

DISTRIBUCION DE SUBTIPOS Y RECOMBINANTES DEL HIV SITUACIÓN EN LA ARGENTINA

MANUEL GOMEZ CARRILLO, HORACIO SALOMON, MARIA A. PANDO, GUSTAVO KIJAK, MARIA MERCEDES AVILA

Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen Poco tiempo después del descubrimiento del HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) pudo establecerse su característico grado de diversidad y variabilidad. Dentro del HIV-1 se conocen, hasta el momento, 3 grupos, 9 subtipos y al menos 12 formas recombinantes circulantes. Esta diversidad afecta no sólo a nivel taxonómico sino también se relaciona con la profilaxis de la infección por HIV y la terapéutica del SIDA. Numerosos estudios a nivel mundial han demostrado la influencia que la variabilidad tiene tanto en los ensayos de diagnóstico y monitoreo como así también en la patogénesis de la infección por HIV. En la Argentina la epidemia muestra, desde el punto de vista molecular, un panorama complejo. En nuestro país se han descrito la circulación de los subtipos B, F y recientemente una forma recombinante circulante B/F de HIV-1. Los datos de la epidemiología molecular sugieren altos porcentajes y gran diversidad de estas formas recombinantes en la población heterosexual.

Palabras clave: HIV, diversidad, epidemiología molecular, Argentina

Abstract *HIV distribution in subtypes and recombinant forms. Situation in Argentina.* Soon after HIV (Human Immunodeficiency Virus) was discovered, its characteristic level of diversity and variability was established. So far, within HIV-1 it is known that there exist 3 main groups, 9 subtypes and at least 12 recombinant forms. Not only does this diversity affect taxonomy, but also prophylaxis and therapy for HIV infection. Numerous studies worldwide have demonstrated the influence this variability has on both diagnosis and monitoring assays as well as on the pathogenesis of HIV infection. In Argentina, from the molecular point of view, the epidemic shows a complex pattern. HIV-1 subtypes B and F have been described as well as a recombinant B/F form. Epidemiology and molecular data suggest high percentage levels and a great diversity of these recombinant forms in the heterosexual population.

Key words: HIV, diversity, molecular epidemiology, Argentina

Diversidad del virus de la inmunodeficiencia humana

Poco tiempo después del descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)^{1,2} se estableció el alto grado de diversidad y variabilidad que lo caracteriza³. En la actualidad se conocen dos tipos virales: el HIV-1, que presenta una distribución universal, y el HIV-2 endémico en Africa Occidental⁴. Estos dos tipos virales no sólo presentan diversidad en su distribución geográfica sino que poseen diferencias en la estructura genómica, diferencias antigénicas e incluso patogénicas. A partir de estudios filogenéticos desarrollados en los últimos

años se han determinado tres grupos dentro del HIV tipo 1: el grupo M ("main"), el O ("outlier") y el N ("new")^{5, 6, 7} (tabla 1). El grupo M es el más distribuido en el mundo y se encuentra conformado, hasta el momento, por al menos nueve subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K)⁸, que presentan entre sí algunas diferencias en su comportamiento biológico y en su distribución geográfica (tabla 2). Más recientemente se caracterizaron variantes de HIV-1 que contienen secuencias derivadas de dos o más subtipos originadas como consecuencia de la recombinación de genomas heterogéneos^{9,10}. Este fenómeno es asociado a la actividad de "copy choice" (elección de copia) de la transcriptasa reversa cuando una célula es co-infectada con más de una variante viral¹¹. Algunas de estas formas recombinantes se han diseminado en la comunidad dando origen a las denominadas CRF (*circulating recombinant form* o formas recombinantes circulantes). En la actualidad se han descrito 12 CRFs cuya distribución se asocia a diferentes poblaciones y regiones del mundo¹². La complejidad de la epidemia del

Recibido: 5-IX-2001

Aceptado: 16-X-2001

Dirección Postal: Dr. Manuel Gómez Carrillo, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina (UBA), Paraguay 2155 piso 11, 1121 Buenos Aires, Argentina
Fax (54-11) 4508-3705 e-mail: mcarrill@fmed.uba.ar

TABLA 1.- Grupos, subtipos y distribución geográfica del HIV

TIPO	GRUPO	SUBTIPOS	DISTRIBUCIÓN
HIV-1	M	A - K	UNIVERSAL y endémicos en Africa
	O	-	CAMERUN GABON CONGO GUINEA-ECUATORIAL
	N	-	CAMERUN
HIV-2		A - F	Todos endémicos en Africa

TABLA 2.- Designación y distribución geográfica de subtipos y formas recombinantes circulantes del HIV-1 grupo M

	Designación	Distribución geográfica
Subtipos	A	Uganda, Tanzania, Kenya, Somalia
	B	América, Europa, China, Africa
	C	Sur y este de Africa, India, Brasil, EE.UU
	D	Uganda, RDC, Kenya
	F	RDC, Kenya, Congo, Camerún, Brasil
	G	Nigeria, Congo, RDC
	H	Bélgica, Africa
	J	Suecia, RDC
	K	Camerún
	Formas Recombinantes Circulantes	CRF01_AE
CRF02_AG		Africa, EE.UU,
CRF03_AB		Rusia
CRF04_cpx		Grecia, Chipre
CRF05_FD		RDC
CRF06_cpx		Mali, Burkina Faso
CRF07_BC		China
CRF08_BC		China
CRF09_cpx		Senegal
CRF10_CD		Tanzania
CRF11_cpx		RDC
CRF12_BF		Argentina, Uruguay

RDC: República Democrática del Congo (Ex Zaire)

HIV-1 con 3 grupos, 9 subtipos y al menos 12 formas recombinantes circulantes es evidente y este alto grado de diversidad no sólo tiene efectos a nivel epidemiológico

y taxonómico. Entre las principales problemáticas relacionadas con este tema, la profilaxis de la infección por HIV y la terapéutica del SIDA serían las más relevantes^{13,14}.

