

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>http://dx.doi.org/10.5209/rev_RCCV.2012.v6.n2.41084*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2012 6(2):19-37*

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LA ENVOLTURA Y DE GENOMAS COMPLETOS DE VIRUS DE UN CLUSTER DE VIH-1 DE SUBTIPO F DE RÁPIDA EXPANSIÓN EN GALICIA: PREDICCIÓN DE USO DE CORRECEPTORES Y FILOGENIA

ANALYSIS OF BOTH THE ENVELOPE SEQUENCE AND THE COMPLETE GENOME OF A HIV-1 SUBTYPE F CLUSTER OF RAPID EXPANSION IN GALICIA: CORECEPTOR USE PREDICTION AND PHYLOGENY

Domínguez Palao, F., Vega, Y., Delgado, E., Pérez Álvarez, L., Thomson Okatsu, M.

Unidad de Biología y Variabilidad del VIH Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III Majadahonda, Madrid. Correspondencia con el autor: lperezal@isciii.es

RESUMEN

La epidemia por VIH-1 en España, al igual que en el resto de Europa occidental, está dominada por el subtipo B. Sin embargo, recientemente se ha descrito la rápida expansión de un cluster de subsubtipo F1 entre hombres que tienen relaciones sexuales con hombres en Galicia. Los objetivos de este trabajo son analizar la secuencia de la envoltura de los virus del mencionado cluster para predicción de utilización de correceptores y presencia de aminoácidos característicos, así como caracterizar secuencias de genomas completos, determinando las relaciones filogenéticas con virus de subtipo F de otros países. Los análisis filogenéticos permitieron determinar relaciones del cluster F con virus de Brasil, Suiza, Bélgica, Francia y Gran Bretaña. Por otra parte, se han encontrado posiciones características del cluster en la región V3, diferentes de otras cepas F1, así como en otras regiones de la envoltura. Aparte, se han identificado mutaciones características asociadas a tropismo X4. El cluster de VIH-1 de subtipo F recientemente expandido en Galicia procede de una variante ampliamente diseminada en Europa occidental. Los virus de dicho cluster presentan aminoácidos característicos en la envoltura, identificándose en algunos de ellos mutaciones asociadas a tropismo X4, de potencial relevancia biológica.

Palabras clave: VIH-1, subtipo F, cluster filogenético, envoltura, tropismo

ABSTRACT

The HIV-1 epidemic in Spain, as in the rest of Western Europe, is dominated by subtype B. However, it has recently been reported that a subsubtype F1 cluster has rapidly expanded among men who have sex with men in Galicia. The objectives of this work are to analyze the virus envelope sequence of the aforementioned cluster to predict the use of coreceptors and to examine the presence of characteristic amino acids, as well as to characterize full-length genome sequences, determining the phylogenetic relations with subtype F viruses from other countries. The phylogenetic analyses allowed to determine the relation of the Galician F cluster with viruses from Brazil, Switzerland, Belgium, France and Great Britain. On the other hand, characteristic amino acid residues were found in the V3 loop of viruses of the cluster, differing from other F1 strains, as well as in other regions of the envelope. Additionally, characteristic mutations associated with X4 tropism were identified. The HIV-1 subtype F cluster recently expanded in Galicia derives from a variant widely disseminated in Western Europe. The viruses of the mentioned cluster show characteristic amino acids in the envelope, with mutations associated with X4 tropism having been identified in some of them, which are of potential biological relevance.

Keywords: HIV-1, F subtype, phylogenetic cluster, envelope, tropism

INTRODUCCIÓN

El VIH-1 (virus de inmunodeficiencia humana tipo 1) pertenece al género lentivirus, de la familia *Retroviridae*, y contiene la información genética en forma de ácido ribonucleico (ARN), el cual codifica para tres poliproteínas estructurales comunes a todos los retrovirus, que son Gag, Pol y Env. Codifica, además, para seis genes reguladores y accesorios: *Tat*, *Rev*, *Vpu*, *Vpr*, *Vif* y *Nef*, esenciales para la replicación del virus, Alcamí y Coiras (2011).

Biológicamente, el VIH puede clasificarse en cuatro grupos fundamentales:

- cinética de replicación rápida/alta (R/A) frente a lenta/baja (L/B).
- linfocito-trópicos (L-trópicos) frente a macrófago-trópicos (M-trópicos).
- inductores de sincitios (IS) frente a no inductores de sincitios (NIS).
- uso de correceptores: cepas CCR5 trópicas (R5), CXCR4 trópicas (X4) o dual/mixtas (DM) (pueden utilizar ambos correceptores), Berger (1998), Tscherning *et al.* (1998), Tscherning-Casper *et al.* (2000).

Estas características se correlacionan unas con otras, siendo las cepas X4 o dual/mixtas normalmente R/A, L-trópicas e IS, mientras que las cepas R5 suelen ser L/B, M-trópicas y NIS. Sin embargo, se han descrito ciertas diferencias, Prospero *et al.* (2009). Por otra parte, los determinantes

moleculares de las características biológicas del VIH-1 radican a nivel de la región gp120, fundamentalmente a nivel de la secuencia del bucle V3, Cuevas *et al.* (2010), Fernández-García *et al.* (2009a). Existe una asociación entre aminoácidos cargados positivamente en las posiciones 11 y/o 25 de V3 y el fenotipo IS, Groenink *et al.* (1993), De Jong *et al.* (1992). Además, se han encontrado otros segmentos de Env (envuelta) implicados en las propiedades biológicas del virus, Huang *et al.* (2008).

Actualmente, existen dos formas de predecir o determinar el uso de correceptor en la práctica clínica:

- Métodos fenotípicos, basados en la generación de virus recombinantes, de los cuales el único aceptado actualmente para tratamiento de pacientes con antagonistas de CCR5 es Trofile, o su versión actualizada, ESTA-Trofile.

- Métodos genotípicos, basados en la secuencia de V3 de la envuelta viral, Pérez-Olmeda *et al.* (2008), para lo que se han diseñado diferentes herramientas bioinformáticas que utilizan diversos métodos estadísticos basados en complejos algoritmos diseñados para tal fin. Los programas más utilizados son Geno2Pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) y WebPSSM (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>).

Los métodos fenotípicos son muy precisos y reproducibles, pero muy caros y laboriosos. Por ello, los métodos genotípicos resultan una herramienta más factible, rápida y económica. Sin embargo, estos últimos se basan en la comparación con secuencias de V3 de las que se conoce el tropismo fenotípico, de las que la mayoría pertenecen al subtipo B, y muy pocas a otros subtipos, Seclén *et al.* (2011), Raymond *et al.* (2009), Raymond *et al.* (2011), Prosperi *et al.* (2009).

El VIH-1 se caracteriza por su alta variabilidad genética, la cual se debe fundamentalmente a tres factores: carencia de actividad correctora de errores de la retrotranscriptasa, tiempos cortos de replicación, y recombinación genética, Nájera *et al.* (2002). Mediante estos mecanismos, desde su origen (mediante métodos de reloj molecular se ha datado el ancestro común más reciente del VIH-1 en 1908), el VIH-1 se ha diversificado ampliamente en numerosas formas genéticas, reconociéndose cuatro grupos filogenéticos, M (main), O (outlier), N (non-M/non-O) y P, de los que el M, causante de la pandemia, se divide a su vez en nueve subtipos, A-D, F-H y J, distinguiéndose cuatro subsubtipos en el subtipo A (A1-A4) y dos en el F (F1 y F2). Además, mediante recombinación entre subtipos diferentes se han generado formas recombinantes intersubtipo, clasificadas en formas recombinantes circulantes (CRFs), o en formas recombinantes únicas (URFs). Las formas recombinantes del VIH-1 se detectan cada vez con mayor frecuencia, debido tanto a la propagación epidémica como a la continua generación de recombinantes únicos en zonas donde circulan diferentes variantes.

