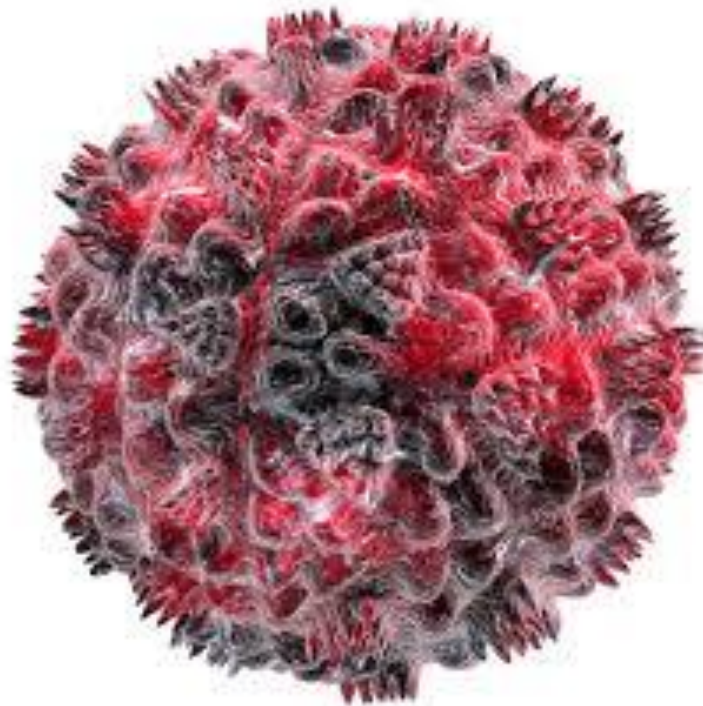


Diagnóstico y caracterización del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2 circulante en Uruguay (Periodo 2012-2017)

Natalia Montaldo Brito



Tesina de Grado. Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientador: Dra. Dora Ruchansky

Co-orientador: Dra. Natalia Goñi

Laboratorio de Ejecución: Laboratorio Nacional de Referencia de VIH/SIDA
Unidad de Virología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública. MSP

MONTEVIDEO 2019

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos.....	4
1-Resumen.....	6
2-Introducción.....	7
2.1 Generalidades.....	7
2.2 Morfología y estructura del virión.....	9
2.3 Genoma Viral.....	10
2.4 Ciclo Viral.....	13
2.5 Variabilidad génica.....	15
2.6 Transmisión.....	16
2.7 Tratamiento.....	17
2.8 VIH-2.....	17
2.9 Epidemiología en Uruguay.....	19
2.10 Diagnóstico en Uruguay.....	20
3-Objetivos.....	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4-Materiales y métodos.....	24
4.1 Población estudiada.....	24
4.2 Estudios serológicos.....	25
4.3 Estudios Moleculares.....	27
4.3.1 Extracción de ARN.....	27
4.3.2 Extracción de ADN.....	27
4.3.3 Amplificación de un fragmento del gen <i>pol</i> correspondiente a la proteasa de VIH-2.	27
4.3.3.1 RT-PCR anidada.....	28
4.3.3.2 Puesta a punto de las PCRs para VIH-2.....	29
4.3.4 Amplificación del gen <i>p17</i> de VIH-1.....	31
4.3.5 Electroforesis.....	33
4.3.6 Purificación de amplicones.....	33
4.3.7 Secuenciación.....	33
4.3.8 Análisis filogenético.....	34

5-Resultados.....	35
5.1 Resultados serológicos.....	35
5.2 Resultados moleculares.....	38
5.2.1 Amplificación de un fragmento del gen <i>pol</i> correspondiente a la proteasa de VIH-2 por RT-PCR Anidada.....	38
5.2.2 Amplificación de un fragmento del gen <i>pol</i> correspondiente a la proteasa de VIH-2 por PCR Anidada.....	38
5.2.3 Amplificación del gen p17 de VIH-1.....	39
5.2.4 Análisis bioinformático.....	39
5.2.5 Análisis filogenético.....	40
6-Discusión.....	43
7-Conclusiones.....	45
8-Perspectivas.....	45
9-Referencias Bibliográficas.....	46
10-Agradecimientos.....	52

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Aa	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN pol	ARN polimerasa
ARN pol	ARN polimerasa
CAP	Caperuza
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
°C	Grado <i>Celsius</i>
CRF	Formas Recombinantes Circulantes
DLSP	Departamento de Laboratorios de Salud Pública
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIA	Técnicas de enzimoimmunoensayo
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
gp	Glicoproteína
HXB2	Cepa Referente de Subtipo B
∞	Infinito
IN	Integrasa
INI	Inhibidores de la Integrasa
INNTR	Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa
INTR	Inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa
IP	Inhibidores de proteasa
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
L	Litros
LTR	Repetición Terminal Larga
M	Molar
μM	Micromolar
μL	Micro litro
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio

MSP	Ministerio de Salud Pública
Nested PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
nt	Nucleótido
ONUSIDA	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
p	Proteína
pb	Pares de Bases
PBS	Sitio de Unión al Cebador
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Marcador de Peso molecular
PPT	Tramo de polipurinas
PR	Proteasa
R	Repetidos cortos de secuencia
RT	Retrotranscriptasa
RT PCR	Retrotranscripción y PCR Anidada
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TARV	Terapia antirretroviral
TBE	Tris Borato EDTA
U	Unidad de actividad enzimática
U3	Unique 3' en inglés
U5	Unique 5' en inglés
URF	Formas Recombinantes únicas
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIS	Virus de Inmunodeficiencia Simio
WB	Western Blot

1.RESUMEN

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae* existiendo dos tipos: VIH-1 y VIH-2 filogenéticamente relacionados. Estos difieren en el diagnóstico y estrategias de tratamiento, siendo de importancia clínica y epidemiológica conocer el tipo de VIH en la persona infectada.