Metodologías para la caracterización de HIV

Métodos serológicos:

La serología es, desde un punto de vista práctico, la forma más sencilla y de bajo costo para estudios poblacionales con gran número de muestras. Los ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA) basados en péptidos del V3 de la gp120 permiten discriminar con éxito anticuerpos contra virus pertenecientes a los tres grupos de HIV-1 (M, N y O)^{15,16}. Sin embargo estudios llevados a cabo en Europa han demostrado que existen dificultades para diferenciar entre subtipos pertenecientes al grupo M, especialmente para discriminar variantes B y "no B"¹⁷. En algunas regiones del mundo estos métodos han permitido determinar la co-circulación de ciertas variantes como por ejemplo el subtipo B y la CRF01_EA en Tailandia¹⁸ o los subtipos B y C en Sudáfrica¹⁹.

En la Argentina se han realizado algunos trabajos de tipificación basados en péptidos^{20,21} cuyos resultados sugieren una mayor prevalencia de sueros con reactividad hacia péptidos representativos del subtipo B, seguido por el F y A, y también se han encontrado reacciones cruzadas con péptidos de varios subtipos diferentes. Sin embargo cuando estos ensayos se realizaron con péptidos representativos de secuencias consenso locales se pudo establecer una mayor reactividad²² lo cual sugería la existencia de variantes locales que no siempre son representadas por los subtipos prevalentes en la región.

Ensayo de movilidad del heteroduplex (HMA)

Se trata de un método de biología molecular en el cual fragmentos genómicos obtenidos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son hibridados con una serie de fragmentos de referencia pertenecientes a los distintos subtipos²³. La caracterización de las muestras incógnita se obtiene por el análisis de la movilidad diferencial de los "híbridos" en una electroforesis en gel de poliacrilamida.

Este método no requiere laboratorios de alta complejidad y permite obtener resultados a menor costo que la secuenciación nucleotídica. En la actualidad se han desarrollado dos equipos para analizar fragmentos pertenecientes a los genes *gag* y *env* y su uso simultáneo permite hacer estimaciones preliminares sobre la frecuencia de recombinantes²⁴. Sin embargo, dada la cre-

ciente diversidad de recombinantes en el mundo, este método no siempre asegura su detección. Un ejemplo de ello es la CRF12_BF que circula en la Argentina y Uruguay²⁵ que al poseer secuencias pertenecientes al subtipo F en ambos fragmentos de HMA, no es detectada como recombinante.

Secuenciación nucleotídica

La determinación de la secuencia nucleotídica es, sin ningún lugar a dudas, el método más preciso para identificar y caracterizar variantes del HIV-1. La secuenciación del genoma puede ser parcial (segmentos cortos de genes) o total (genoma completo)²⁶. En todos los casos, la información obtenida mediante estos métodos permite realizar estudios filogenéticos, determinación de sitios de recombinación y análisis de la estructura de genomas recombinantes, todos ellos basados en programas de computación.

La automatización de los métodos de secuenciación alcanzada en los últimos años ha permitido acceder a un mayor número de secuencias en corto tiempo. Asimismo se ha podido obtener un mayor número de secuencias de genomas completos de diferentes aislamientos permitiendo una mejor caracterización e identificación de recombinantes que previamente habían sido subestimadas²⁷. Sin embargo, el alto costo del equipamiento y los reactivos utilizados son aún una dificultad para su implementación a gran escala.

Distribución mundial de las variantes del HIV-1

La clasificación del HIV-1 en subtipos es una herramienta molecular valiosa para el monitoreo de la epidemia a escala mundial. Globalmente la variante predominante es el subtipo C seguido por el A, el B y las formas recombinantes CRF01_AE y CRF02_AG²⁸⁻³⁵. La mayor diversidad de miembros del grupo M del HIV-1 se encuentra en África y esto es consistente con las evidencias del origen de la epidemia en este continente. El subtipo C es el predominante en África del sur y en la India³⁶. En Tailandia se establecieron dos epidemias separadas, una donde el subtipo B ha diseminado ampliamente en usuarios de drogas inyectables (UDIs) y otra donde el subtipo E, reconocido actualmente como una forma recombinante CRF01_AE^{33,34}, prevalece en la población heterosexual. Hoy en día se observa un incremento en la diseminación de la CRF01_AE alcanzando un 35% en UDIs y observándose su transmisión también a otros países del sudeste asiático³⁷. Estos datos demuestran claramente que la distribución de diferentes formas del HIV-1 es un proceso dinámico y permiten

especular sobre la mayor o menor capacidad de transmisión de algunas variantes.

En Europa, EEUU y Australia predomina el subtipo B aunque se observa un incremento de variantes "no B" en los últimos años, especialmente en Europa y EEUU, fenómeno atribuible a las crecientes migraciones de los últimos años.

La epidemiología molecular de HIV-1 en América del Sur muestra un perfil complejo. El subtipo B ha sido reconocido como predominante aunque desde comienzos de la década del 90 se han identificado secuencias de los subtipos F y C y también secuencias recombinantes B/F en Brasil, Argentina y Uruguay³⁸⁻⁴². Los estudios basados en HMA y secuenciación en la región indican que el subtipo B es predominante en Brasil, Ecuador, Perú y Bolivia, mientras que en Argentina y Uruguay el subtipo F y probablemente las recombinantes B/F sean las variantes más frecuentes⁴³.