España tiene la mayor prevalencia de SIDA en Europa occidental, siendo la vía de transmisión predominante la sexual, y la media de edad de 35 años. En los últimos años, la transmisión entre usuarios de drogas inyectables (UDIs) ha descendido, la producida por vía heterosexual se mantiene estable, mientras que la que ocurre entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) ha aumentado considerablemente (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, datos obtenidos para 2010). En España, como en el resto de Europa occidental, el subtipo B es el más frecuente. Sin embargo, en los últimos años se ha detectado un aumento de infecciones por subtipos no B y formas recombinantes, Yebra *et al.* (2011). Ello se debe tanto al aumento de formas genéticas importadas como a la transmisión local de formas genéticas no B y la generación de formas recombinantes nuevas en la población nativa.

El subtipo F ha representado una proporción pequeña de infecciones en España. Sin embargo, se ha detectado un gran incremento en infecciones de este subtipo en Galicia desde 2010. Este incremento y rápida expansión se ha asociado a la aparición de un nuevo cluster monofilético de subsubtipo F1 en Galicia, siendo la mayoría de infectados hombres homosexuales o bisexuales, Thomson *et al.* (2012). Dicho cluster incluye al menos un virus proveniente del País Vasco, y virus muy relacionados han estado circulando por Europa, al menos en Francia y Suiza, algunos años antes del comienzo del brote en Galicia. Fuera de Galicia, el subtipo F circula en África central, Brasil, Rumanía y, con prevalencia muy baja, en Rusia, Holm-Hansen *et al.* (1995), Leitner *et al.* (1996), Fernández García *et al.* (2009b).

El cluster de subtipo F descrito en Galicia es el cluster de subtipo no B transmitido entre HSH más amplio y de más rápida propagación descrito hasta la fecha en Europa, por lo que es importante vigilar su expansión epidémica, conocer sus características biológicas, tales como uso de correceptores, determinantes genéticos potencialmente relacionados con transmisibilidad o patogenicidad y sus relaciones filogenéticas con otros virus, que permitan conocer mejor su origen y su propagación geográfica.

Por tanto, los objetivos que se han planteado en este trabajo se resumen en los siguientes puntos, todos ellos en relación con el cluster de subsubtipo F1 recientemente detectado en Galicia:

- 1) Análisis de genomas completos del cluster F1 con determinación de relaciones filogenéticas con virus de otros países.
- 2) Estudio de predicción genotípica del uso de correceptores, basado en la secuencia del bucle V3 de la envoltura. Análisis de mutaciones características del cluster en el bucle V3.
- 3) Análisis de mutaciones características del cluster F en las diferentes regiones de gp120, y en concreto V2 y C4, en relación a la predicción del uso de correceptores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han incluido 31 pacientes correspondientes al cluster F1 detectado en Galicia, identificados previamente como pertenecientes al mismo en secuencias de proteasa-transcriptasa inversa (PR-TI). Todos los pacientes son varones, y 29 de ellos son españoles. La vía de transmisión predominante corresponde a la vía homosexual (61,3%). La media de edad es de 36 años, y veinticuatro (77,4%) de los 31 pacientes son nuevos diagnósticos, todos ellos diagnosticados desde 2009 en adelante y sólo 1 paciente se encontraba en estadio crónico. La carga viral de los pacientes oscila entre 303 y 10.000.000 copias/ml, y solamente 1 estaba bajo tratamiento antirretroviral en el momento de la recolección de la muestra. Se han incluido además, para el análisis de correceptores y el de aminoácidos característicos, como grupo comparativo de pacientes infectados por subtipo F pero no perteneciente al cluster F1 de Galicia, 73 secuencias obtenidas de la HIV Sequence Database de Los Alamos National Laboratory (Los Alamos, New Mexico, EE.UU.).

Se han procesado un total de 31 muestras de ARN extraído de plasma de pacientes VIH-1 incluidos en el cluster F1 de Galicia, junto con las 2 muestras de Valladolid relacionadas estrechamente con el cluster. De 24 de ellas se ha realizado amplificación y secuenciación de la secuencia de la envoltura y de 9 de la secuencia del genoma casi completo. La secuencia del fragmento de V3 y proteasa-retrotranscriptasa se había obtenido anteriormente en el laboratorio de las muestras restantes.

La extracción de ARN de plasma se ha realizado mediante el kit de Nuclisens (bioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación se han utilizado dos protocolos: uno para amplificar la zona de la envuelta, y otro para amplificar el genoma completo. La retrotranscripción del ARN viral de las muestras a cADN y la PCR se han realizado en un único tubo utilizando una misma mezcla de reacción que incorpora la ADN polimerasa y la retrotranscriptasa. Tras una primera PCR, se ha realizado una segunda, o PCR anidada, utilizando diferentes cebadores internos, que hibridan dentro de la zona amplificada en la primera PCR, amplificando el segmento que se desea secuenciar. Al finalizar la segunda PCR, se ha comprobado la amplificación del fragmento de tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE, al que se ha añadido GelRed (Biotium) para teñir el ADN y visualizarlo con luz ultravioleta.

Para eliminar los restos de la reacción de PCR que puedan interferir en la secuenciación, se ha purificado la muestra por un método enzimático. La secuenciación del producto purificado se ha realizado con el kit *ABI Prism BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), basado en el uso de terminadores de polimerización de gran sensibilidad, consistentes en dideoxinucleótidos marcados cada uno con un fluoróforo distinto, por lo que emiten luz a distinta

longitud de onda al ser excitados con un láser de argón. El resultado del análisis de secuenciación se ha reflejado gráficamente en forma de electroferograma, consistente en picos sucesivos de diferente color, que indica el terminador incorporado, y por tanto el nucleótido, en la posición correspondiente de ADN.

Los electroferogramas obtenidos tienen formato sqd, y pueden abrirse con el programa informático SeqMan. Con las secuencias empalmadas y corregidas mediante SeqMan se ha generado un archivo en formato Fasta. Con la totalidad de las secuencias obtenidas junto con referencias obtenidas de la base de datos de Los Alamos se ha generado un archivo en dicho formato utilizando el programa BioEdit, que se ha enviado al programa MAFFT v.6 para el alineamiento de las mismas.

La construcción de árboles filogenéticos se ha realizado mediante el método de máxima verosimilitud implementado en el programa RAxML, aplicando el modelo evolutivo “general time reversible” con aproximación CAT para heterogeneidad en ritmos de evolución entre las posiciones (GTR + CAT). Se ha analizado, además, la posible existencia de recombinación intersubtipo mediante el programa Simplot 3.5.1 utilizando el método de bootscanning, por el cual el programa determina la relación filogenética de la secuencia de interés con secuencias de referencia de diferentes subtipos en una ventana de tamaño predeterminado que se desplaza progresivamente a lo largo de la secuencia.

En cuanto a la predicción genotípica de utilización de correceptor, los programas más frecuentemente utilizados se basan solamente en la secuencia del bucle V3. Se han utilizado dos programas: PSSM, o Position Specific Scoring Matrices, y Geno2Pheno. Además, se consideraron las reglas simples derivadas de las secuencias de V3, como la relación de aminoácidos cargados positivamente, Fouchier *et al.* (1992), la presencia de aminoácidos básicos en posiciones 11 y 25, Briggs *et al.* (2000), la existencia de inserciones o deleciones y la presencia de determinantes específicos por formas genéticas en relación con tropismo preferencial.