En Uruguay, se diagnosticaron en el Ministerio de Salud Pública, 27 casos de VIH-2 en el período 1997-2005.

El presente trabajo tiene como objetivo actualizar la información de infección por VIH-2 en personas con serología confirmatoria VIH1/2 positiva, así como el relevamiento de genotipos circulantes entre los años 2012-2017 en Uruguay.

Se partió de muestras clínicas (suero y/o sangre total con EDTA) cuyos test serológicos confirmatorios por Western Blot VIH-1/2 obtuvieron un resultado reactivo para VIH-2 en el período referido. Se confirmó el diagnóstico de VIH-2 por Western Blot específico para este grupo viral. Para el diagnóstico molecular se partió de extractos de ARN y ADN, amplificando por RT-PCR y PCR anidada para VIH-2 un fragmento del gen *pol* correspondiente a la proteasa (Posición 2553-2831 nt en SIVmac239), así también como una PCR anidada VIH-1 para la región *p17* (VIH-1) del gen *gag* (posición 790-1184 nt de HXB2) utilizando como control interno de la reacción un fragmento del gen *CCR5* celular. Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones, realizando el estudio filogenético con secuencias de referencia para VIH-2.

Veintidós muestras presentaron serología positiva por WB VIH-2, con un patrón de bandas correspondiente a la presencia de anticuerpos contra proteínas de la envoltura, cápside y de la polimerasa. Siete muestras tuvieron las condiciones adecuadas para ser amplificadas desde ADN proviral. Los resultados obtenidos del análisis filogenético, informan la pertenencia al grupo A de dicho virus.

Palabras clave: VIH-2, diagnóstico, genotipo, Uruguay.

2.INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

Entre los años 1983 y 1984 dos equipos de científicos aislaron un nuevo retrovirus llamado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de cultivos de linfocitos T de un paciente que presentaba síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Barre-Sinoussi y cols., 1983; Gallo y cols., 1983).

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV], 2019). Hasta la fecha se han descrito dos tipos de virus: VIH-1 que fue caracterizado en 1983 (Barre-Sinoussi y cols., 1983; Gallo y cols., 1983), diseminándose por todo el mundo, responsable de la pandemia originada en la década de los ochenta (Sharp y Hahn, 2010) y VIH-2 descubierto en 1986 (Clavel y cols., 1986) siendo endémico en África occidental, extendiéndose lentamente al resto del mundo (Visseaux y cols., 2016).

Estos dos tipos de virus son productos de eventos zoonóticos, el VIH-1 a partir del VIScpz, cuyo reservorio es el *Pan troglodytes troglodytes* y el VIH-2 del VISsmm cuyo reservorio es sooty mangabey (*Cercocebus atys atys*) (Sharp y Hahn, 2011).

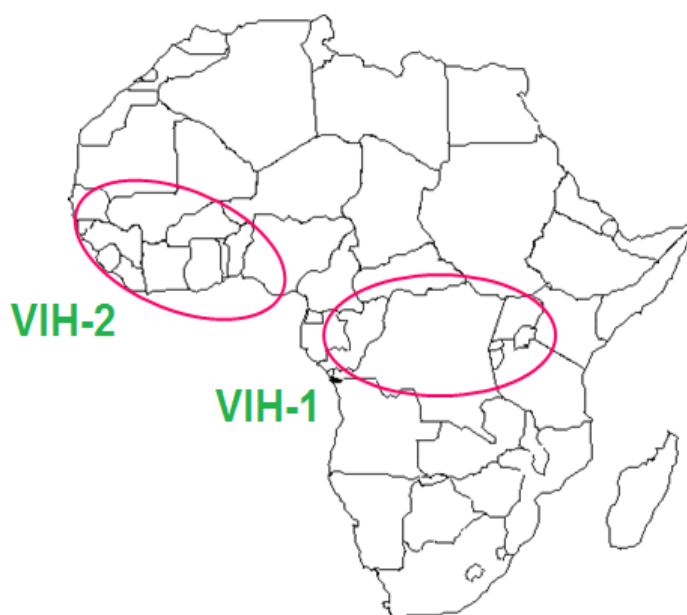


Figura 1. Distribución geográfica del origen del VIH en el continente africano indicado en óvalos rojos.

Los estudios evolutivos sugieren que estos eventos zoonóticos se produjeron a finales del siglo XIX y principios del XX (Nyamweya y cols., 2013), presentando diversidad en su distribución geográfica (Sharp y Hahn, 2011) (Figura 1 y 2).