Subtipos de HIV-1 en Argentina

En la Argentina el primer caso de SIDA fue diagnosticado en 1982⁴⁴. Desde aquel año el número de casos de SIDA registrados por el Ministerio de Salud de la Nación hasta marzo de 2001 es 18.925 estimándose en 140.000 el número de personas infectadas⁴⁵. En los últimos años se ha observado un importante incremento de casos entre la población heterosexual.

A principios de la década del 90 se realizó en el Centro Nacional de Referencia para el SIDA (CNRS) el primer estudio basado en la secuencia nucleotídica del HIV-1 de la Argentina⁴⁶. Este estudio está basado en un análisis de la región variable "V3 loop" de la gp120 del HIV-1 en muestras de pacientes con diferente riesgo de infección. Las muestras de este trabajo habían sido obtenidas entre 1989 y 1990. Si bien en aquel momento no se habían definido aún los subtipos hoy conocidos, todas las secuencias obtenidas poseen un patrón similar al subtipo B. Sin embargo el corto segmento secuenciado (no más de 110 bases nucleotídicas) no permite clasificarlas adecuadamente a la luz de los nuevos datos obtenidos.

A partir de 1996 se obtuvieron otras secuencias de HIV-1 en las que se identificaron el subtipo B, F y recombinantes B/F^{41,42}. En todos estos trabajos se obtuvieron secuencias provirales parciales (gen env: V3 y C2-V3) a partir de productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Campodónico y col.* encontraron un 78% de secuencias pertenecientes al subtipo B y 21% de subtipo F en un total de 14 secuencias obtenidas a partir de pacientes UDIs

Marquina y col. caracterizando el C2-V3 del gen *env* encontraron secuencias subtipo B, F y una recombinante

B/F. Estos datos fueron similares a los obtenidos años después por *Fernández Medina y col* que informan otra recombinante B/F para la misma región genómica⁴⁷. Si bien estos trabajos han demostrado la presencia de recombinantes, no permiten estimar en qué proporción están presentes basándose en los datos publicados, ya sea por el bajo número de muestras analizadas o por la falta de un estudio sistemático y bien caracterizado desde el punto de vista poblacional. Por otra parte, dado que las secuencias obtenidas pertenecen a segmentos cortos, el porcentaje de recombinantes puede estar subestimado en virtud de la posibilidad de que existan otros sitios de recombinación en porciones del genoma no analizadas.

En trabajos independientes publicados en el año 2000 se describe un alto porcentaje de secuencias del subtipo F y recombinantes B/F en poblaciones similares^{48,49}. Las variantes F y recombinantes B/F fueron encontradas en alta proporción en UDIs y en la población heterosexual mientras que el subtipo B predominó en la población de hombres que tienen sexo con hombres.

En 1999 se inició un estudio en el Centro Nacional de Referencia para el SIDA con el objetivo de realizar la caracterización genética de los subtipos de HIV en gestantes y sus parejas sexuales en Buenos Aires y determinar los factores de riesgo para adquirir la infección en esta población. Se incorporaron 175 voluntarios (134 mujeres y 41 hombres, parejas sexuales de las mismas). Por el método de HMA se caracterizó una porción de la gp120 del gen *env* y se encontró que el 76,9 % de las mujeres y el 73 % de los hombres presentaban secuencias relacionadas con el subtipo F. El resto de las determinaciones correspondieron al subtipo B con excepción de una muestra que mostró un patrón correspondiente al subtipo C. La secuenciación completa del gen *env* en 16 de estas muestras (11 subtipo F y 5 subtipo B por HMA) demostraron que el 85% eran recombinantes B/F^{50,51,52}. Ante estas evidencias la espe-

culación acerca de la circulación de una nueva CRF en el mundo se hizo más consistente.

La secuenciación del genoma completo de muestras de Argentina fue encarada al poco tiempo de conocidos estos resultados^{53,25}. En el trabajo de *Carr y col.* se describe la estructura de una nueva forma recombinante denominada CRF12_BF, identificada en pacientes de la Argentina y Uruguay (figura 1). Esta recombinante posee una estructura donde predomina el subtipo F pero posee cinco segmentos del subtipo B a lo largo del genoma. Los segmentos tipo B se encuentran al comienzo del gen *gag*, un corto segmento entre proteasa y transcriptasa reversa en el *pol*, la región correspondiente al sitio activo de la transcriptasa reversa, el gen *vpu* y un segmento de la gp41. Asimismo, en este mismo trabajo, se identifican distintas recombinantes con estructuras similares que reflejan la complejidad que la epidemia de HIV tiene a nivel molecular en la región.

