a IP.
- iii. La recombinación intersubtipo BF en la región *gag/proteasa* alteraría la capacidad replicativa generando nuevas variantes con menor *fitness*.

## ***VI. PERSPECTIVAS***

- Evaluación del impacto de la recombinación intersubtipo en la región gag/pol sobre la capacidad replicativa en presencia de inhibidores de proteasa.
- Evaluación del impacto de la recombinación intersubtipo en la región gag/pol sobre la selección de mutaciones de resistencia.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

- **Espada CE**, Melo F, Zanotto PM, Martínez Peralta L, Carobene MG. *Gag-protease-mediated replication capacity is reduced in HIV-1 BF intersubtype recombinant variants*. Paper en preparación para ser publicado.
- Andreani G\*, **Espada CE\***, Ceballos A\*, Ambrosioni J, Petroni A, Pugliese D, Bouzas MB, Fernandez Giuliano S, Weissenbacher MC, Losso M, Benetucci J, Carr JK, Martínez Peralta L. *Detection of HIV-1 dual infection in highly exposed treated patients*. *Virology*. Aug 8; 8: 392, 2011.

## ***VII. REFERENCIAS***

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
2. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, et al. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 865-867.
3. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, et al. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-842.
4. Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F (1985) HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* 313: 636-637.
5. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM (2000) AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287: 607-614.
6. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, et al. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397: 436-441.
7. Keele BF, Jones JH, Terio KA, Estes JD, Rudicell RS, et al. (2009) Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* 460: 515-519.
8. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, et al. (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-526.
9. Corbet S, Muller-Trutwin MC, Versmissen P, Delarue S, Ayouba A, et al. (2000) 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* 74: 529-534.
10. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, et al. (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15: 871-872.
11. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, et al. (1998) An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391: 594-597.
12. Jonassen TO, Stene-Johansen K, Berg ES, Hungnes O, Lindboe CF, et al. (1997) Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology* 231: 43-47.
13. Verdrager J (1995) [AIDS. Hypothesis on the origin and emergence of HIV]. *Bull Soc Pathol Exot* 88: 54-59; discussion 59-60.
14. Chitnis A, Rawls D, Moore J (2000) Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 5-8.
15. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, et al. (2005) Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 433: 834-841.
16. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, et al. (1986) Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45: 637-648.
17. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR (1992) Identification of envelope V3 loop as the major determinant of CD4 neutralization sensitivity of HIV-1. *Science* 257: 535-537.
18. Milich L, Margolin B, Swanstrom R (1993) V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol* 67: 5623-5634.
19. Flint SJ, EL, Rancaniello VR, Skalka AM (2003) *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*: ASM Press. 850 p.
20. Knipe DM, HP (2006) *Fields Virology*: Lippincott Williams & Wilkins. 3177 p.
21. Jonckheere H, Anne J, De Clercq E (2000) The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors. *Med Res Rev* 20: 129-154.
22. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM (2008) The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 358: 1590-1602.
23. Simon-Loriere E, Rossolillo P, Negroni M (2011) RNA structures, genomic organization and selection of recombinant HIV. *RNA Biol* 8: 280-286.