Ninguno de estos dos programas adjudica inequívocamente un determinado tropismo a una secuencia, sino que PSSM muestra un valor cuantitativo de la probabilidad de que el virus del cual ha derivado la secuencia de V3 utilice el correceptor CXCR4, mientras que Geno2Pheno indica un nivel de especificidad que define la fiabilidad de la predicción del uso del correceptor, Lengauer *et al.* (2007).

Para el análisis de las mutaciones características en las regiones V1, V2 y C4 de las secuencias de subtipo F1 del cluster, se ha utilizado el programa Phylo-mLogo, Shih *et al.* (2007), mediante el cual se detecta la frecuencia de nucleótidos o aminoácidos presentes en cada posición de secuencias alineadas. Con tal fin, se han agrupado las secuencias en primer lugar considerando su inclusión o

no inclusión en el cluster F, y en segundo lugar, dentro de cada uno de estos dos grupos fundamentales, el uso de correceptores CCR5 o CXCR4.

Para determinar la significación estadística de las diferencias entre las frecuencias de aminoácidos en una determinada posición entre dos grupos de secuencias, se ha utilizado el test exacto de Chi-cuadrado con corrección de Yates, requiriéndose un valor de $p < 0,05$ para establecer que la diferencia es estadísticamente significativa.

RESULTADOS

En análisis mediante bootscanning utilizando el programa Simplot, todas las secuencias del cluster F de Galicia eran uniformemente de subsubtipo F1, excepto un virus de Valladolid, que era recombinante BF1, siendo la mayor parte del genoma F1, excepto un pequeño segmento de subtipo B en la región codificante de nef. Dicho virus se excluyó de los árboles filogenéticos de genoma completo y de los aquellos segmentos que contienen el punto de recombinación.

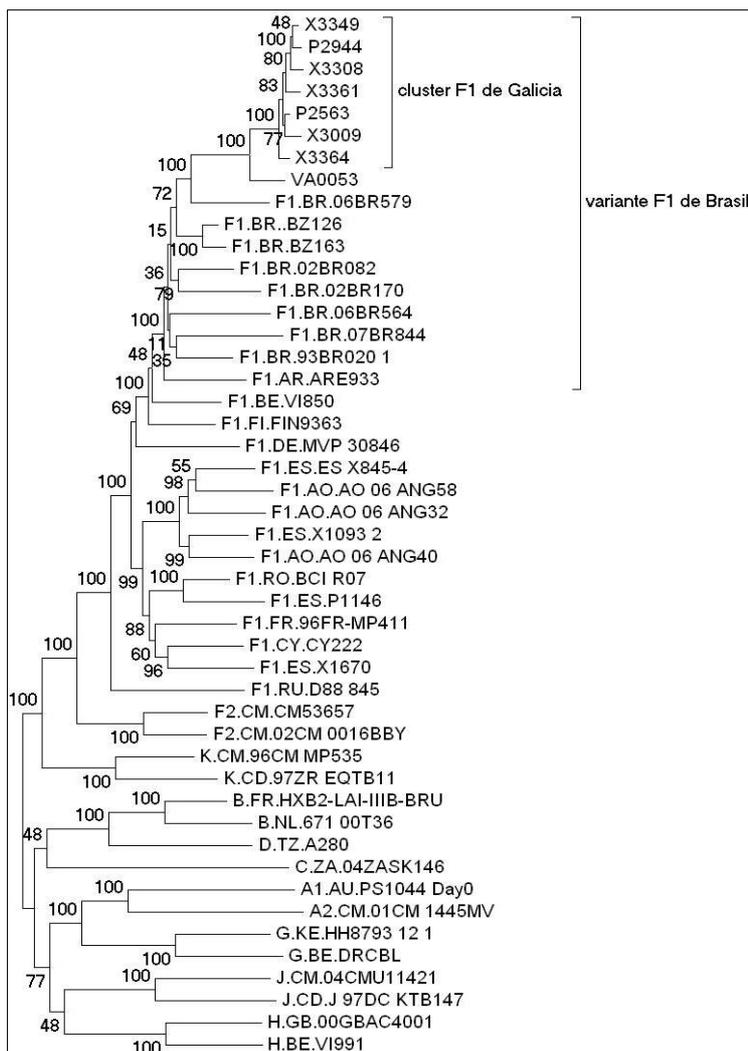


Figura. 1. Árboles filogenéticos de secuencias completas del genoma. Se incluyen secuencias del cluster F obtenidas en nuestro laboratorio más las seleccionadas tras búsquedas de similitudes en la base de datos de Los Alamos, más referencias de subtipos. El cluster de Galicia y el de Brasil se señalan mediante corchetes. La letra inicial del nombre de los virus secuenciados indica su procedencia: X, Galicia; P, País Vasco; VA, Valladolid. En las secuencias de la base de datos de Los Álamos se indica, tras el subtipo, el país de recolección de la muestra mediante el código de dos letras ISO. Los códigos de los países de procedencia de los virus de subsubtipo F1 son: BR: Brasil AR: Argentina. BE: Bélgica. ES: España. AO: Angola. RO: Rumanía. FR: Francia. RU: Rusia.

Se han construido distintos árboles filogenéticos con el fin de analizar las relaciones filogenéticas entre los virus del cluster y virus cuyas secuencias están depositadas en bases de datos públicas. Previamente a la construcción de los árboles, se ha realizado una búsqueda de similitudes de secuencias utilizando el algoritmo BLAST implementado en el programa BioEdit. Para ello, se han descargado todas las secuencias parciales de subsubtipo F1 de Los Alamos y se han analizado similitudes con las secuencias de genomas completos de subsubtipo F1 obtenidos en este estudio más las no pertenecientes al cluster F de Galicia, que se han descargado previamente de la base de datos de Los Alamos. De las secuencias parciales analizadas de esta manera, solamente se han utilizado en la construcción de los árboles filogenéticos aquellas que presentaban mayor similitud con al menos dos secuencias del cluster F de Galicia. También se han incluido secuencias de referencia de subtipo F de diferentes países así como de otros subtipos.

Se han elaborado, por una parte, árboles filogenéticos de los genomas completos de los virus del cluster F (**figura 1**) y, por otra, de distintas regiones del genoma de VIH (**figura 2**, fragmento V3; **figura 3**, fragmento PR-RT), incorporando secuencias de la base de datos de Los Alamos que presentaban alta similitud con los virus del cluster (mediante búsquedas realizadas con el algoritmo BLAST).

Los 8 genomas completos de subtipo F obtenidos forman un cluster apoyado por un valor de bootstrap del 100% en el que uno de los virus, procedente de Valladolid, ramifica en posición basal con respecto a los otros 7 virus. El cluster formado por los genomas secuenciados está comprendido dentro de uno mayor, correspondiente a la variante de subsubtipo F1 de Brasil. En cuanto al árbol filogenético formado por secuencias del segmento gag, se aprecia que las secuencias procedentes de Galicia y del País Vasco y una de Valladolid agrupan en un cluster, el cual está estrechamente relacionado con dos virus de subtipo F procedentes de Gran Bretaña, y con dos procedentes de Valladolid, que ramifican basalmente con respecto al cluster de Galicia. La estrecha relación filogenética de este cluster con virus de diversos países de Europa occidental también se observa en los árboles de nef, la región V3 de la envoltura y PR-TI, en los que se observan 4 virus de Suiza, 3 de Francia y 2 de Bélgica que agrupan con el cluster de Galicia en situación basal con respecto al mismo. En el árbol de PR-TI también se observa un virus de Brasil (BRGO3010) que agrupa dentro del cluster europeo de subtipo F. Los años de extracción de las muestras de los virus europeos relacionados con el cluster F de Galicia van desde 2005 hasta 2007 en la mayoría de ellos, es decir, varios años antes de los primeros casos del cluster detectados en Galicia en 2009, y su vía de transmisión ha sido descrita en 5 de ellos, todos ellos varones, siendo la de cuatro de ellos, dos de Suiza y los dos de Bélgica, por contacto homosexual y el tercero de Suiza por contacto heterosexual.