Una de las preguntas que cabe hacerse es si estas formas recombinantes ingresaron al país ya formadas o si su generación ocurrió en nuestro país. Ninguna de las secuencias de genoma completo obtenidas hasta el momento han revelado la presencia de subtipo F puro "ancestral" mientras que si hay evidencias de genomas puros del subtipo B. En este sentido el trabajo de *Carr y col* describe tres secuencias completas de niños infectados entre 1984 y 1987 por transmisión vertical. Dos de ellas son recombinantes B/F con una estructura que difiere entre si y con la CRF12_BF. Estas muestras pertenecen a un estudio de caracterización de HIV realizado en el CNRS que pretende dilucidar la dinámica y el momento de cambio en los patrones moleculares del HIV-1 en la Argentina desde el comienzo de la epidemia⁵⁴. En este trabajo, *Gómez Carrillo y col.* realizaron la secuenciación de un fragmento genómico conteniendo el gen *vpu* y parte del gen *env*. En esta región se encuentra un sitio frecuente de recombinación B/F en las muestras caracterizadas de la Argentina. El estudio se

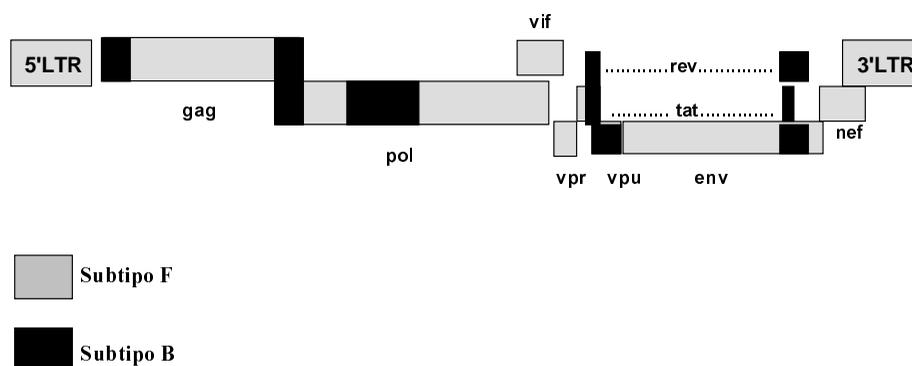


Fig. 1.- Mapa genético del HIV-1. Estructura en mosaico de la forma recombinante circulante en la Argentina (CRF12_BF). Los segmentos en gris corresponden a secuencias pertenecientes al subtipo F. Los segmentos en negro corresponden al subtipo B.

realizó con muestras provenientes de niños nacidos entre 1984 y 2000 en los que la transmisión vertical fue la única vía de infección. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de recombinantes B/F desde el año 1986, poco tiempo después de iniciada la epidemia en nuestro país. Por otro lado, también se encontró un alto porcentaje de estas variantes en niños nacidos desde 1987 hasta el 2000, lo que explicaría de alguna manera el alto porcentaje de recombinantes encontrado en la población heterosexual y sugieren que las recombinantes que circulan en nuestro país tienen un origen más antiguo del que se pensaba originalmente.

Implicancias de la diversidad

El fenómeno de la diversidad del HIV puede tener importancia al considerar distintos aspectos de la epidemia. Las diferencias entre el HIV-1 y el HIV-2 a nivel de su transmisión y progresión a la enfermedad es ya conocida. El HIV-2 presenta una menor capacidad de transmisión y un período de incubación más largo hasta el desarrollo del SIDA^{55,56}. La pregunta que aún no tiene una clara respuesta es si existen diferencias de este tipo entre los distintos subtipos y recombinantes del HIV-1.

A nivel virológico existen algunas evidencias moleculares que permiten especular acerca de propiedades biológicas diferenciales entre subtipos del grupo M. Esto se ha visto reflejado en regiones reguladoras de la transcripción como son las secuencias repetitivas terminales (LTR)^{57,58}. Los datos sugieren que los virus pertenecientes al subtipo C presentan un mayor número de elementos regulatorios, como ser los sitios de unión al factor nuclear kB (NF-kB), lo que le otorgaría a los virus de este subtipo una ventaja en la activación de la replicación por la mayor sensibilidad a citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF).

Desde el punto de vista epidemiológico, estas diferencias son aún contradictorias. En algunos trabajos se ha sugerido una menor tasa de progresión al SIDA en trabajadoras sexuales de Senegal infectadas con el subtipo A⁵⁹, aunque otros autores no encuentran estas diferencias^{60,61}. En otros trabajos relacionan mayor carga viral y mayor depleción de linfocitos CD4 en pacientes infectados con el subtipo C⁶². Otros autores muestran una mayor tasa de transmisión heterosexual para la CRF01_AE en Tailandia que para subtipo B en EE.UU.⁶³, aunque no se han encontrado diferencias en el tiempo de progresión al SIDA entre estas dos variantes. La tasa de progresión de la infección es un fenómeno que varía de persona a persona. La existencia de múltiples factores individuales, probablemente asociados a las poblaciones estudiadas, impide ser concluyente y atribuir solamente al virus las diferencias encontradas en su comportamiento biológico.

Implicancias en el diagnóstico y monitoreo de la infección

Un aspecto importante que se ve influenciado por la diversidad del HIV es el diagnóstico y el monitoreo de la infección. Un ejemplo de ello es que los ensayos serológicos destinados a la detección de anticuerpos contra el HIV-1, no son capaces de determinar eficientemente anticuerpos contra HIV-2 obteniéndose resultados indeterminados por Western blot^{64,65}. La introducción del HIV-2 en Europa y EE.UU. ha llevado a que la industria incorporara antígenos HIV-2 en los equipos de tamizaje para HIV-1 y en algunos casos en equipos confirmatorios^{66, 67,68,69,70}.

Asimismo, el grupo O del HIV-1 fue descubierto por "fallas" en su detección basada en equipos serológicos^{71,72} y actualmente varios equipos comerciales han incorporado antígenos de este grupo para mejorar la sensibilidad de las pruebas.