24. Meng B, Lever AM (2013) Wrapping up the bad news: HIV assembly and release. *Retrovirology* 10: 5.
25. Cohen MS, Gay CL, Busch MP, Hecht FM The detection of acute HIV infection. *J Infect Dis* 202 Suppl 2: S270-277.
26. Hel Z, McGhee JR, Mestecky J (2006) HIV infection: first battle decides the war. *Trends Immunol* 27: 274-281.
27. Levy JA (1998) Caution: should we be treating HIV infection early? *Lancet* 352: 982-983.
28. Hammer SM (2006) Nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor options: a re-examination of the class. *Top HIV Med* 14: 140-143.
29. Zhan P, Chen X, Li D, Fang Z, De Clercq E, et al. (2013) HIV-1 NNRTIs: structural diversity, pharmacophore similarity, and implications for drug design. *Med Res Rev* 33 Suppl 1: E1-72.
30. Baldwin CE, Sanders RW, Berkhout B (2003) Inhibiting HIV-1 entry with fusion inhibitors. *Curr Med Chem* 10: 1633-1642.
31. Berro R, Klasse PJ, Jakobsen MR, Gorry PR, Moore JP, et al. (2012) V3 determinants of HIV-1 escape from the CCR5 inhibitors Maraviroc and Vicriviroc. *Virology* 427: 158-165.
32. Pace CS, Fordyce MW, Franco D, Kao CY, Seaman MS, et al. (2013) Anti-CD4 monoclonal antibody ibalizumab exhibits breadth and potency against HIV-1, with natural resistance mediated by the loss of a V5 glycan in envelope. *J Acquir Immune Defic Syndr* 62: 1-9.
33. Kassahun K, McIntosh I, Cui D, Hreniuk D, Merschman S, et al. (2007) Metabolism and disposition in humans of raltegravir (MK-0518), an anti-AIDS drug targeting the human immunodeficiency virus 1 integrase enzyme. *Drug Metab Dispos* 35: 1657-1663.
34. Hicks C, Gulick RM (2009) Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor. *Clin Infect Dis* 48: 931-939.
35. Seclen E, Gonzalez Mdel M, Corral A, de Mendoza C, Soriano V, et al. (2010) High prevalence of natural polymorphisms in Gag (CA-SP1) associated with reduced response to Bevirimat, an HIV-1 maturation inhibitor. *Aids* 24: 467-469.
36. Yeni P (2006) Update on HAART in HIV. *J Hepatol* 44: S100-103.
37. UNAIDS (2013) UNAIDS: UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC 2013. Who Library Cataloguing in Publication data.
38. ONUSIDA (2011) INFORME DE ONUSIDA PARA EL DÍA MUNDIAL DEL SIDA | 2011.
39. UNAIDS (2010) UNAIDS: UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC 2010. Who Library Cataloguing in Publication data.
40. UNAIDS (2010) UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC 2010.
41. Estevez ME, Bruno S, Sen L, Scaglione C, Diez RA, et al. (1983) [Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) with Kaposi's sarcoma in homosexuals in Argentina]. *Medicina (B Aires)* 43: 477.
42. ETS DdSy (2010) Boletín sobre el VIH-sida en la Argentina. In: Ministerio de Salud PdIN, editor.
43. SIDA Bd (2012) Boletín Epidemiológico de SIDA 2012. Ministerio de Salud de la Nación.
44. UNAIDS (1998) Expanding the global response to HIV/AIDS through focused action. Reducing risk and vulnerability: definitions, rationale and pathways.
45. Pando MA, Berini C, Bibini M, Fernandez M, Reinaga E, et al. (2006) Prevalence of HIV and other sexually transmitted infections among female commercial sex workers in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 74: 233-238.
46. Pando MA, Gomez-Carrillo M, Vignoles M, Rubio AE, dos Ramos Farias MS, et al. (2011) Incidence of HIV type 1 infection, antiretroviral drug resistance, and molecular characterization in newly diagnosed individuals in Argentina: A Global Fund Project. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27: 17-23.