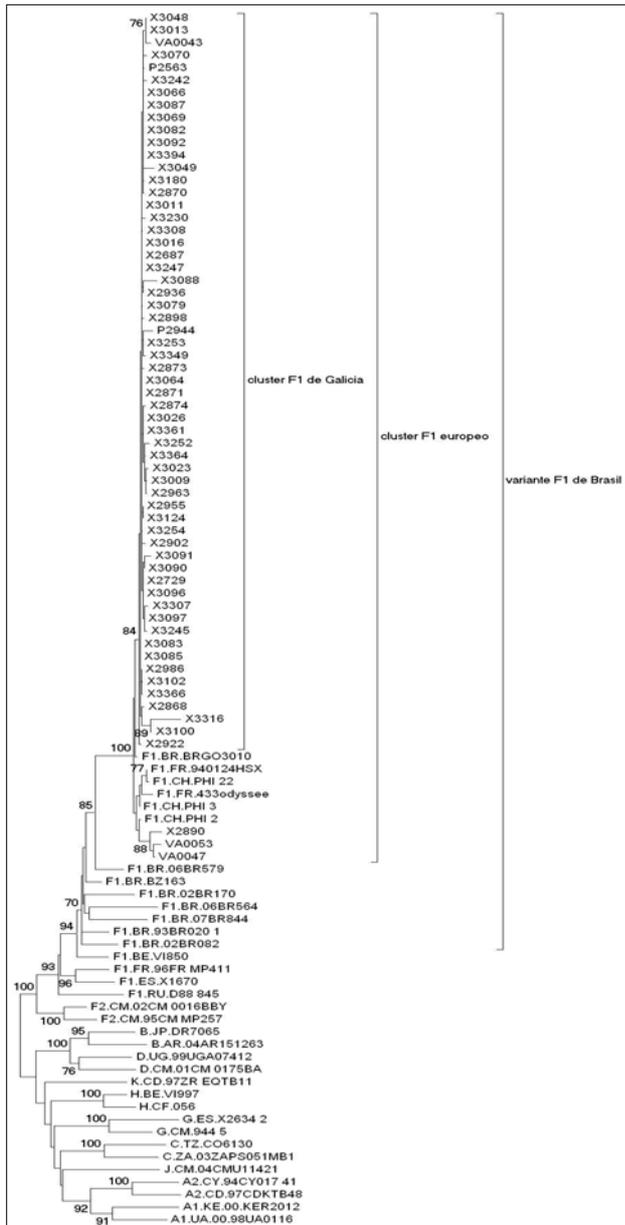


Figura 2. Árbol filogenético del fragmento V3.

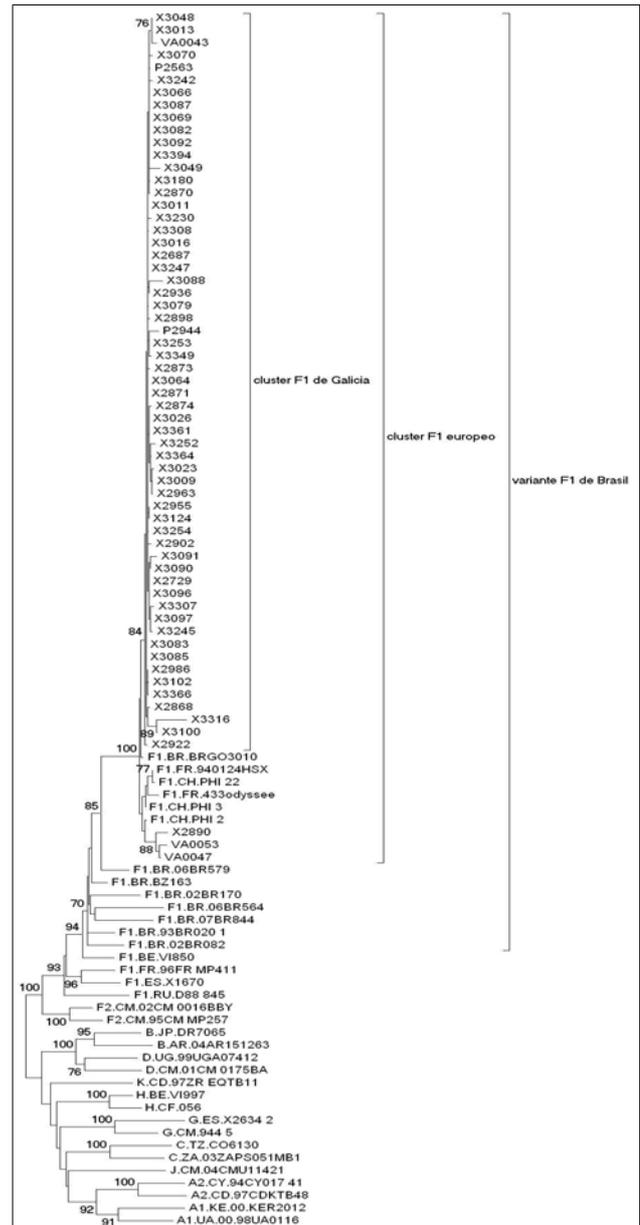


Figura 3. Árbol filogenético del fragmento PR-RT. Se incluyen toda las secuencias de PR-RT del cluster F de Galicia y relacionadas con el mismo previamente obtenidas en el laboratorio.

En cuanto al estudio de predicción genotípica del uso de correceptores, al comparar la frecuencia de secuencias con predicción de tropismo R5 y X4 por ambos métodos (Geno2Pheno y WebPSSM), se observa que 19 (65,5%) de las 29 secuencias del cluster F1 tienen tropismo R5, frente a 63 (86,3%) de las 73 secuencias no pertenecientes al cluster. Por otro lado, se detectó tropismo X4 en 7 (24,1%) de las secuencias del cluster F1, todas correspondientes a pacientes de nuevo diagnóstico e incluyendo 2 infecciones recientes, y en 6 (8,2%) de las secuencias F1 no pertenecientes al cluster. En 3 pacientes de nuevo diagnóstico infectados por subtipo F1 del cluster se obtuvieron resultados discrepantes entre estos programas. Las tres secuencias resultaron X4 por el programa Geno2pheno.

Por otra parte, se detectaron también 5 (6,8%) secuencias discrepantes entre las no pertenecientes al cluster, todas X4 por Geno2pheno.

Se realizó una valoración de cuál era la concordancia entre el tropismo definido por las herramientas bioinformáticas y los resultados de las reglas simples. Para ello, se consideró la presencia de aminoácidos básicos arginina (R) o lisina (K) en posición 11 y/o 25 de la secuencia de V3 y una carga neta igual o superior a +5 en asociación con tropismo X4. Por el contrario, la presencia de aminoácidos ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) en posiciones 11 y/o 25 y una carga neta igual o inferior a +4 se consideraron resultados asociados a tropismo R5. Esta valoración se realizó de nuevo de forma comparativa entre secuencias de subtipo F1 del cluster y subtipo F1 no incluidas en el cluster. Se observa que las 7 secuencias con tropismo X4 del cluster presentan todas un aminoácido R o K en posición 11, frente a solamente 1 de las 6 secuencias X4 no pertenecientes al cluster siendo la proporción total de estas secuencias X4 superior entre los pacientes del cluster (17,2%) que entre los no incluidos en el cluster (1,4%), diferencia que resultó estadísticamente muy significativa ($p=0,0006$). Por el contrario, no se detectaron aminoácidos R o K en posición 25 en ninguna de las secuencias X4 del cluster, frente a 5 de las secuencias no cluster. La carga neta $\geq +5$ se observó en todas las secuencias X4 del cluster y solamente en 4 secuencias X4 no cluster.