Con respecto a los métodos basados en biología molecular tanto para la detección de ácidos nucleicos con fines diagnóstico como para su cuantificación en el monitoreo de la infección (carga viral) se han observado algunos problemas en su eficiencia frente a genomas no pertenecientes al subtipo B⁷³⁻⁷⁶. En este sentido cabe señalar que la mayoría de estos equipos fueron diseñados en base a secuencias pertenecientes a este subtipo predominante en EE.UU. y Europa y que varios de ellos se han tenido que re-diseñar, incorporando "primers" o sondas con secuencias compartidas por varios subtipos virales.

El impacto que la diversidad genética tiene en los ensayos genotípicos para la determinación de resistencia frente a los antirretrovirales no escapa a este concepto. La mayor parte de estos equipos comerciales han sido diseñados en base a los patrones de secuencias prevalentes en EE.UU. y Europa^{77,78,79} y por lo tanto puede esperarse que en aquellas regiones del mundo, donde otras variantes son las predominantes, estos equipos pierdan confiabilidad o eficiencia. En este sentido se ha encontrado una baja reactividad de muestras de pacientes vírgenes de tratamiento pertenecientes a los subtipos C, D, E y recombinantes B/F de Brasil utilizando el ensayo de hibridación Inno-LIPA HIV-1 RT⁸⁰.

En la Argentina se ha detectado una baja reactividad de este ensayo en el codón 74 de la transcriptasa reversa⁸¹. En este trabajo, *Kijak y col.* describen la presencia de un polimorfismo en el codón 72 (AGA ≥ AGG) cuya prevalencia en la población argentina fue del 39,81% mientras que del análisis de secuencias de otras partes del mundo su porcentaje es 5,6% y 17,2% en otros países de América Latina. En un trabajo posterior, estos autores determinan, en base a un detallado análisis filogenético, que este polimorfismo está altamente asociado con las formas recombinantes B/F que circulan en

nuestro país⁸² y en el cual describen un porcentaje mayor al 87% de recombinantes en muestras con fallas en la detección. La diversidad de HIV-1 es creciente en el tiempo y por lo tanto es de esperar la emergencia de este tipo de problemas con los equipos comerciales en el futuro.

La presencia de mutaciones asociadas a resistencia en pacientes vírgenes de tratamiento parece ser mayor en aquellos países con amplio acceso al tratamiento antirretroviral⁸³. En la Argentina, donde el acceso a la terapia antirretroviral fue posterior, los trabajos relacionados con este tema describen porcentajes menores de estas mutaciones⁸⁴. Hasta el momento no hay evidencias concretas que permitan vincular mutaciones asociadas a resistencia con subtipos o formas recombinantes y los estudios en tal sentido indican que su presencia no se relaciona con una característica intrínseca de las variantes o subtipos sino más bien son el producto de infecciones por cepas resistentes generadas previamente⁸⁵.

Influencia de la diversidad en el desarrollo de vacunas

En el terreno de la diversidad del HIV hay una pregunta inevitable: ¿Puede esta diversidad influir en la eficacia de las vacunas actualmente en desarrollo y evaluación? La mayoría de las vacunas candidatas se basan en el subtipo B y sería lógico pensar que su uso en regiones donde otros subtipos son los prevalentes es destinar al fracaso los ensayos. Sin embargo no existen pruebas concluyentes que permitan predecir este fracaso. Por el contrario existen varias publicaciones cuyos resultados indican que tanto a nivel de epitopes neutralizantes como citotóxicos hay respuestas cruzadas entre muchos subtipos^{86,87}. Solamente ensayos clínicos bien planificados, aplicados a distintas poblaciones a nivel mundial donde la diversidad del HIV está comprobada, permitirán dilucidar esta cuestión.

Perspectivas

No existen dudas acerca de la influencia que la variabilidad de HIV tiene en la problemática del SIDA. Dentro de cada subtipo o forma recombinante existen además una gran cantidad de variantes (cuasiespecies) que evolucionan constantemente a lo largo de una infección individual y le otorgan a la población viral infectante una gran "plasticidad" al momento de evadir la respuesta inmune y la acción terapéutica a la que está sometido el individuo.

El conocimiento de subtipos y formas recombinantes ha abierto un nuevo panorama en el estudio de la diversidad cuyas implicancias en la evolución de la pandemia

son aún inciertas. Sin embargo, este conocimiento ha permitido dilucidar la complejidad de la epidemia a nivel molecular y aporta un elemento de gran utilidad en los estudios epidemiológicos, ya que permite "monitorear" conexiones entre diferentes poblaciones.

El correlato biológico de este nivel de diversidad deberá profundizarse tomando como ejemplo las evidencias concretas que existen con el HIV-2 y también con algunos virus simianos, como el SIVagm, en los cuales se advierte una menor patogenicidad^{85,88,89,90}. La búsqueda de "factores" virales en un caso y del hospedador en el otro, que determinan este comportamiento diferencial, puede ser una respuesta a los problemas a los que nos enfrenta el HIV-1 en la actualidad.

Existen evidencias claras del efecto de la diversidad sobre las pruebas diagnósticas y de monitoreo. Teniendo en cuenta la constante generación de variantes de HIV, es de esperar un incremento de la diversidad con el tiempo y por lo tanto nuevos problemas en la utilización de métodos basados en biología molecular. La vigilancia y determinación del surgimiento de variantes es necesaria.

El desarrollo de vacunas frente al HIV podría verse afectado pero sólo con ensayos clínicos adecuados se determinará la eficacia en las poblaciones donde el subtipo de su fórmula no es prevalente.