47. Weissenbacher M, Rossi D, Radulich G, Sosa-Estani S, Vila M, et al. (2003) High seroprevalence of bloodborne viruses among street-recruited injection drug users from Buenos Aires, Argentina. *Clin Infect Dis* 37 Suppl 5: S348-352.
48. Rossi D, Radulich G, Muzzio E, Naveira J, Sosa-Estani S, et al. (2008) Multiple infections and associated risk factors among non-injecting cocaine users in Argentina. *Cad Saude Publica* 24: 965-974.
49. Pando MA, De Salvo C, Bautista CT, Eyzaguirre L, Carrion G, et al. (2008) Human immunodeficiency virus and tuberculosis in Argentina: prevalence, genotypes and risk factors. *J Med Microbiol* 57: 190-197.
50. Weissenbacher M, Casco R, Reboredo G, Benetucci J, Bermejo A, et al. Prevalence of HIV and STI in five hospitals from Buenos Aires, Argentina. ; 2003; Punta del Este, Uruguay.
51. Dos Ramos Farias MS, Garcia MN, Reynaga E, Romero M, Vaulet ML, et al. (2011) First report on sexually transmitted infections among trans (male to female transvestites, transsexuals, or transgender) and male sex workers in Argentina: high HIV, HPV, HBV, and syphilis prevalence. *Int J Infect Dis* 15: e635-640.
52. Gomez Carrillo M, Piccardo C, Libonatti O (1992) [Molecular analysis of the principal neutralization epitope (V3 loop) of human immunodeficiency virus type 1 in Argentina]. *Rev Argent Microbiol* 24: 91-101.
53. Marquina S, Leitner T, Rabinovich RD, Benetucci J, Libonatti O, et al. (1996) Coexistence of subtypes B, F, and as B/F env recombinant of HIV type 1 in Buenos Aires Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12: 1651-1654.
54. Fernandez-Medina D, Jansson M, Rabinovich RD, Libonatti O, Wigzell H (1999) Identification of human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and F B/F recombinant and dual infection with these subtypes in Argentina. *Scand J Infect Dis* 31: 235-242.
55. Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, Salomon H, Hierholzer J, et al. (2001) Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *Aids* 15: F41-47.
56. Fernandez-Garcia A, Perez-Alvarez L, Cuevas MT, Delgado E, Munoz-Nieto M, et al. (2010) Identification of a new HIV type 1 circulating BF intersubtype recombinant form (CRF47\_BF) in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 827-832.
57. Saladini F, Foley BT, Rosi A, Vicenti I, Nannetti G, et al. Near Full-Length Sequence Analysis of HIV Type 1 BF Recombinants from Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses*.
58. De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, et al. (2006) Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 1-13.
59. Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, et al. (2006) Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 6: 368-377.
60. Guimaraes ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG (2008) Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *Aids* 22: 433-435.
61. Ruchansky D, Casado C, Russi JC, Arbiza JR, Lopez-Galindez C (2009) Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38\_BF1) in Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 351-356.
62. Gómez Carrillo M SH, Pando MA, et al (2001) Distribución de subtipos y recombinantes del HIV, situación en la Argentina. *Medicina* 61: 881-889.
63. Pando MA, Eyzaguirre LM, Carrion G, Montano SM, Sanchez JL, et al. (2007) High genetic variability of HIV-1 in female sex workers from Argentina. *Retrovirology* 4: 58.
64. Cot MC, Poulain M, Delagneau JF, Peeters M, Brun-Vezinet F (1988) Dual HIV-1 and HIV-2 infection in West Africa supported by synthetic peptide analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 4: 239-241.

65. Evans LA, Moreau J, Odehouri K, Seto D, Thomson-Honnebier G, et al. (1988) Simultaneous isolation of HIV-1 and HIV-2 from an AIDS patient. *Lancet* 2: 1389-1391.
66. Nkengasong JN, Kestens L, Ghys PD, Koblavi-Deme S, Otten RA, et al. (2000) Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 and type 2: impact on HIV type 1 viral load and immune activation markers in HIV-seropositive female sex workers in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1371-1378.
67. Ramos A, Hu DJ, Nguyen L, Phan KO, Vanichseni S, et al. (2002) Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users. *J Virol* 76: 7444-7452.
68. Jost S, Bernard MC, Kaiser L, Yerly S, Hirschel B, et al. (2002) A patient with HIV-1 superinfection. *N Engl J Med* 347: 731-736.
69. Levy JA (2003) Is HIV superinfection worrisome? *Lancet* 361: 98-99.
70. van der Kuyl AC, Cornelissen M (2007) Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology* 4: 67.
71. Kijak GH, McCutchan FE (2005) HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination. *Curr Infect Dis Rep* 7: 480-488.
72. Kozaczynska K, Cornelissen M, Reiss P, Zorgdrager F, van der Kuyl AC (2007) HIV-1 sequence evolution in vivo after superinfection with three viral strains. *Retrovirology* 4: 59.
73. Gross KL, Porco TC, Grant RM (2004) HIV-1 superinfection and viral diversity. *Aids* 18: 1513-1520.
74. Taylor JE, Korber BT (2005) HIV-1 intra-subtype superinfection rates: estimates using a structured coalescent with recombination. *Infect Genet Evol* 5: 85-95.
75. Herbinger KH, Gerhardt M, Piyasirisilp S, Mloka D, Arroyo MA, et al. (2006) Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 599-606.
76. Tsui R, Herring BL, Barbour JD, Grant RM, Bacchetti P, et al. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 superinfection was not detected following 215 years of injection drug user exposure. *J Virol* 78: 94-103.
77. Diaz RS, Pardini R, Catroxo M, Operskalski EA, Mosley JW, et al. (2005) HIV-1 superinfection is not a common event. *J Clin Virol* 33: 328-330.
78. Smith DM, Wong JK, Hightower GK, Ignacio CC, Koelsch KK, et al. (2004) Incidence of HIV superinfection following primary infection. *Jama* 292: 1177-1178.
79. Piantadosi A, Chohan B, Chohan V, McClelland RS, Overbaugh J (2007) Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog* 3: e177.
80. Blish CA, Dogan OC, Derby NR, Nguyen MA, Chohan B, et al. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 superinfection occurs despite relatively robust neutralizing antibody responses. *J Virol* 82: 12094-12103.
81. Goulder PJ, Walker BD (2002) HIV-1 superinfection--a word of caution. *N Engl J Med* 347: 756-758.
82. Casado C, Pernas M, Alvaro T, Sandonis V, Garcia S, et al. (2007) Coinfection and superinfection in patients with long-term, nonprogressive HIV-1 disease. *J Infect Dis* 196: 895-899.
83. Blick G, Kagan RM, Coakley E, Petropoulos C, Maroldo L, et al. (2007) The probable source of both the primary multidrug-resistant (MDR) HIV-1 strain found in a patient with rapid progression to AIDS and a second recombinant MDR strain found in a chronically HIV-1-infected patient. *J Infect Dis* 195: 1250-1259.
84. Altfeld M, Allen TM, Yu XG, Johnston MN, Agrawal D, et al. (2002) HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* 420: 434-439.