Con el fin de comparar la frecuencia de aminoácidos en diferentes posiciones de V3 mediante el programa bioinformático Phylo-mLogo (**figura 4**), se han agrupado las distintas secuencias de subsubtipo F1 incluidas en el cluster y no incluidas, en base a tropismo R5 o X4. En base a ello, se han encontrado las mutaciones 2S/G, 13P/T, 14M, 18K, 19V, 22T, siendo las mutaciones 13P y 22T detectadas solamente en cepas R5, y las mutaciones 13T y 19V sólo en X4. El resto de mutaciones se detectaron tanto en R5 como en X4.

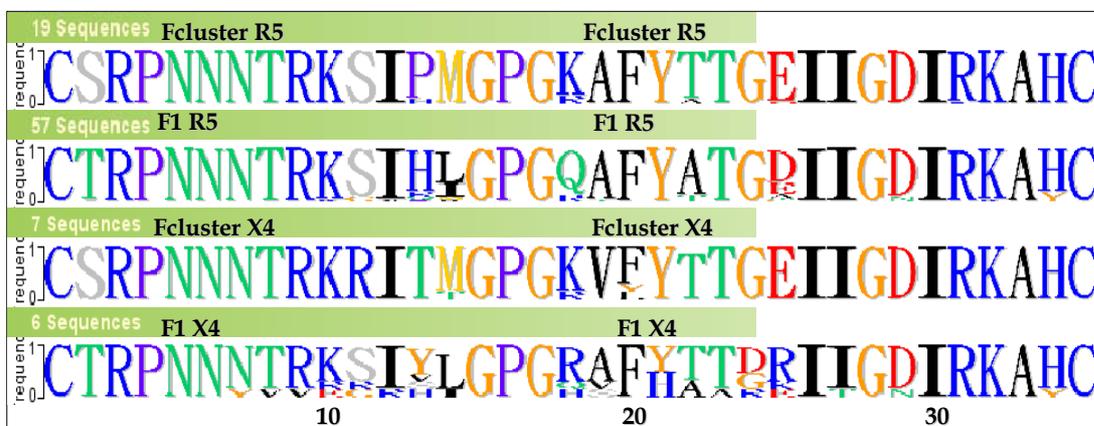


Figura 4. Secuencia de aa en V3 de cluster F1 y grupo F1 no cluster por el programa Phylo-mLogo.

Además de la secuencia de V3, se han descrito otras regiones de gp120 asociadas a tropismo R5 o X4, de las cuales se ha realizado el mismo análisis que para V3 para comparar la frecuencia de aminoácidos en diferentes posiciones (**figura 5**, región V2). En todas las diferentes regiones, tanto en gp120 como en gp41, se encuentran mutaciones características del cluster F de Galicia. Sin embargo, ninguna de ellas se encuentra asociada a tropismo según lo descrito para subtipo B.

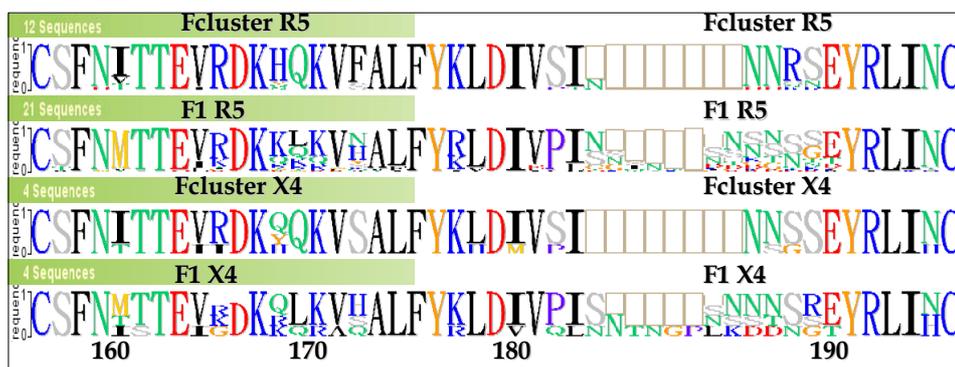


Figura 5. Secuencia de V2 (arriba) y de C4 (abajo). Numeración de HXB2.

DISCUSIÓN

El análisis filogenético de secuencias es la herramienta molecular más fiable y la que más información proporciona acerca de patrones globales y regionales de propagación de la infección por VIH-1. Para estos estudios, las regiones del genoma viral que se utilizan actualmente son gag, pol y env, siendo pol la utilizada con más frecuencia debido a su utilidad para detectar mutaciones asociadas a resistencias a fármacos antirretrovirales, Thomson y Nájera (2005). Estos estudios han permitido detectar la propagación de nuevas formas genéticas del VIH-1 en diferentes partes del mundo, cambiando la epidemiología molecular de la infección, Thomson y Nájera (2005).

Los análisis filogenéticos de secuencias pertenecientes al cluster de subsubtipo F1 que se ha expandido recientemente en Galicia, Thomson *et al.* (2012), estaban basados en 38 secuencias parciales de pol, obtenidas hasta abril de 2011. En el presente estudio, se han añadido 22 secuencias adicionales de PR-TI obtenidas desde mayo de 2011 hasta abril de 2012. De estas 60 secuencias, 55 proceden de Galicia, dos de Bilbao y tres de Valladolid. Todas las secuencias son uniformemente de subtipo F excepto una perteneciente a Valladolid, que se ha detectado que es recombinante BF. Este recombinante pudo haberse generado en el mismo individuo tras una infección doble con virus de subtipos B y F, no pudiéndose descartar que se hubiera infectado por el virus recombinante, generado en la cadena de transmisión previa.

En árboles filogenéticos de segmentos parciales, el virus de Valladolid VA0043 ramifica dentro del cluster F de Galicia, lo cual indica la propagación de dicho cluster en esta ciudad. También se observa que el cluster de Galicia agrupa con los virus de la variante de subsubtipo F1 de Brasil y

que hay 12 virus de muestras recogidas fuera de España estrechamente relacionados con los del cluster F de Galicia, de los cuales 4 eran de Suiza, 3 de Francia, 1 de Brasil, 2 de Bélgica y 2 de Gran Bretaña. Todos estos virus agrupan con el cluster de Galicia con altos valores de bootstrap, ramificando en posición basal con respecto al mismo. Dos virus de Valladolid y uno de Orense también ramifican en posición basal con respecto al cluster de Galicia. La identificación de virus de varios países europeos estrechamente relacionados con el cluster F de Galicia, que ramifican en posición basal al mismo y la mayoría recolectados varios años antes de la expansión del cluster gallego, Thomson *et al.* (2012) indica que dicho cluster procede de una variante que se expandió previamente por varios países de Europa occidental. Por otra parte, el hecho de que los 7 virus relacionados con el cluster F de Galicia de los que hay datos epidemiológicos todos proceden de varones infectados por vía sexual y 6 son HSH (los dos de Valladolid, dos de Suiza y los dos de Bélgica) sugiere que la variante europea a partir de la cual se originó el cluster de Galicia también se transmite por contacto homosexual.