En la Argentina la epidemia de HIV parece ser sumamente compleja. Hasta el momento todo indica que el subtipo B no es el predominante y que la diversidad de HIV tiene diferentes proporciones en las distintas poblaciones. En el momento de implementar ensayos de vacunas y de aplicar nuevas tecnologías de diagnóstico o monitoreo de la infección por HIV en la Argentina, será necesario tener un profundo conocimiento de la epidemiología molecular del virus.

Agradecimientos: Este trabajo fue parcialmente financiado con el subsidio PICT 05 0473 Argentina.

Bibliografía

1. Barré Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220: 868-70.
2. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, et al. Isolation of human T cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 865-7.
3. Alizon M, Wain-Hobson S, Montagnier L, Sonigo P. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* 1986, 46:63-74
4. Clavel F, Guétard D, Brun Vézinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343-6.
5. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Jeang KT, Henderson LE, Pavlakis GN. (eds). Human Retroviruses and AIDS: A compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid

- Sequences. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1994.
6. Myers G, Korber B, Foley B, Jeang KT, Mellors JW, Wain Hobson S. (eds). Human Retroviruses and AIDS: A compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1996.
 7. Simon F, Mauciere P, Roques P, et al. Identification of a new Human Immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998; 4: 1032-7.
 8. McCutchan F. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* 2000, 14 (suppl 3) S31-S44.
 9. Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, et al. A Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol* 1994 Oct;68: 6340-6
 10. Carr JK, Salminen MO, Koch C, et al. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* 1996; 70:5935-43
 11. Robertson DL, Sharp PM, Mc Cutchan FE, Hahn BH. Recombination of HIV-1. *Nature* 1995; 374: 124-6.
 12. Los Alamos National Laboratory: HIV sequence database; <http://hiv-web.lanl.gov>. (acceso: Agosto 15/2001)
 13. Wain Hobson S. Is antigenic variation of HIV important for AIDS and what might be expected in the future. *In: The Evolutionary biology of viruses*, Stephen S Morse (eds). New York: Raven Press: 1994 p 185 –210.
 14. Levy J. HIV and the pathogenesis of AIDS. 2nd Edition. Washington DC: ASM Press, 1998.
 15. Mauciere P, Loussert-Ajaka I, Damond F, et al..Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon *AIDS*. 1997 Mar 15;11:445-53.
 16. Mauciere P, Damond F, Apetrei C et al. Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:987-93.
 17. Nkengasong JN, Willems B, Janssens W, et al. Lack of correlation between V3-loop peptide enzyme immunoassay serologic subtyping and genetic sequencing. *AIDS* 1998; 12:1405-12.
 18. Wasi C, Herring B, Raktham S, et al. Determination of HIV-1 subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand, using peptide-binding enzyme immunoassay and heteroduplex mobility assay: evidence of increasing infection with HIV-1 subtype E. *AIDS*. 1995; 9:843-9.
 19. Cheingsong-Popov R, Williamson C, Lister S, et al. Usefulness of HIV-1 V3 serotyping in studying the HIV-1 epidemic in South Africa. *AIDS*. 1998;12:949-50
 20. Warren RQ, Wong MT, Melcher GP, et al. Serologic evaluation of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals from Argentina and the United States indicates a similar distribution of subgroup B isolates. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:481-3.
 21. Devito C, Levi M, Hinkula J, Fernandez Medina RD, Libonatti O, Wigzell H. Seroreactivity to HIV-1 V3 subtypes A to H peptides of Argentinian HIV-positive sera. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 17:156-9.
 22. Pampuro SE, Calarota SA, Marquina SA, Rabinovich RD, Libonatti OV. Reactivity of Argentine serum samples against synthetic V3-based HIV-1 peptides. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 12: 527-8.
 23. Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, Mullins JI. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. *PCR Methods Appl* 1995; 4:S202-16
 24. Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, et al..Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J Virol* 2000; 74: 363-70.
 25. Carr JA, Avila M, Gomez Carrillo M, et al. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS* 2001: F41-F47
 26. Salminen MO, Koch C, Sanders-Buell E, et al. Recovery of virtually full-length HIV-1 provirus of diverse subtypes from primary virus cultures using the polymerase chain reaction. *Virology*.1995; 213:80-6.
 27. Carr JK, Foley BT, Leitner T, Salminen M, Korber B, McCutchan F. Reference Sequences Representing the Principal Genetic Diversity of HIV-1 in the Pandemic. *In: Korber B et al (eds). Human Retroviruses and AIDS 1998*. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1999; III: 10-9.
 28. Rodenburg CM, Li Y, Trask SA, et al; The UNAIDS and NIAID Networks for HIV Isolation and Characterization. Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:161-8.
 29. Montavon C, Toure-Kane C, Liegeois F, et al. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23:363-74.
 30. Peeters M, Esu-Williams E, Vergne L, et al. Predominance of subtype A and G HIV type 1 in Nigeria, with geographical differences in their distribution. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16:315-25.
 31. Dietrich U, Grez M, von Briesen H, et al. HIV-1 strains from India are highly divergent from prototypic African and US/European strains, but are linked to a South African isolate. *AIDS* 1993;7:23-7.
 32. Peeters M. Recombinant HIV sequences. Their role in the global epidemic. *In: Kuiken CL, et al (eds). Human Retroviruses and AIDS 2000*. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory.
 33. Carr JK, Salminen MO, Koch C, et al. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* 1996, 70:5935-43.
 34. Gao F, Robertson DL, Morrison SG, et al. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 1996, 70:7013-7029.
 35. Gao F, Robertson CD, Carruthers Y, et al. An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* 72:10234-41.
 36. Jameel S, Zafrullah M, Ahmad M, Kapoor GS, Sehgal S. A genetic analysis of HIV-1 from Punjab, India reveals the presence of multiple variants. *AIDS*. 1995; 9:685-90.
 37. Chen YM, Huang KL, Jen I, et al. .Temporal trends and molecular epidemiology of HIV-1 infection in Taiwan from 1988 to 1998. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001; 26:274-82.
 38. Louwagie J, Delwart EL, Mullins JI, McCutchan FE, Eddy G, Burke DS. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994; 10:561-7.
 39. Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994 May; 10:569-76.
 40. Csillag C.HIV-1 subtype C in Brazil. *Lancet*. 1994. 12; 344: 1354