85. Delviks-Frankenberry K, Galli A, Nikolaitchik O, Mens H, Pathak VK, et al. (2011) Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. *Viruses* 3: 1650-1680.
86. van Wamel JL, Berkhout B (1998) The first strand transfer during HIV-1 reverse transcription can occur either intramolecularly or intermolecularly. *Virology* 244: 245-251.
87. Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, Yu H, Klarmann G, et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol* 76: 11273-11282.
88. Ramirez BC, Simon-Loriere E, Galetto R, Negroni M (2008) Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res* 134: 64-73.
89. Galetto R, Negroni M (2005) Mechanistic features of recombination in HIV. *AIDS Rev* 7: 92-102.
90. Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, et al. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *J Virol* 73: 6810-6820.
91. Delgado E, Ampofo WK, Sierra M, Torpey K, Perez-Alvarez L, et al. (2008) High prevalence of unique recombinant forms of HIV-1 in Ghana: molecular epidemiology from an antiretroviral resistance study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48: 599-606.
92. Land AM, Ball TB, Luo M, Rutherford J, Sarna C, et al. (2008) Full-length HIV type 1 proviral sequencing of 10 highly exposed women from Nairobi, Kenya reveals a high proportion of intersubtype recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 865-872.
93. McVean G, Awadalla P, Fearnhead P (2002) A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics* 160: 1231-1241.
94. Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, et al. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* 7: 25.
95. Smith DM, Wong JK, Hightower GK, Ignacio CC, Koelsch KK, et al. (2005) HIV drug resistance acquired through superinfection. *Aids* 19: 1251-1256.
96. Smith GR (2001) Homologous recombination near and far from DNA breaks: alternative roles and contrasting views. *Annu Rev Genet* 35: 243-274.
97. Kauppi L, Jeffreys AJ, Keeney S (2004) Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet* 5: 413-424.
98. Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q (2006) HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* 368: 489-504.
99. Taylor BS, Hammer SM (2008) The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 359: 1965-1966.
100. Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM (2007) Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* 81: 10209-10219.
101. Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R (2002) Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2: 461-471.
102. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S (2006) Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids* 20: W13-23.
103. Ariyoshi K, Schim van der Loeff M, Cook P, Whitby D, Corrah T, et al. (1998) Kaposi's sarcoma in the Gambia, West Africa is less frequent in human immunodeficiency virus type 2 than in human immunodeficiency virus type 1 infection despite a high prevalence of human herpesvirus 8. *J Hum Virol* 1: 193-199.
104. Libonatti O, Avila M, Zlatkes R, Pampuro S, Peralta LM, et al. (1998) First report of HIV-2 infection in Argentina. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 18: 190-191.
105. Freed EO (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251: 1-15.

106. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, et al. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331: 280-283.
107. Rao Z, Belyaev AS, Fry E, Roy P, Jones IM, et al. (1995) Crystal structure of SIV matrix antigen and implications for virus assembly. *Nature* 378: 743-747.
108. Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI (1996) Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3099-3104.
109. Bryant M, Ratner L (1990) Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 523-527.
110. Ghanam RH, Samal AB, Fernandez TF, Saad JS (2012) Role of the HIV-1 Matrix Protein in Gag Intracellular Trafficking and Targeting to the Plasma Membrane for Virus Assembly. *Front Microbiol* 3: 55.
111. Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, et al. (2006) Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11364-11369.
112. Wills JW, Craven RC (1991) Form, function, and use of retroviral gag proteins. *Aids* 5: 639-654.
113. Lokhandwala PM, Nguyen TL, Bowzard JB, Craven RC (2008) Cooperative role of the MHR and the CA dimerization helix in the maturation of the functional retrovirus capsid. *Virology* 376: 191-198.
114. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, et al. (2009) X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell* 137: 1282-1292.
115. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Yeager M (2011) Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* 469: 424-427.
116. Worthylake DK, Wang H, Yoo S, Sundquist WI, Hill CP (1999) Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55: 85-92.
117. Wright ER, Schooler JB, Ding HJ, Kieffer C, Fillmore C, et al. (2007) Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *EMBO J* 26: 2218-2226.
118. Summers MF, Henderson LE, Chance MR, Bess JW, Jr., South TL, et al. (1992) Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci* 1: 563-574.
119. Godet J, Mely Y (2010) Biophysical studies of the nucleic acid chaperone properties of the HIV-1 nucleocapsid protein. *RNA Biol* 7: 687-699.
120. Crist RM, Datta SA, Stephen AG, Soheilian F, Mirro J, et al. (2009) Assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag-leucine zipper chimeras: implications for retrovirus assembly. *J Virol* 83: 2216-2225.
121. Hogue IB, Hoppe A, Ono A (2009) Quantitative fluorescence resonance energy transfer microscopy analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Gag-Gag interaction: relative contributions of the CA and NC domains and membrane binding. *J Virol* 83: 7322-7336.
122. Sandefur S, Smith RM, Varthakavi V, Spearman P (2000) Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol* 74: 7238-7249.
123. Bell NM, Lever AM (2013) HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol* 21: 136-144.
124. De Rocquigny H, Gabus C, Vincent A, Fournie-Zaluski MC, Roques B, et al. (1992) Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6472-6476.

125. Lu K, Heng X, Summers MF (2011) Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *J Mol Biol* 410: 609-633.
126. Hill MK, Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J (2002) Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1 infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability. *J Virol* 76: 11245-11253.
127. Gottlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA (1991) Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3195-3199.
128. Haraguchi H, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa Y (2012) A large extension to HIV-1 Gag, like Pol, has negative impacts on virion assembly. *PLoS One* 7: e47828.
129. Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO (2004) Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14889-14894.
130. Clever J, Sasseti C, Parslow TG (1995) RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 69: 2101-2109.
131. Luban J, Goff SP (1994) Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* 68: 3784-3793.
132. D'Souza V, Summers MF (2005) How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* 3: 643-655.
133. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI (2008) The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18: 203-217.
134. Mateu MG (2009) The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. *FEBS J* 276: 6098-6109.
135. Morita E, Sundquist WI (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 395-425.
136. Bieniasz PD (2006) Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344: 55-63.
137. Pettit SC, Lindquist JN, Kaplan AH, Swanstrom R (2005) Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. *Retrovirology* 2: 66.
138. Weber IT (1990) Comparison of the crystal structures and intersubunit interactions of human immunodeficiency and Rous sarcoma virus proteases. *J Biol Chem* 265: 10492-10496.
139. Pettit SC, Everitt LE, Choudhury S, Dunn BM, Kaplan AH (2004) Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism. *J Virol* 78: 8477-8485.
140. Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika E, Schiffer CA (2002) Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes. *Structure* 10: 369-381.
141. Fun A, Wensing AM, Verheyen J, Nijhuis M (2012) Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology* 9: 63.
142. Davis DA, Soule EE, Davidoff KS, Daniels SI, Naiman NE, et al. (2012) Activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors against the initial autocleavage in Gag-Pol polyprotein processing. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 3620-3628.
143. Louis JM, Aniana A, Weber IT, Sayer JM (2011) Inhibition of autoprocessing of natural variants and multidrug resistant mutant precursors of HIV-1 protease by clinical inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9072-9077.
144. Croteau G, Doyon L, Thibeault D, McKercher G, Pilote L, et al. (1997) Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. *J Virol* 71: 1089-1096.