El hecho de que el cluster de Galicia y los virus europeos relacionados con el mismo agrupen con otros virus de Brasil y que el subtipo F haya estado circulando en Brasil muchos años antes que en Europa occidental indica que la hipótesis más plausible es que el virus brasileño estrechamente relacionado con el cluster de Galicia (BRG03010, procedente de Goiania, en la región occidental central de Brasil) representa la variante brasileña que dio origen a la variante europea de la que procede el cluster de Galicia.

El origen último del subtipo F se encuentra en África central, donde se originaron todos los subtipos de VIH-1, excepto probablemente el B. Desde aquí se ha expandido no sólo a Brasil, y desde aquí a Europa occidental, sino también a Rumanía y, de forma mucho más limitada, a Rusia.

En cuanto a predicción genotípica del uso de correceptores, se ha descrito que las cepas R5 son las que se transmiten mayoritariamente, y las cepas X4 en sólo un 6-17% de los casos, Raymond *et al.* (2010). No obstante, se han detectado virus con tropismo X4 en 7 (24,1%) de las secuencias del cluster, todas correspondientes a pacientes de nuevo diagnóstico, incluyendo 2 infecciones recientes y presentando 3 de estos pacientes una cifra de linfocitos T CD4+ inferior a 200 cél/ml. En cuanto a cantidad de células T Cd4+, la media en pacientes con cepas R5 del cluster fue de 796 cél/ml, mientras que la media para pacientes con cepas X4 fue de 240 cél/ml, lo que es clínicamente relevante, ya que la infección por cepas con tropismo X4 y la cifra inicialmente menos a 200 cél/ml se puede asociar a una rápida y severa progresión a SIDA, Raymond *et al.* (2010).

Las bases de datos de los programas utilizados para predicción genotípica de uso de correceptores tienen una escasez de secuencias de formas genéticas no-B de las que se conozca su tropismo fenotípico, por lo que es fundamental considerar si los programas bioinformáticos actuales

están preparados para definir con certeza el tropismo. Por otra parte, se ha descrito, para el subtipo F, una falta de correlación entre el uso de CXCR4 y la regla 11/25, pero presentando una asociación con la carga neta, Holm-Hansen *et al.* (2000). En este sentido, hay que destacar que todas las secuencias con tropismo X4 del cluster F presentan un aminoácido con carga positiva en posición 11, y una carga neta $\geq +5$, siendo la proporción total superior entre los pacientes del cluster que entre los no incluidos en el cluster. Sin embargo, en 3 pacientes de nuevo diagnóstico infectados por subtipo F1 del cluster se obtuvieron resultados discrepantes entre las herramientas bioinformáticas utilizadas, por lo que en estos casos es necesario caracterizar el tropismo mediante un método fenotípico validado, ya que la definición de tropismo R5 es imprescindible para la instauración de tratamiento con antagonistas de CCR5.

Aparte de V3, se ha descrito la asociación entre determinadas mutaciones en la secuencia de V1, V2, V4 y V5, así como en las regiones C4 y gp41 en asociación con el tropismo R5 y X4, Hoffman *et al.* (2002), Huang *et al.* (2008), Dimonte *et al.* (2011). En este trabajo se observa una menor longitud media de las secuencias del cluster F respecto a las F no incluidas en el cluster, aunque no parece tener relación con uso de correceptor, puesto que no se han apreciado diferencias entre cepas R5 y X4. Por otra parte, se ha realizado un análisis sobre las diferentes mutaciones detectadas en las distintas regiones de gp120. Así, se han descrito posiciones características del cluster F en la secuencia V3: 2S/G, 13P/T, 14M, 18K, 19V, 22T, siendo las mutaciones 13T y 19V propias de cepas X4, y la mutación 13H propia de las cepas R5. Respecto a otras zonas de gp120, se han detectado mutaciones características del cluster con una diferencia estadísticamente muy significativa respecto a otras secuencias no cluster. Sin embargo, no se observaron cambios asociados a tropismo según lo descrito para subtipo B, Huang *et al.* (2008).

La existencia de mutaciones características que no se encuentran habitualmente en otras secuencias F, y algunas incluso asociadas a tropismo, indica posibles diferencias biológicas que pueden repercutir en la dinámica de transmisión de estas variantes virales y en patogenicidad. Este tipo de estudios son fundamentales, además, para la investigación de nuevos medicamentos y de nuevas vacunas.

CONCLUSIONES

Los análisis de los 9 genomas completos del cluster de VIH-1 de subtipo F recientemente identificado en Galicia, transmitido entre hombres homosexuales, han permitido determinar que 8 son uniformemente de subsubtipo F1 a lo largo del genoma, habiéndose detectado recombinación entre subsubtipo F1 y subtipo B en un virus.

Los análisis filogenéticos han permitido establecer que dicho cluster tiene su origen en una variante de extensa propagación geográfica en diversos países de Europa occidental, donde ha estado circulando al menos desde el año 2005. Esta variante europea procede de una variante que circula en Goiania, en la región central occidental de Brasil.

El área de dispersión geográfica del cluster se ha expandido más allá de Galicia, puesto que se han identificado varios virus pertenecientes a dicho cluster en Valladolid y en País Vasco.

La proporción de secuencias del cluster con tropismo X4 en pacientes de nuevo diagnóstico es significativamente más alta en comparación con las encontradas en el conjunto global de infecciones, además de haber presentado varios de estos pacientes una cifra de linfocitos T CD4+ inferior a 200 células/ml. Todo ello puede asociarse con una rápida y severa progresión a SIDA en estos pacientes.

Este cluster recientemente identificado presenta mutaciones características a lo largo de la región gp120 del genoma, y algunas de ellas están relacionadas con el tropismo, lo que puede tener sus repercusiones en la investigación de nuevos medicamentos y de nuevas vacunas. Es importante caracterizar correctamente el tropismo, ya que la definición de éste es imprescindible para la instauración de tratamiento con antagonistas de CCR5.

Todas las secuencias del cluster F1 con tropismo X4 presentan un aminoácido con carga positiva (arginina) en posición 11 y una carga neta $\geq +5$. Sin embargo, se demuestra también la existencia de casos de predicción de tropismo con resultados discrepantes entre las herramientas bioinformáticas utilizadas, por lo que los métodos genotípicos, en estos casos, deben ser caracterizados por un método fenotípico validado.

La mayoría de los tratamientos en los países occidentales tienen en cuenta que la forma B es la predominante en su población. Sin embargo, el número de infecciones por formas recombinantes y por subtipos no-B está adquiriendo cada vez mayor importancia en los países citados. Por ello, los estudios de epidemiología molecular son importantes para detectar formas recombinantes y únicas, que ayudarán a conocer mejor su dinámica de propagación, sus patrones de dispersión geográfica, sus vías de transmisión y sus relaciones filogenéticas con virus de otros países.

En el caso del cluster F1 de Galicia, la información obtenida de la epidemiología molecular es de evidente relevancia para la salud pública, ya que indica la transmisión activa del VIH-1 en la población homosexual a través de conductas sexuales promiscuas y de alto riesgo, por lo que se debe incrementar el esfuerzo destinado a informar debidamente sobre los riesgos que suponen dichas prácticas sexuales y sobre los métodos de prevención de la transmisión por VIH-1 en las relaciones sexuales, particularmente entre HSH.

Estos análisis deben ser completados, a medida que se vayan obteniendo mayor número de secuencias, con otro tipo de estudios enfocados a la descripción del tropismo viral y de mutaciones propias del cluster. Algunas de ellas podrían explicar posibles resistencias a antirretrovirales, o estar relacionadas con características de patogenicidad y transmisibilidad, para lo cual también sería importante estudiar las correlaciones de la variante nuevamente descrita con susceptibilidad a respuestas inmunes potencialmente protectoras frente a la infección.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se ha llevado a cabo en el departamento de Patología Molecular, Biología y Variabilidad del VIH del Centro Nacional de Microbiología, del Instituto de Salud Carlos III, bajo la supervisión de la Dra. Lucía Pérez Álvarez y del Dr. Miguel Thomson Okatsu.