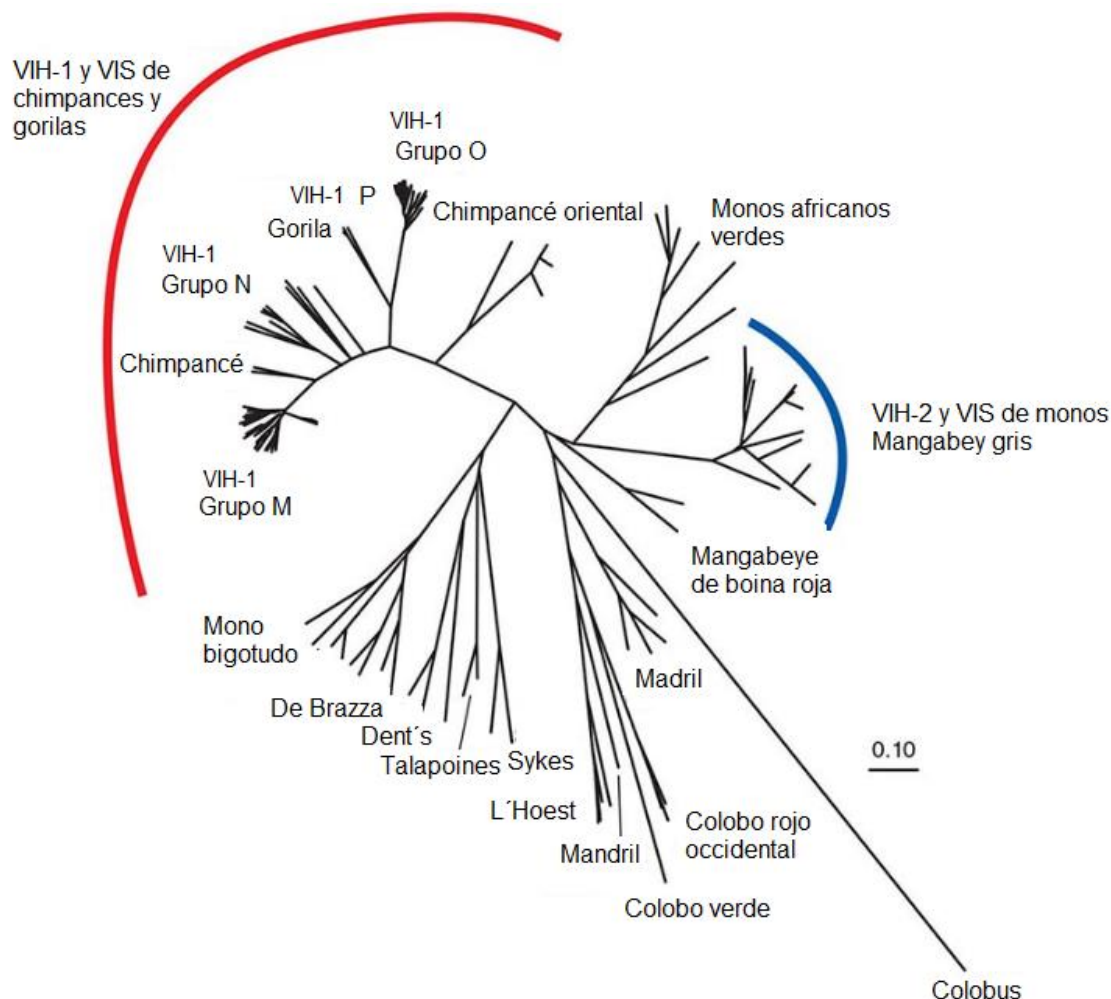


Figura 2. Árbol filogenético basado en los genomas completos de los virus de Inmunodeficiencia de primates. La escala indica una diferencia nucleotídica del 10%. VIS: virus de inmunodeficiencia simio. Extraído y modificado de Harrison's Principles of Internal Medicine, 2015.

Estos virus son capaces de producir una infección en la persona afectada que sin mediar ningún tratamiento, afecta severamente el sistema inmune ocasionando así un deterioro progresivo, generando el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, en los estadios más avanzados de la enfermedad (Simon y cols., 2006; Tyagi y Bukrinsky, 2012).

Según información proporcionada por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA), a fines del año 2017 había aproximadamente 36,9 millones de personas infectadas por VIH en el mundo (Figura 3), en dicho año se produjeron 1,8 millones de nuevas infecciones, teniendo como objetivo llegar para el 2020 a la "meta 90-90-90": El 90% de todas las personas que viven con VIH conocerán su estado serológico, el 90% de todas las personas diagnosticadas por VIH recibirán terapia

antirretroviral (TARV) y el 90% de todas las personas que reciben tratamiento antirretroviral, tengan una supresión viral (ONUSIDA, 2019). Estos objetivos apuntan a terminar con la pandemia del SIDA para el 2030, por lo que es de suma importancia prestar atención al VIH-2 ya que plantea distintos desafíos para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento enmarcado en esta “meta 90-90-90” (Gottlieb y cols., 2018).

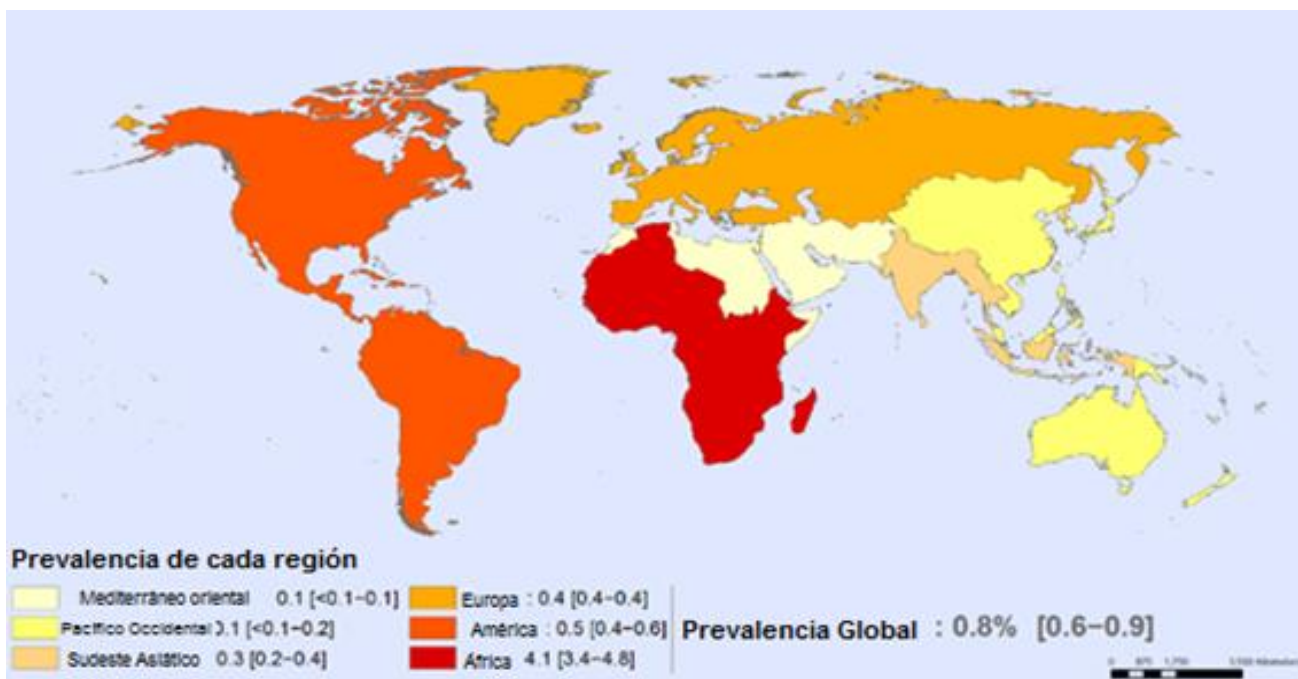


Figura 3. Prevalencia del VIH en población adulta en un rango de edad entre 15 a 49 años, en el año 2017. Extraído y modificado de Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018.