145. Mahalingam B, Louis JM, Reed CC, Adomat JM, Krouse J, et al. (1999) Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease. *Eur J Biochem* 263: 238-245.
146. Zhang YM, Imamichi H, Imamichi T, Lane HC, Falloon J, et al. (1997) Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J Virol* 71: 6662-6670.
147. Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, et al. (1999) Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *Aids* 13: 2349-2359.
148. Prado JG, Wrin T, Beauchaine J, Ruiz L, Petropoulos CJ, et al. (2002) Amprenavir-resistant HIV-1 exhibits lopinavir cross-resistance and reduced replication capacity. *Aids* 16: 1009-1017.
149. Nijhuis M, van Maarseveen NM, Lastere S, Schipper P, Coakley E, et al. (2007) A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS Med* 4: e36.
150. Ghosh J, Delaugerre C, Flandre P, Galimand J, Cohen-Codar I, et al. (2011) Polymorphism in Gag gene cleavage sites of HIV-1 non-B subtype and virological outcome of a first-line lopinavir/ritonavir single drug regimen. *PLoS One* 6: e24798.
151. Liegeois F, Reteno DG, Mouinga-Ondeme A, Sica J, Rouet F (2013) Short communication: high natural polymorphism in the gag gene cleavage sites of non-B HIV type 1 isolates from Gabon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29: 1179-1182.
152. Database LÁ (2008) HIV sequence database.
153. Schultz AK, Zhang M, Leitner T, Kuiken C, Korber B, et al. (2006) A jumping profile Hidden Markov Model and applications to recombination sites in HIV and HCV genomes. *BMC Bioinformatics* 7: 265.
154. Morner A, Bjorndal A, Albert J, Kewalramani VN, Littman DR, et al. (1999) Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage. *J Virol* 73: 2343-2349.
155. Gervaix A, West D, Leoni LM, Richman DD, Wong-Staal F, et al. (1997) A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4653-4658.
156. Votteler J, Neumann L, Hahn S, Hahn F, Rauch P, et al. Highly conserved serine residue 40 in HIV-1 p6 regulates capsid processing and virus core assembly. *Retrovirology* 8: 11.
157. Archer J, Pinney JW, Fan J, Simon-Loriere E, Arts EJ, et al. (2008) Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints. *PLoS Comput Biol* 4: e1000178.
158. Iglesias-Sanchez MJ, Lopez-Galindez C (2002) Analysis, quantification, and evolutionary consequences of HIV-1 in vitro recombination. *Virology* 304: 392-402.
159. Hemelaar J (2013) Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *J Infect* 66: 391-400.
160. Aldrich C, Hemelaar J (2012) Global HIV-1 diversity surveillance. *Trends Mol Med* 18: 691-694.
161. Petroni AD, Gabriel; Pryluka, D; Rotryng F; Bortolozzi R; Lopardo G; Bouzas M B; Zapiola I; Garone D; Rodríguez C; Chioconci E; Lázaro M E; Murano F; Maranzana A; Oliva S M; Aparicio M; Beltrán M; Benetucci J (2006) Update on Primary HIV-1 Resistance in Argentina: Emergence of Mutations Conferring High-Level Resistance to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in Drug-Naive Patients. *JAIDS* 42: 506-510.
162. Aulicino PC, Bello G, Guimaraes ML, Ruchansky D, Rocco C, et al. (2011) Longitudinal analysis of HIV-1 BF1 recombinant strains in vertically infected children from Argentina reveals a decrease in CRF12\_BF pol gene mosaic patterns and high diversity of BF unique recombinant forms. *Infect Genet Evol* 11: 349-357.