Quiero expresar mi agradecimiento al personal técnico, compuesto por Milagros Pinilla, Cristina Carrera y Vanesa Montero, la inestimable ayuda de Elena Delgado y Yolanda Vega.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcami, J. & Coiras, M. 2011, "Immunopathogenesis of HIV infection", *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, vol. 29, no. 3, pp. 216-226.
- Berger, E.A. 1998, "HIV entry and tropism. When one receptor is not enough", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 452, pp. 151-157.
- Briggs, D.R., Tuttle, D.L., Sleasman, J.W. & Goodenow, M.M. 2000, "Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages)", *AIDS (London, England)*, vol. 14, no. 18, pp. 2937-2939.
- Cornelissen, M., Hogervorst, E., Zorgdrager, F., Hartman, S. & Goudsmit, J. 1995, "Maintenance of syncytium-inducing phenotype of HIV type 1 is associated with positively charged residues in the HIV type 1 gp120 V2 domain without fixed positions, elongation, or relocated N-linked glycosylation sites", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 11, no. 10, pp. 1169-1175.
- Cuevas, M.T., Fernandez-Garcia, A., Pinilla, M., Garcia-Alvarez, V., Thomson, M., Delgado, E., Gonzalez-Galeano, M., Miralles, C., Serrano-Bengoechea, E., Ojea de Castro, R., Lopez-Alvarez, M.J., Lezaun, M.J., Sanchez-Garcia, A.M., Sanchez-Martinez, M., Munoz-Nieto, M. & Perez-Alvarez, L. 2010, "Short communication: Biological and genetic characterization of HIV type 1 subtype B and nonsubtype B transmitted viruses: usefulness for vaccine candidate assessment", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 26, no. 9, pp. 1019-1025.
- De Jong, J.J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M. & Goudsmit, J. 1992, "Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution", *Journal of Virology*, vol. 66, no. 11, pp. 6777-6780.

- Delgado, E., Thomson, M.M., Villahermosa, M.L., Sierra, M., Ocampo, A., Miralles, C., Rodriguez-Perez, R., Diz-Aren, J., Ojea-de Castro, R., Losada, E., Cuevas, M.T., Vazquez-de Parga, E., Carmona, R., Perez-Alvarez, L., Medrano, L., Cuevas, L., Taboada, J.A. & Najera, R. 2002, "Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure", *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, vol. 29, no. 5, pp. 536-543.
- Delgado, E., Rios, M., Fernandez, J., Perez-Alvarez, L., Najera, R. & Thomson, M.M. 2010, "Identification of a new HIV type 1 BF intersubtype circulating recombinant form (CRF44_BF) in Chile", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 26, no. 7, pp. 821-826.
- Delgado, E., Fernandez-Garcia, A., Vega, Y., Cuevas, T., Pinilla, M., Garcia, V., Sanchez, M., Gonzalez, M., Sanchez, A.M., Thomson, M.M. & Perez-Alvarez, L. 2012, "Evaluation of genotypic tropism prediction tests compared with in vitro co-receptor usage in HIV-1 primary isolates of diverse subtypes", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 67, no. 1, pp. 25-31.
- Dimonte, S., Mercurio, F., Svicher, V., D'Arrigo, R., Perno, C.F. & Ceccherini-Silberstein, F. 2011, "Selected amino acid mutations in HIV-1 B subtype gp41 are associated with specific gp120v signatures in the regulation of co-receptor usage", *Retrovirology*, vol. 8, pp. 33.
- Fernandez-Garcia, A., Cuevas, M.T., Munoz-Nieto, M., Ocampo, A., Pinilla, M., Garcia, V., Serrano-Bengoechea, E., Lezaun, M.J., Delgado, E., Thomson, M., Gonzalez-Galeano, M., Contreras, G., Najera, R. & Perez-Alvarez, L. 2009, "Development of a panel of well-characterized human immunodeficiency virus type 1 isolates from newly diagnosed patients including acute and recent infections", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 25, no. 1, pp. 93-102.
- Fernandez-Garcia, A., Cuevas, M.T., Vinogradova, A., Rakhmanova, A., Perez-Alvarez, L., de Castro, R.O., Osmanov, S. & Thomson, M.M. 2009, "Near full-length genome characterization of a newly identified HIV type 1 subtype F variant circulating in St. Petersburg, Russia", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 25, no. 11, pp. 1187-1191.
- Fernandez-Garcia, A., Perez-Alvarez, L., Cuevas, M.T., Delgado, E., Munoz-Nieto, M., Cilla, G., Iribarren, J.A., Pinilla, M., Ocampo, A., Miralles, C., Perez-Castro, S., Gonzalez-Galeano, M., de Castro, R.O., Trigo, M., Garcia, V., Sanchez, A.M. & Thomson, M.M. 2010, "Identification of a new HIV type 1 circulating BF intersubtype recombinant form (CRF47_BF) in Spain", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 26, no. 7, pp. 827-832.
- Fouchier, R.A., Groenink, M., Kootstra, N.A., Tersmette, M., Huisman, H.G., Miedema, F. & Schuitemaker, H. 1992, "Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule", *Journal of virology*, vol. 66, no. 5, pp. 3183-3187.
- Groenink, M., Fouchier, R.A., Broersen, S., Baker, C.H., Koot, M., van't Wout, A.B., Huisman, H.G., Miedema, F., Tersmette, M. & Schuitemaker, H. 1993, "Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 260, no. 5113, pp. 1513-1516.

- Guimaraes, M.L., Vicente, A.C., Otsuki, K., da Silva, R.F., Francisco, M., da Silva, F.G., Serrano, D., Morgado, M.G. & Bello, G. 2009, "Close phylogenetic relationship between Angolan and Romanian HIV-1 subtype F1 isolates", *Retrovirology*, vol. 6, pp. 39.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S. & WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation 2011, "Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007", *AIDS (London, England)*, vol. 25, no. 5, pp. 679-689.
- Hoffman, N.G., Seillier-Moiseiwitsch, F., Ahn, J., Walker, J.M. & Swanstrom, R. 2002, "Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop", *Journal of virology*, vol. 76, no. 8, pp. 3852-3864.
- Holm-Hansen, C., Grothues, D., Rustad, S., Rosok, B., Pascu, F.R. & Asjo, B. 1995, "Characterization of HIV type 1 from Romanian children: lack of correlation between V3 loop amino acid sequence and syncytium formation in MT-2 cells", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 11, no. 5, pp. 597-603.
- Holm-Hansen, C., Baan, E., Asjo, B., Pascu, F.R., Goudsmit, J. & De Jong, J.J. 2000, "Determinants for the syncytium-inducing phenotype of HIV-1 subtype F isolates are located in the V3 region", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 16, no. 9, pp. 867-870.
- Huang, W., Toma, J., Fransen, S., Stawiski, E., Reeves, J.D., Whitcomb, J.M., Parkin, N. & Petropoulos, C.J. 2008, "Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein", *Journal of virology*, vol. 82, no. 11, pp. 5584-5593.
- Leitner, T., Korovina, G., Marquina, S., Smolskaya, T. & Albert, J. 1996, "Molecular epidemiology and MT-2 cell tropism of Russian HIV type 1 variant", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 12, no. 17, pp. 1595-1603.
- Lengauer, T., Sander, O., Sierra, S., Thielen, A. & Kaiser, R. 2007, "Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage", *Nature biotechnology*, vol. 25, no. 12, pp. 1407-1410.
- Monno, L., Saracino, A., Scudeller, L., Punzi, G., Brindicci, G., Altamura, M., Lagioia, A., Ladisa, N. & Angarano, G. 2011, "Impact of mutations outside the V3 region on coreceptor tropism phenotypically assessed in patients infected with HIV-1 subtype B", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 11, pp. 5078-5084.
- Najera, R., Delgado, E., Perez-Alvarez, L. & Thomson, M.M. 2002, "Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic", *AIDS (London, England)*, vol. 16 Suppl 4, pp. S3-16.
- Perez-Alvarez, L., Munoz, M., Delgado, E., Miralles, C., Ocampo, A., Garcia, V., Thomson, M., Contreras, G., Najera, R. & Spanish Group for Antiretroviral Resistance Studies in Galicia 2006, "Isolation and biological characterization of HIV-1 BG intersubtype recombinants and other genetic forms circulating in Galicia, Spain", *Journal of medical virology*, vol. 78, no. 12, pp. 1520-1528.
- Perez-Olmeda, M. & Poveda, E. 2008, "Methods for determining viral tropism: genotype and phenotype tests", *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, vol. 26 Suppl 11, pp. 40-48.