2.2 Morfología y estructura del virión

La partícula viral presenta una morfología pleomórfica o esférica (80 a 120 nm de diámetro) envuelta por una bicapa lipídica, obtenida por el virus en el proceso de gemación de la célula del hospedero, donde se encuentran insertas aproximadamente 80 espículas, formadas por glicoproteínas de superficie (gp120 en VIH-1 y gp105 en VIH-2), encargadas del reconocimiento del receptor celular CD4, y glicoproteínas transmembranas encargadas de la fusión de membranas (gp41 en VIH-1 y gp36 en VIH-2) (Fields y cols., 2013). Este tipo de glicoproteína es esencial para que el virus infecte las células. Debajo de la envoltura se encuentra la proteína de matriz denominada p17 en VIH-1 y p16 en VIH-2. El core presenta una estructura de cono truncado compuesto por la proteína p24 en VIH-1 y p26 en VIH-2, conteniendo 2 mono hebras de ARN idénticas de sentido positivo, un ARN de transferencia y 3 enzimas que intervienen en el ciclo

replicativo: retrotranscriptasa (RT) encargada de sintetizar ADN doble hebra a partir de ARN simple hebra; integrasa (IN) que integra el ADN proviral en el genoma del hospedero y proteasa (PR) que corta la poliproteína gag/pol para generar partículas infectivas esenciales para que el virus pueda realizar su ciclo replicativo y generar viriones maduros (Alcami y Coiras, 2011; Rosas y cols., 2013) (Figura 4).

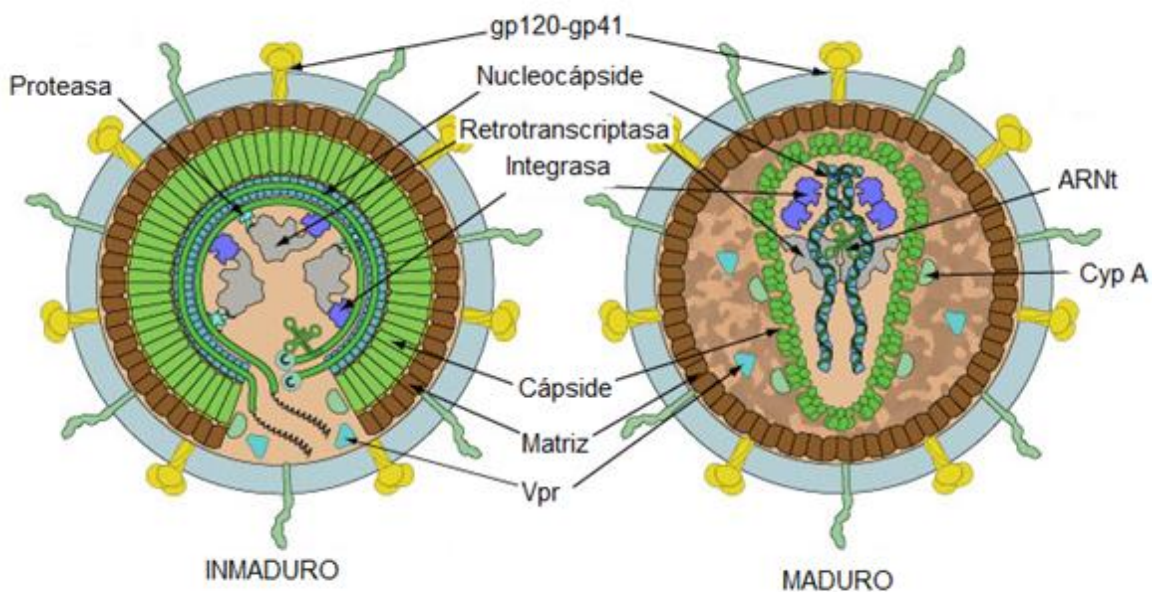


Figura 4. Estructura del virión de VIH-1. Extraída y adaptada de ViralZone, 2019.

2.3 Genoma viral

El genoma del VIH se encuentra conformado por dos moléculas de ARN de cadena simple polaridad positiva de 9.75 Kb, que se encuentran unidas por enlaces no covalentes (ViralZone, 2019). En su extremo 5' presenta una caperuza (cap) y una cola poli A en el extremo 3', esto se debe a que este genoma es sintetizado por la ARN pol II celular cuando el virus está en su etapa proviral (Fields y cols., 2013). Posee tres genes estructurales *gag*, *pol* y *env*. El producto de la traducción del gen *gag* es una proteína precursora de 55 kDa, durante el proceso de maduración es procesada y da lugar a las proteínas estructurales de la matriz p17, cápside p24 y de la nucleocápside p6 y p7, facilitando el ensamblaje de los diversos componentes del virión (Rosas y cols., 2013). Por otro lado los productos del gen *pol* dan lugar a las enzimas proteasa p15, la retrotranscriptasa p66/p51 y la integrasa p31 en VIH-1 y p34 en VIH-2. El gen *env* se encuentra situado en el extremo 3' del genoma, luego de transcribirse, se traduce en una glicoproteína precursora gp160, para ser procesada por proteasas celulares, obteniéndose las glicoproteínas gp120 y gp41.