163. Guimaraes ML, Velarde-Dunois KG, Segurondo D, Morgado MG (2012) The HIV-1 epidemic in Bolivia is dominated by subtype B and CRF12\_BF "family" strains. *Virology* 9: 19.
164. Quarleri JF, Rubio A, Carobene M, Turk G, Vignoles M, et al. (2004) HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: descriptive analysis from 284 patients under treatment failure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 1100-1107.
165. Carobene MG, Rodrigues CR, De Candia CA, Turk G, Salomon H (2009) In vitro dynamics of HIV-1 BF intersubtype recombinants genomic regions involved in the regulation of gene expression. *Virology* 6: 107.
166. Carobene MG, Rubio AE, Carrillo MG, Maligne GE, Kijak GH, et al. (2004) Differences in frequencies of drug resistance-associated mutations in the HIV-1 pol gene of B subtype and BF intersubtype recombinant samples. *J Acquir Immune Defic Syndr* 35: 207-209.
167. De Candia C, Espada C, Duette G, Ghiglione Y, Turk G, et al. (2010) Viral replication is enhanced by an HIV-1 intersubtype recombination-derived Vpu protein. *Virology* 7: 259.
168. Rodriguez AM, Turk G, Pascutti MF, Ferrer F, Najera JL, et al. (2009) Characterization of DNA and MVA vectors expressing Nef from HIV-1 CRF12\_BF revealed high immune specificity with low cross-reactivity against subtype B. *Virus Res* 146: 1-12.
169. Turk G, Gherardi MM, Laufer N, Saracco M, Luzzi R, et al. (2008) Magnitude, breadth, and functional profile of T-cell responses during human immunodeficiency virus primary infection with B and BF viral variants. *J Virol* 82: 2853-2866.
170. Turk G, Carobene M, Monczor A, Rubio AE, Gomez-Carrillo M, et al. (2006) Higher transactivation activity associated with LTR and Tat elements from HIV-1 BF intersubtype recombinant variants. *Retrovirology* 3: 14.
171. De Candia C, Espada C, Duette G, Salomon H, Carobene M (2013) Human immunodeficiency virus-1 BF intersubtype recombinant viral protein U second alpha helix plays an important role in viral release and BST-2 degradation. *J Gen Virol* 94: 758-766.
172. Waheed AA, Freed EO (2012) HIV type 1 Gag as a target for antiviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28: 54-75.
173. Rein A, Datta SA, Jones CP, Musier-Forsyth K (2011) Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs. *Trends Biochem Sci* 36: 373-380.
174. Muriaux D, Darlix JL (2010) Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol* 7: 744-753.
175. Zhu H, Jian H, Zhao LJ (2004) Identification of the 15FRFG domain in HIV-1 Gag p6 essential for Vpr packaging into the virion. *Retrovirology* 1: 26.
176. Salgado GF, Marquant R, Vogel A, Alves ID, Feller SE, et al. (2009) Structural studies of HIV-1 Gag p6ct and its interaction with Vpr determined by solution nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 48: 2355-2367.
177. Dussupt V, Sette P, Bello NF, Javid MP, Nagashima K, et al. (2011) Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are critical for late events of HIV-1 budding. *J Virol* 85: 2304-2315.
178. Mascarenhas AP, Musier-Forsyth K (2009) The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors. *FEBS J* 276: 6118-6127.
179. Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, et al. (2013) Significant reductions in Gag-protease-mediated HIV-1 replication capacity during the course of the epidemic in Japan. *J Virol* 87: 1465-1476.
180. Wright JK, Brumme ZL, Julg B, van der Stok M, Mncube Z, et al. (2012) Lack of association between HLA class II alleles and in vitro replication capacities of recombinant viruses encoding HIV-1 subtype C Gag-protease from chronically infected individuals. *J Virol* 86: 1273-1276.

181. Wright JK, Novitsky V, Brockman MA, Brumme ZL, Brumme CJ, et al. (2011) Influence of Gag-protease-mediated replication capacity on disease progression in individuals recently infected with HIV-1 subtype C. *J Virol* 85: 3996-4006.
182. Wright JK, Brumme ZL, Carlson JM, Heckerman D, Kadie CM, et al. (2010) Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters. *J Virol* 84: 10820-10831.
183. Payne RP, Kloverpris H, Sacha JB, Brumme Z, Brumme C, et al. (2010) Efficacious early antiviral activity of HIV Gag- and Pol-specific HLA-B 2705-restricted CD8+ T cells. *J Virol* 84: 10543-10557.
184. Zuniga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, et al. (2006) Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol* 80: 3122-3125.
185. van Maarseveen NM, Andersson D, Lepsik M, Fun A, Schipper PJ, et al. (2012) Modulation of HIV-1 Gag NC/p1 cleavage efficiency affects protease inhibitor resistance and viral replicative capacity. *Retrovirology* 9: 29.
186. Cote HC, Brumme ZL, Harrigan PR (2001) Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, zidovudine, and/or zalcitabine. *J Virol* 75: 589-594.
187. Quinones-Mateu ME, Gao Y, Ball SC, Marozsan AJ, Abraha A, et al. (2002) In vitro intersubtype recombinants of human immunodeficiency virus type 1: comparison to recent and circulating in vivo recombinant forms. *J Virol* 76: 9600-9613.
188. Baird HA, Gao Y, Galetto R, Lalonde M, Anthony RM, et al. (2006) Influence of sequence identity and unique breakpoints on the frequency of intersubtype HIV-1 recombination. *Retrovirology* 3: 91.
189. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, et al. (2011) Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 365: 493-505.
190. Casado C, Garcia S, Rodriguez C, del Romero J, Bello G, et al. (2001) Different evolutionary patterns are found within human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Gen Virol* 82: 2495-2508.
191. Powell RL, Urbanski MM, Nyambi PN (2008) A heteroduplex assay for the rapid detection of dual Human Immunodeficiency Virus Type 1 infections. *J Virol Methods* 149: 20-27.
192. Piantadosi A, Ngayo MO, Chohan B, Overbaugh J (2008) Examination of a second region of the HIV type 1 genome reveals additional cases of superinfection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 1221.
193. Jurriaans S, Kozaczynska K, Zorgdrager F, Steingrover R, Prins JM, et al. (2008) A sudden rise in viral load is infrequently associated with HIV-1 superinfection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 47: 69-73.
194. Doyon L, Croteau G, Thibeault D, Poulin F, Pilote L, et al. (1996) Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J Virol* 70: 3763-3769.
195. Bally F, Martinez R, Peters S, Sudre P, Telenti A (2000) Polymorphism of HIV type 1 gag p7/p1 and p1/p6 cleavage sites: clinical significance and implications for resistance to protease inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1209-1213.
196. Kolli M, Stawiski E, Chappey C, Schiffer CA (2009) Human immunodeficiency virus type 1 protease-correlated cleavage site mutations enhance inhibitor resistance. *J Virol* 83: 11027-11042.
197. Larrouy L, Chazallon C, Landman R, Capitant C, Peytavin G, et al. (2010) Gag mutations can impact virological response to dual-boosted protease inhibitor combinations in antiretroviral-naïve HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2910-2919.