- Prosperi, M.C., Fanti, I., Ulivi, G., Micarelli, A., De Luca, A. & Zazzi, M. 2009, "Robust supervised and unsupervised statistical learning for HIV type 1 coreceptor usage analysis", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 25, no. 3, pp. 305-314.
- Raymond, S., Delobel, P., Mavigner, M., Cazabat, M., Souyris, C., Encinas, S., Sandres-Saune, K., Pasquier, C., Marchou, B., Massip, P. & Izopet, J. 2009, "Genotypic prediction of human immunodeficiency virus type 1 CRF02-AG tropism", *Journal of clinical microbiology*, vol. 47, no. 7, pp. 2292-2294.
- Raymond, S., Delobel, P., Mavigner, M., Cazabat, M., Encinas, S., Souyris, C., Bruel, P., Sandres-Saune, K., Marchou, B., Massip, P. & Izopet, J. 2010, "CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression", *AIDS (London, England)*, vol. 24, no. 15, pp. 2305-2312.
- Raymond, S., Recordon-Pinson, P., Saliou, A., Delobel, P., Nicot, F., Descamps, D., Marcelin, A.G., Flandre, P., Calvez, V., Masquelier, B., Izopet, J. & ANRS AC11 Resistance Study Group 2011, "Improved V3 genotyping with duplicate PCR amplification for determining HIV-1 tropism", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 66, no. 9, pp. 1972-1975.
- Revilla, A., Delgado, E., Christian, E.C., Dalrymple, J., Vega, Y., Carrera, C., Gonzalez-Galeano, M., Ocampo, A., de Castro, R.O., Lezaun, M.J., Rodriguez, R., Marino, A., Ordonez, P., Cilla, G., Cisterna, R., Santamaria, J.M., Prieto, S., Rakhmanova, A., Vinogradova, A., Rios, M., Perez-Alvarez, L., Najera, R., Montefiori, D.C., Seaman, M.S. & Thomson, M.M. 2011, "Construction and phenotypic characterization of HIV type 1 functional envelope clones of subtypes G and F", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 27, no. 8, pp. 889-901.
- Seclen, E., Soriano, V., del Mar Gonzalez, M., Gonzalez-Lahoz, J. & Poveda, E. 2011, "Short communication: severe immune suppression in patients infected with R5-tropic HIV-1 strains is associated with increased gp120 net charge at variable regions", *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 27, no. 9, pp. 965-967.
- Shih, A.C., Lee, D.T., Peng, C.L. & Wu, Y.W. 2007, "Phylo-mLogo: an interactive and hierarchical multiple-logo visualization tool for alignment of many sequences", *BMC bioinformatics*, vol. 8, pp. 63.
- Sierra, M., Thomson, M.M., Rios, M., Casado, G., Castro, R.O., Delgado, E., Echevarria, G., Munoz, M., Colomina, J., Carmona, R., Vega, Y., Parga, E.V., Medrano, L., Perez-Alvarez, L., Contreras, G. & Najera, R. 2005, "The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF12_BF", *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, vol. 5, no. 3, pp. 209-217.
- Taylor, B.S. & Hammer, S.M. 2008, "The challenge of HIV-1 subtype diversity", *The New England journal of medicine*, vol. 359, no. 18, pp. 1965-1966.
- Thomson, M.M. & Najera, R. 2001, "Travel and the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtype genetic forms into Western countries", *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 32, no. 12, pp. 1732-1737.

- Thomson, M.M., Delgado, E., Manjon, N., Ocampo, A., Villahermosa, M.L., Marino, A., Herrero, I., Cuevas, M.T., Vazquez-de Parga, E., Perez-Alvarez, L., Medrano, L., Taboada, J.A., Najera, R. & Spanish Group for Antiretroviral Studies in Galicia 2001, "HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users", *AIDS (London, England)*, vol. 15, no. 4, pp. 509-516.
- Thomson, M.M., Perez-Alvarez, L. & Najera, R. 2002, "Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy", *The Lancet infectious diseases*, vol. 2, no. 8, pp. 461-471.
- Thomson, M.M. & Najera, R. 2005, "Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update", *AIDS reviews*, vol. 7, no. 4, pp. 210-224.
- Thomson, M.M., Fernandez-Garcia, A., Delgado, E., Vega, Y., Diez-Fuertes, F., Sanchez-Martinez, M., Pinilla, M., Castro, M.A., Marino, A., Ordonez, P., Ocampo, A., da Silva, A.R., Perez-Castro, S., Lopez-Alvarez, M.J., Trigo, M. & Perez-Alvarez, L. 2012, "Rapid expansion of a HIV-1 subtype F cluster of recent origin among men who have sex with men in Galicia, Spain", *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, vol. 59, no. 3, pp. e49-51.
- Tscherning, C., Alaeus, A., Fredriksson, R., Bjorndal, A., Deng, H., Littman, D.R., Fenyo, E.M. & Albert, J. 1998, "Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1", *Virology*, vol. 241, no. 2, pp. 181-188.
- Tscherning-Casper, C., Vodros, D., Menu, E., Aperia, K., Fredriksson, R., Dolcini, G., Chaouat, G., Barre-Sinoussi, F., Albert, J. & Fenyo, E.M. 2000, "Coreceptor usage of HIV-1 isolates representing different genetic subtypes obtained from pregnant Cameroonian women. European Network for In Utero Transmission of HIV-1", *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, vol. 24, no. 1, pp. 1-9.
- Vandekerckhove, L.P., Wensing, A.M., Kaiser, R., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., De Luca, A., Dressler, S., Garcia, F., Geretti, A.M., Klimkait, T., Korn, K., Masquelier, B., Perno, C.F., Schapiro, J.M., Soriano, V., Sonnerborg, A., Vandamme, A.M., Verhofstede, C., Walter, H., Zazzi, M., Boucher, C.A. & European Consensus Group on clinical management of tropism testing 2011, "European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing", *The Lancet infectious diseases*, vol. 11, no. 5, pp. 394-407.
- Yebra, G., de Mulder, M., Martin, L., Rodriguez, C., Labarga, P., Viciano, I., Berenguer, J., Aleman, M.R., Pineda, J.A., Garcia, F., Holguin, A. & Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS) 2012, "Most HIV type 1 non-B infections in the Spanish cohort of antiretroviral treatment-naive HIV-infected patients (CoRIS) are due to recombinant viruses", *Journal of clinical microbiology*, vol. 50, no. 2, pp. 407-413.