41. Campodonico M., Janssens W., Heyndrickx L., et al. HIV type 1 subtypes in Argentina and Genetic Heterogeneity of the V3 region. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1996; 12: 79-81.
42. Marquina S., Leitner T., Rabinovich R., Benetucci J., Libonatti O., Albert J. Co-existence of subtypes B, F and B/F env recombinant of HIV type 1 in Buenos Aires, Argentina. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1996; 17: 1651-4.
43. Russell KL, Carcamo C, Watts D, et al. Emerging Genetic Diversity of HIV-1 in South America. *AIDS* 2000; 14:1785-91.
44. Estevez ME, Bruno S, Sen L, Scaglione C, Diez RA, Musso AM. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida con sarcoma de Kaposi en homosexuales en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 1983; 43: 477.
45. El SIDA en la Argentina: Año 2 - Número 2 - Marzo 2001, Lusida, Proyecto de Control del SIDA y ETS. Ministerio de Salud, Unidad Coordinadora Ejecutora VIH/SIDA y ETS.
46. Gomez Carrillo M, Piccardo C, Libonatti O. Molecular analysis of the principal neutralization epitope (V3 loop) of human immunodeficiency virus type 1 in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 1992, 24:91-101
47. Fernandez-Medina D, Jansson M, Rabinovich RD, Libonatti O, Wigzell H. 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*. 1999;31:235-42.
48. Thomson M, Villahermosa M, Vazquez-de-Parga E, et al. Widespread circulation of B/F intersubtype recombinant form among HIV-1 infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS* 2000, 5;14:897-9.
49. Masciotra S, Livellara B, Belloso W, et al. Evidence of a high frequency of HIV-1 subtype F infections in a heterosexual population in Buenos Aires, Argentina. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2000, 16:1007-1014.
50. Avila MM, Pando MA, Salomón H, et al. Genetic Epidemiology of HIV-1 infected maternity patients and their sexual partners in Buenos Aires, Argentina XIII International Conference on AIDS. Durban, July 2000 (abstract A2077)
51. Gómez Carrillo M, Pando M, Martínez Peralta L, et al. B/F intersubtype recombinant of HIV-1 is the most common genetic form in an antenatal population in Buenos Aires, Argentina. The 1st IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Buenos Aires, July 8-11 200, (abstract 383)
52. Avila M, Pando M, Martinez Peralta L, et al. HIV-1 B/F intersubtype recombinant predominates in a heterosexual population from Buenos Aires, Argentina (en preparación)
53. Carr J, Avila M, Gomez Carrillo M, Negrete M, Russell K and McCutchan F. BF intersubtype recombinants of highly similar but not identical structure recovered from Argentina, Uruguay and Bolivia and characterized by full genome analysis The 1st IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Buenos Aires, July 8-11, 2001, (abstract 147)
54. Gómez Carrillo, Avila M, Pando M, Martínez Peralta, Russell K, Carr, J.K Early spread of HIV-1 B/F recombinant intersubtype in children born to infected mothers in Argentina. The 1st IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Buenos Aires, July 8-11, 2001(abstract 133).
55. Marlink R, Kanki P, Thior I, et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science*, 1994; 265:1587-90.
56. Kanki PJ, Travers KU, MBoup S, et al. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 1994; 343:943-6.
57. Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, Berkhout B. Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol*. 2000; 74:3740-51.
58. Naghavi MH, Schwartz S, Sonnerborg A, Vahne A. Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999 Sep 20, 15:1293-303.
59. Kanki PJ, Hamel DJ, Sankale JL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* 1999; 179:68-73.
60. Weisman Z, Kalinkovich A, Borkow G, et al. Infection by different HIV-1 subtypes (B and C) results in a similar immune activation profile despite distinct immune backgrounds. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999; 21:157-63.
61. Alaeus A, Lidman K, Bjorkman A, Giesecke J, Albert J. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS*. 1999; 13:901-7.
62. Neilson JR, John GC, Carr JK, et al. Subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and disease stage among women in Nairobi, Kenya. *J Virol*. 1999; 73:4393-403.
63. Nelson KE, Rungruengthanakit K, Margolick J, et al. High rates of transmission of subtype E human immunodeficiency virus type 1 among heterosexual couples in Northern Thailand: role of sexually transmitted diseases and immune compromise. *J Infect Dis* 1999; 180: 337-43.
64. Ayisi NK, Aidoo M. Comparative analysis of HIV-1 and HIV-2 indeterminate western blot patterns. *West Afr J Med* 1994; 13:164-7.
65. Christiansen CB, Wantzin P, Shao JF, et al. High prevalence of indeterminate western blot tests for antibodies to HIV-1 in Tanzania. *AIDS* 1990; 4:1039-40.
66. Vallari AS, Hickman RK, Hackett JR et al. Rapid assay for simultaneous detection and differentiation of immunoglobulin G antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3657-61.
67. Flanagan P, McAlpine L, Ramskill SJ, et al. Evaluation of a combined HIV-1/2 and HTLV-I/II assay for screening blood donors. *Vox Sang* 1995; 68:220-4.
68. Azevedo-Pereira JM, Lourenco MH, Barin F, et al. Multicenter evaluation of a fully automated screening test, VIDAS HIV 1 + 2, for antibodies to human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2559-63.
69. Berry NJ, Salker R, Contreras M, Barbara JA, Tedder RS. A comparison of four enzyme immunoassays for the simultaneous detection of HIV-1- and HIV-2-specific antibody. *J Virol Methods* 1991; 34:91-100.
70. Fransen K, Pollet DE, Peeters M, et al. Evaluation of a line immunoassay for simultaneous confirmation of antibodies to HIV-1 and HIV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:939-46.
71. Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, et al. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet*. 1994 Jun 4; 343:1393-4.
72. Schable C, Zekeng L, Pau CP, et al. Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group O infections. *Lancet* 1994; 344:1333-4.
73. Jenny-Avital ER, Beatrice ST. Erroneously low or undetectable plasma human immunodeficiency virus type