Además contiene genes reguladores como *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr*, *vpu* y *vpx*, muchos de los cuales codifican un set de proteínas accesorias que van a potenciar la patogenicidad del virus, actuar en procesos de localización nuclear, entre otros (Rosas y cols., 2013) Tabla1.

Tabla 1. Proteínas estructurales, reguladoras y accesorias del VIH1-VIH2. Extraído y modificado de “*HIV Sequence Compendium 2018*” (Foley y cols., 2018). En negro se marca el tamaño de las proteínas correspondientes a VIH-1 y en rojo a VIH-2.

NOMBRE		TAMAÑO	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN
<i>gen</i>	Proteína			
<i>gag</i>	MA	p17 p16	Favorece el anclaje de membrana celular y el transporte nuclear del complejo pre-integración.	Virión
	CA	p24 p26	Proteína de la cápside	Virión
	NC	p7	Proteína de la nucleocápside que se une al ARN	Virión
		p6	Proteína que se une a Vpr.	Virión
<i>pol</i>	PR	p15	Procesa la poliproteína gag/pol y ayuda a la maduración del virus	Virión
	RT	p66,p51 p68	Retrotranscripción	Virión
	RnasaH	p15	Actividad RnasaH	Virión
	IN	p31 p34	Integración del ADN Proviral	Virión
<i>Env</i>		gp120/gp41 gp105/gp36	Unión a los receptores CD4 y co-receptores	Membrana plasmática y virión

<i>Tat</i>	p16/p14	Transactivación de la transcripción viral	Principalmente en núcleo y nucléolo
<i>Rev</i>	p19	Transporte de ARN	Principalmente en núcleo y nucléolo
<i>Vif</i>	p23	Promueve la maduración y la infectividad del virión.	Citoplasma, virión
<i>Vpr</i>	p10-15	Promueve la localización del complejo pre-integración, inhibe la división celular.	Núcleo del virión
<i>Vpu</i>	p16	Promueve la liberación extracelular y degrada CD4	Proteína integral de membrana
<i>Nef</i>	p27-p25	Induce la producción de quimiocinas	Membrana plasmática, citoplasma
<i>Vpx</i>	p12-16	Proteína homóloga de Vpr en VIH-2.	Virión
<i>Tev</i>	p28	Proteína tat-env-rev	Principalmente en núcleo y nucléolo
<i>Asp</i>	190 aa	Proteína antisentido	

La región del extremo 5' está formada por la zona R (Repetidos cortos de secuencia), que tiene un rol importante en la retrotranscripción; U5 (Unique 5' en inglés) primera región no codificada donde se inicia la retrotranscripción y PBS (Primer Binding Site en inglés) constituida aproximadamente por 18 nucleótidos que son complementarios a los nucleótidos 3'. El extremo 3' está constituido por la región PPT (*Polypurine Tracten* inglés) con residuos de Adenina (A) y Guanina (G), U3 (Unique 3' en inglés) elementos que actúan en *cis* para la expresión de genes virales y una región R (Fields y cols., 2013).

Producto de la retrotranscripción se genera el ADN doble hebra con extremos con una misma secuencia (5' LTR y 3' LTR) (*Long Terminal Repeat* en inglés), los cuales son importantes para la posterior integración del ADN proviral al genoma celular (Figura 5).

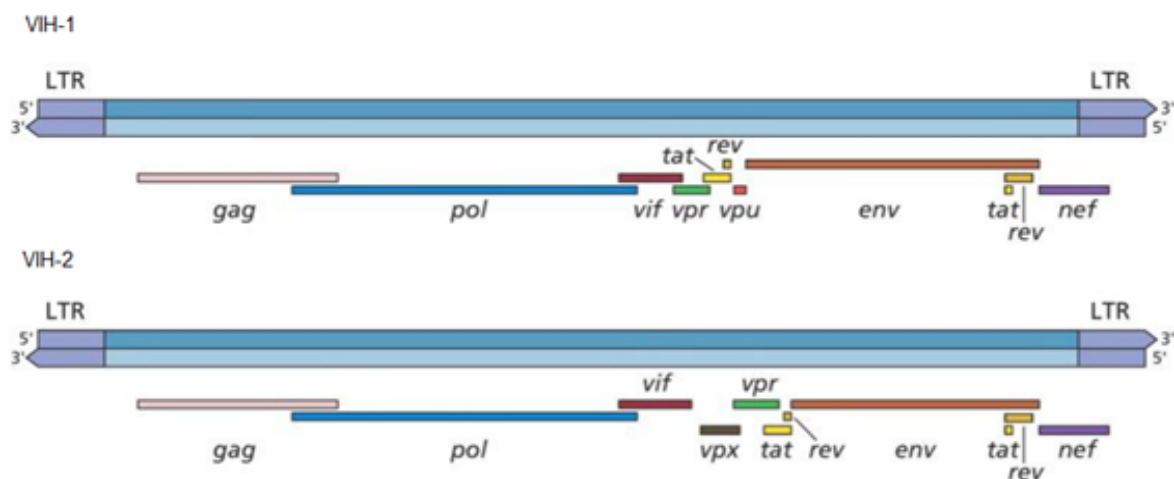


Figura 5. Esquema del ADN proviral de VIH-1 y VIH-2. Extraído de Flint y cols., 2015.

2.4 Ciclo Viral

El primer paso de la infección requiere la interacción entre la partícula viral por intermedio de sus glicoproteínas de superficie, el receptor celular CD4 y sus co-receptores (CCR5, CXCR4, CCR3 o el CCR2b22) presentes en la superficie de la célula huésped (linfocitos T CD4, macrófago, células dendríticas, etc.), induciendo una serie de cambios conformacionales que logran fusionar la envoltura viral con la membrana plasmática.