198. Torrecilla E, Llacer Delicado T, Holguin A (2014) New Findings in Cleavage Sites Variability across Groups, Subtypes and Recombinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *PLoS One* 9: e88099.
199. Malet I, Roquebert B, Dalban C, Wirlden M, Amellal B, et al. (2007) Association of Gag cleavage sites to protease mutations and to virological response in HIV-1 treated patients. *J Infect* 54: 367-374.
200. Kolli M, Lastere S, Schiffer CA (2006) Co-evolution of nelfinavir-resistant HIV-1 protease and the p1-p6 substrate. *Virology* 347: 405-409.
201. Verheyen J, Litau E, Sing T, Daumer M, Balduin M, et al. (2006) Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients. *Antivir Ther* 11: 879-887.
202. Mammano F, Petit C, Clavel F (1998) Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *J Virol* 72: 7632-7637.
203. Resch W, Parkin N, Watkins T, Harris J, Swanstrom R (2005) Evolution of human immunodeficiency virus type 1 protease genotypes and phenotypes in vivo under selective pressure of the protease inhibitor ritonavir. *J Virol* 79: 10638-10649.
204. Maguire MF, Guinea R, Griffin P, Macmanus S, Elston RC, et al. (2002) Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449 and P453 are linked to I50V protease mutants in vivo and cause reduction of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness in vitro. *J Virol* 76: 7398-7406.
205. Parry CM, Kolli M, Myers RE, Cane PA, Schiffer C, et al. (2011) Three residues in HIV-1 matrix contribute to protease inhibitor susceptibility and replication capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 1106-1113.
206. Parry CM, Kohli A, Boinett CJ, Towers GJ, McCormick AL, et al. (2009) Gag determinants of fitness and drug susceptibility in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 83: 9094-9101.
207. Rodriguez-Rodriguez N, Duran A, Bouzas MB, Zapiola I, Vila M, et al. (2013) Increasing trends in primary NNRTI resistance among newly HIV-1-diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *J Int AIDS Soc* 16: 18519.
208. Dilernia DA, Gomez AM, Lourtau L, Marone R, Losso MH, et al. (2007) HIV type 1 genetic diversity surveillance among newly diagnosed individuals from 2003 to 2005 in Buenos Aires, Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 1201-1207.
209. Dilernia DA, Lourtau L, Gomez AM, Ebenrstejin J, Toibaro JJ, et al. (2007) Drug-resistance surveillance among newly HIV-1 diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *Aids* 21: 1355-1360.
210. Krausslich HG, Facke M, Heuser AM, Konvalinka J, Zentgraf H (1995) The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *J Virol* 69: 3407-3419.
211. Rubio AE, Abraha A, Carpenter CA, Troyer RM, Reyes-Rodriguez AL, et al. (2014) Similar Replicative Fitness Is Shared by the Subtype B and Unique BF Recombinant HIV-1 Isolates that Dominate the Epidemic in Argentina. *PLoS One* 9: e92084.