- 1 (HIV-1) ribonucleic acid load, determined by polymerase chain reaction, in West African and American patients with non-B subtype HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1227-30.
74. O'Shea S, Chrystie I, Cranston R, Hu D, Kaptue L, Gurtler L, Dondero T, Tsague JM, Schochetman G, Jaffe H, et al. Problems in the interpretation of HIV-1 viral load assays using commercial reagents. *J Med Virol* 2000; 61:187-94.
 75. Triques K, Coste J, Perret JL, et al. Efficiencies of four versions of the AMPLICOR HIV-1 MONITOR test for quantification of different subtypes of human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 1999; 37:110-6.
 76. Gobbers E, Franssen K, Oosterlaken T, et al. Reactivity and amplification efficiency of the NASBA HIV-1 RNA amplification system with regard to different HIV-1 subtypes. *J Virol Methods* 1997; 66:293-301.
 77. Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, et al.: Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 284-91.
 78. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, et al.: Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 2195-9.
 79. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, et al.: A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Beinr Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 2000;14: F83-93.
 80. Brindeiro R, Vanderborcht B, Caride E, et al.: Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1674-80.
 81. Kijak GH, Carobene MG, Salomon H. A highly prevalent polymorphism at codon 72 of HIV-1 reverse transcriptase in Argentina prevents hybridization reaction at codon 74 in the LiPA genotyping test. *J Virol Methods* 2001; 94:87-95.
 82. Kijak GH, Rubio AE, Quarleri JF and Salomón H HIV-1 Genetic Diversity is a Major Obstacle for Antiretroviral-Drug Resistance Hybridization-Based Assays. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 1415-21.
 83. Wainberg MA, Friedland G Public health implications of antiretroviral therapy and HIV drug resistance. *JAMA* 1998; 279:1977-83
 84. Kijak GH, Pampuro SE, Avila MM et al .Resistance profiles to antiretroviral drugs in HIV-1 drug-naive patients in Argentina. *Antivir Ther* 2001; 6:71-7.
 85. Hertogs K, Bloor S, Kemp SD et al. Phenotypic and genotypic analysis of clinical HIV-1 isolates reveals extensive protease inhibitor cross-resistance: a survey of over 6000 samples. *AIDS* 2000; 14:1203-10.
 86. van der Groen G, Nyambi PN, Beirnaert E, et al. Genetic variation of HIV type 1: relevance of interclade variation to vaccine development. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998; 14 Suppl 3:S211-21.
 87. Cao H, Kanki P, Sankale JL, et al. Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: implications for vaccine development. *J Virol* 1997; 71: 8615-23.
 88. Muller-Trutwin MC, Corbet S, Tavares MD et al. The evolutionary rate of nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIVagm) is in agreement with a rapid and continuous replication in vivo. *Virology* 1996; 223:89-102.
 89. Honjo S, Narita T, Kobayashi R, et al. .Experimental infection of African green monkeys and cynomolgus monkeys with a SIVAGM strain isolated from a healthy African green monkey. *J Med Primatol* 1990; 19:9-20.
 90. Kuhmann SE, Madani N, Diop OM, et al. .Frequent substitution polymorphisms in african green monkey ccr5 cluster at critical sites for infections by simian immunodeficiency virus sivagm, implying ancient virus-host coevolution. *J Virol* 2001; 75:8449-60.

- - -

Para llevar a feliz término una indagación científica, una vez conocidos los métodos conducentes al fin, debemos fijar fuertemente en nuestro espíritu los términos del problema, a fin de provocar energías corrientes de pensamiento, es decir, asociaciones cada vez más complejas y precisas entre las imágenes recibidas por la observación y las ideas que dormitan en nuestro inconsciente; ideas que sólo una concentración vigorosa de nuestras energías mentales podrá llevar al campo de la conciencia. No basta la atención expectante, ahincada; es preciso llegar a la preocupación. Importa aprovechar para la obra todos los momentos lúcidos de nuestro espíritu; ya la meditación que sigue al descanso prolongado, ya el trabajo mental supra-intensivo que sólo da la célula nerviosa caldeada por la congestión, ora en fin, la inesperada intuición que brota a menudo, como chispa del eslabón del choque de la discusión científica.

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

Reglas y Consejos sobre Investigación Científica. Los tónicos de la voluntad,
7º edición, Madrid, 1935