Una vez fusionadas ambas, se produce el desprendimiento de la nucleocápside al citoplasma celular, con posterior destrucción de la misma y liberación del ácido nucleico (ARN viral) al citoplasma. El proceso de replicación continúa con la síntesis de ADN doble hebra a partir del ARN viral realizado por la enzima retrotranscriptasa. El ADN formado es transportado desde el citoplasma al núcleo donde se integra al genoma del hospedero mediado por la enzima integrasa. Una vez que ocurre la integración, la célula no tiene mecanismos para eliminar al provirus, este puede permanecer inactivo por años (en forma episomal) sin producir nuevas copias (Alcami y Coiras, 2011; Fields y cols., 2013).

La transcripción depende de la ARN polimerasa II celular, que sintetiza diferentes transcritos a partir del provirus, los que son iguales al genoma pueden salir sin hacer “*corte y empalme*” (splicing en inglés) al citoplasma para formar parte de los nuevos viriones progenie, serán las hebras de ARN viral; por otra parte, un transcrito precursor

de gag y otro precursor de la poliproteína gag-pol saldrán del núcleo para ser traducidos por ribosomas libres y poder producir las proteínas virales como la retrotranscriptasa, integrasa, proteína de la cápside, etc. Además el transcripto de env sufrirá “*splicing*” en el núcleo y será exportado a los ribosomas del retículo endoplasmático para sintetizar las proteínas de la envoltura, éstas serán glicosiladas y enviadas a la membrana plasmática (Figura 6).

El ensamblaje del nuevo virión se da en un polo de la célula, cercano a la membrana, haciéndose valer para ello de una señal de encapsidación en el genoma. El virión egresa por brotación en forma inmadura, conformando su envoltura con la membrana celular. La partícula pasa a ser infectiva luego de procesar sus poliproteínas, por acción de la enzima proteasa, convirtiéndose en virión maduro (Figura 4), siendo capaz de infectar a nuevas células (Fields y cols., 2013).

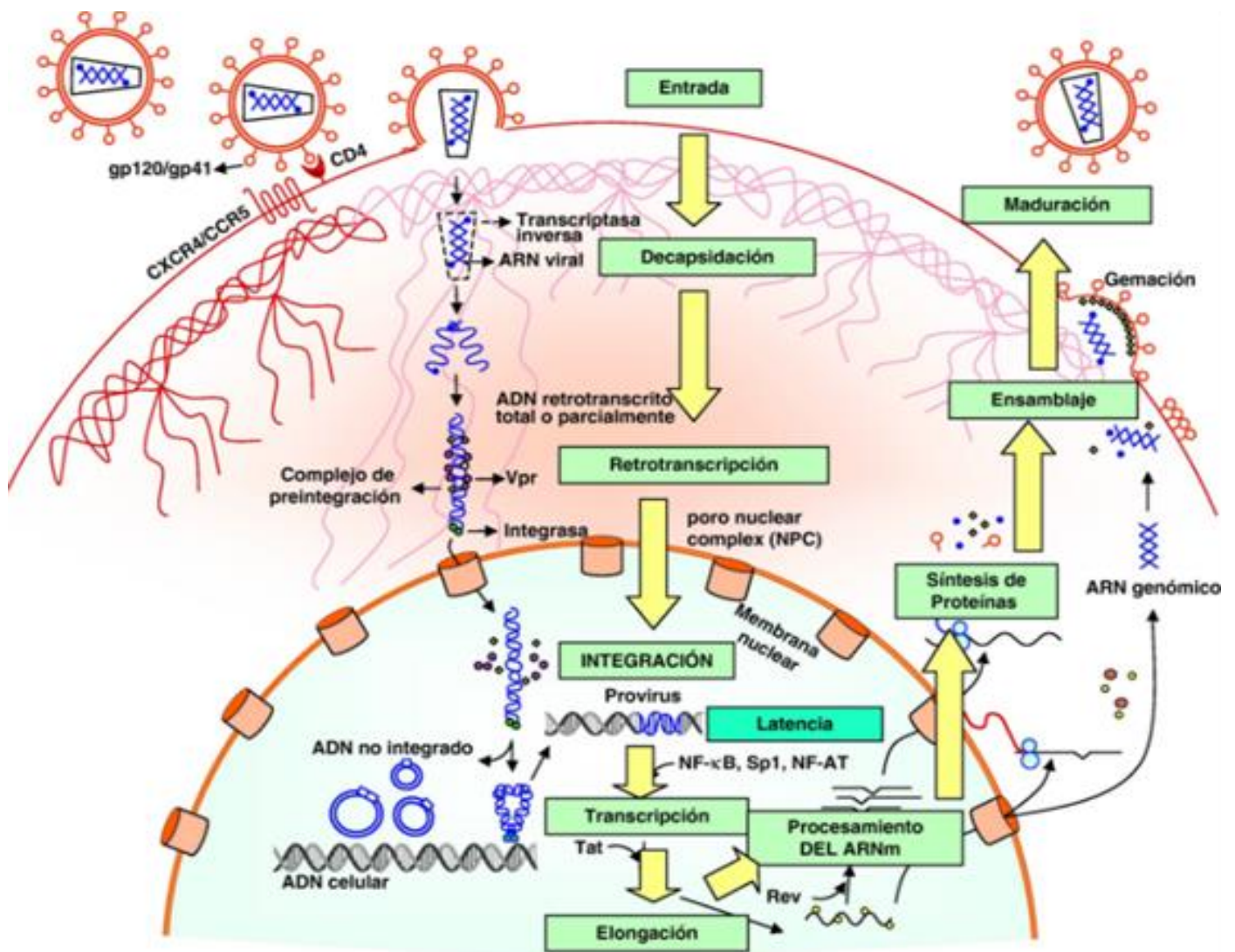


Figura 6. Esquema del ciclo viral del VIH-1. Extraído de Alcami y Coiras, 2011.

2.5 Variabilidad génica

Una de las principales características del VIH, es la existencia de una alta tasa de mutaciones en el proceso de replicación, producto de los errores producidos por la carencia de actividad correctora de la retrotranscriptasa, generando mutaciones, como deleciones, inserciones, en uno o más nucleótidos, esto provoca que el virus circule como una población que presenta una alta diversidad génica, con un número elevado de progenie viral denominadas cuasiespecies, con una capacidad de adaptación a los cambios debido a las presiones selectivas, generando resistencia al tratamiento antirretroviral y una gran evasión al sistema inmune (Domingo y cols., 1997; Domingo y cols., 2001).

Asimismo, la recombinación “copy choice” en el cual la ARN polimerasa, “salta” de una molécula de ARN a otra durante la retrotranscripción a ADN proviral, es otra fuente de variabilidad presente en el ciclo replicativo (Perelson y cols., 1996). Se siguen reportando numerosas formas recombinantes pudiendo ser generadas a partir de una reinfección o por una infección simultánea (coinfección) de dos genotipos virales distintos en una misma célula (Visseaux y cols., 2016; Nikolopoulos y cols., 2016).

Actualmente se encuentran definidos cuatro grupos filogenéticos en VIH-1 denominados M, N, O y P. El Grupo M fue el primero en ser descubierto y representa la forma pandémica del VIH-1, se clasifican en nueve subtipos genéticamente distintos (A-D, F-H, J, K), subsubtipos (A1, A2, A3, A4, A6, F1, F2), formas recombinantes circulantes (CRF) (Circulating Recombinant Form en inglés) y formas recombinantes únicas (URF) (Nikolopoulos y cols., 2016).

Hasta el momento se han reportado coinfecciones de ambos tipos virales (VIH-1, VIH-2), además de infecciones individuales por VIH-2 (Nsagha y cols., 2012).

El VIH-2 se clasifica filogenéticamente en nueve grupos denominados de la A a la I, que representan una fuente de transmisión independiente entre especies, siendo epidemiológicamente el grupo A, el más prevalente a nivel mundial. (Visseaux y cols., 2016).

También se han identificado dos formas recombinantes en VIH-2, una forma recombinante circulante y otra como una forma recombinante única, esto se puede deber una baja prevalencia del virus y una menor tasa de transmisión (Visseaux y cols., 2016).

2.6 Transmisión

La transmisión del VIH ocurre a través del intercambio de determinados fluidos corporales de la persona infectada, como la sangre, la leche materna, las secreciones vaginales o el semen.

Existe una multiplicidad de factores que favorecen o no la posibilidad de infección, entre ellos: la carga viral del virus, el uso de preservativos, de drogas inyectables, transfusiones sanguíneas y/o trasplantes de órganos en forma no controlada.

Existen 3 vías de transmisión del virus:

Transmisión Sexual:

La transmisión sexual continúa siendo la principal vía de transmisión del VIH en el mundo, teniendo una velocidad de propagación superior a las otras. Las personas que tienen otras infecciones de transmisión sexual (Herpes, Sífilis, etc) son más vulnerables a infecciones por el VIH, estas son infecciones que se propagan de una persona a otra por medio del contacto sexual, por vía anal, vaginal u oral (Shaw y Hunter, 2012).

Transmisión sanguínea:

Esta transmisión se puede producir por cualquier vía que conduzca directamente al flujo sanguíneo, compartiendo jeringas u objetos cortopunzantes contaminados con sangre infectada por VIH, al igual que el uso de drogas intravenosas, tatuajes, piercings, transfusión de sangre, trasplante de órganos, donde no se han seguido los controles necesarios y dispuestos para una acción segura (Shaw y Hunter, 2012).

Transmisión Vertical (madre-hijo):

Se produce durante el embarazo, cuando el virus traspasa la barrera placentaria e infecta al feto. El riesgo de transmisión en esta etapa depende de la carga viral de la madre y de la etapa de la infección en que se encuentre. El momento del parto es donde el riesgo es mayor, debido al contacto estrecho del bebé con secreciones vaginales y con la sangre

materna. También se puede transmitir el VIH a través de la lactancia (Simon y cols., 2006). Actualmente la mujer embarazada, que está infectada y diagnosticada, se le recomienda recibir tratamiento antirretroviral con el fin de bajar la carga viral a niveles indetectables, de tal manera de minimizar al máximo la transmisión vertical (Ministerio de Salud Pública [MSP], 2018).

2.7 Tratamiento

La terapia antirretroviral (TARV) trata de reducir al máximo la replicación viral, teniendo como objetivo el descenso de la carga viral a valores indetectables, restaurar el sistema inmune de la persona infectada y prevenir la transmisión (Simon y cols., 2006; MSP, 2018).

Actualmente las principales drogas se basan en la acción sobre diferentes enzimas virales que intervienen en la replicación viral, así como en drogas que actúan sobre el co-receptor CCR5 de la célula huésped. Las familias más utilizadas son: **Inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa (INTR)**, bloquean la retrotranscripción del virus; **Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTR)**, alteran a la enzima retrotranscriptasa; **Inhibidores de proteasa (IP)**, bloquean la acción de la proteasa, evitando que el virus se convierta en un virión maduro capaz de infectar a otras células; **Inhibidores de fusión**, actúan bloqueando la envoltura del virión para impedir la fusión con la membrana celular; **Inhibidores de la Integrasa (INI)** consisten en moléculas que bloquean los sitios activos de la integrasa e **Inhibidor de Co-receptores CCR5**, bloquean a dicho co-receptor, evitando que el virus ingrese a la célula (InfoSIDA, 2019).

El tratamiento se aplica usando una combinación de fármacos conteniendo una o más clases de las familias antes mencionadas.

2.8 VIH-2

Estudios realizados de VIH-2, mencionan que su ingreso a los humanos ocurrió a mediados del siglo XX a partir del Virus de Inmunodeficiencia Simio (VISmm) del mono sooty mangabey (*Cercocebus atys atys*), en distintos eventos zoonóticos. Los mangabey se cazan con frecuencia como plagas agrícolas, además utilizan sus pieles, su carne y conviven con ellos como mascotas (figura 7), esto habría proporcionado distintas vías

posibles de transmisión interespecie (evento zoonótico) en muchas áreas de África Occidental (Sharp y Hahn, 2011).

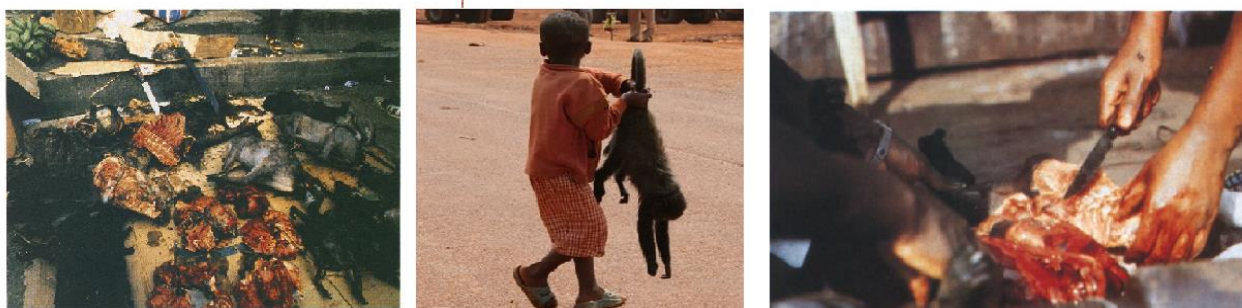


Figura 7. Mono sooty mangabey (*Cercocebus atys atys*) en distintos eventos.

Desde su descubrimiento en 1986 (Clavel y cols., 1986), el VIH-2 estuvo restringido a algunos países del continente africano como Gambia, Guinea-Bissau, Ghana, Cabo Verde, Costa de Marfil, Senegal, Sierra Leona y Nigeria (Maueia y cols., 2011). A pesar de ser endémico en África occidental, en las últimas décadas se ha extendido lentamente a otros continentes como Europa, principalmente en países como Portugal, Francia y España, en Asia, India y en el continente Americano, Estados Unidos y Brasil, siendo un problema importante de salud pública (Campbell-Yesufu y Gandhi, 2011; Visseaux y cols., 2016; Gottlieb y cols., 2018) (Figura 8). La causa del mismo puede ser el aumento en la migración de la población, guerras de independencia en la región, conflictos civiles y viajes internacionales (Maueia y cols., 2011).

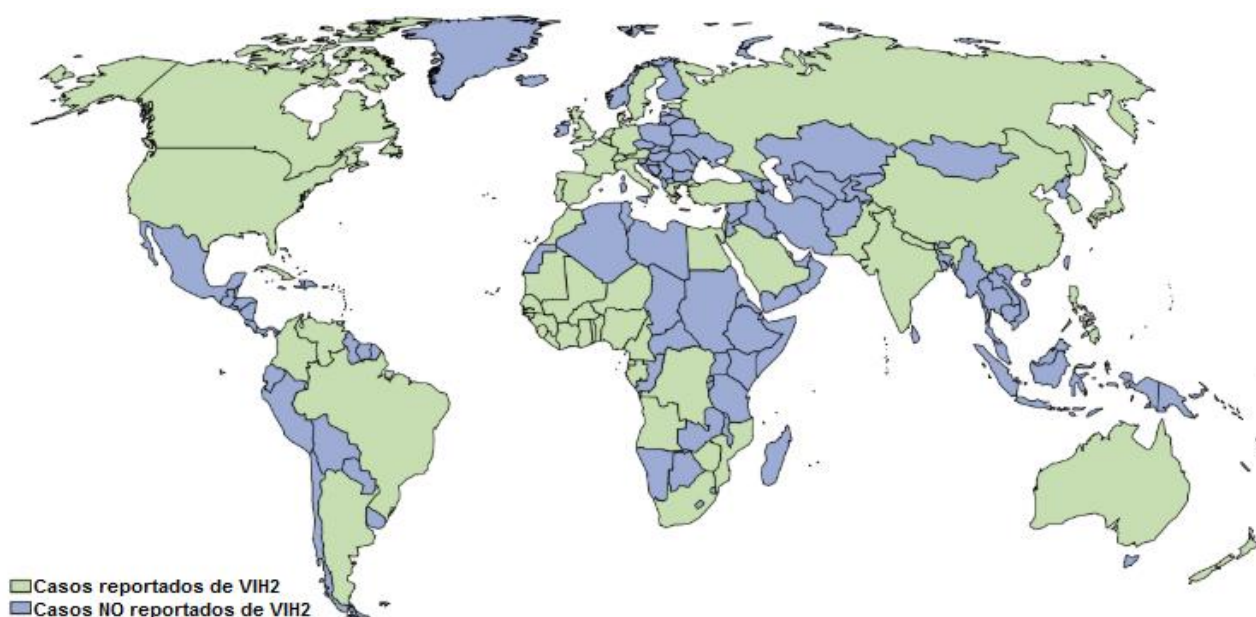


Figura 8. Mapa de países con casos notificados de VIH-2. Los países o regiones con casos de VIH-2 notificados se muestran en verde. Extraído y modificado de Gottlieb y cols., 2018.

El genoma del VIH-2 mantiene una homología del 40% con el de VIH-1. El gen *vpx* solo corresponde a VIH-2, está presente en las partículas virales y actúa en el transporte viral dentro de la célula (Fields y cols., 2013). Además utilizan como co-receptores el CCR5, CXCR4, CCR3 o el CCR2b22 entre otros en su ciclo viral (Reeves y Doms, 2002).

En la infección por VIH-2, la carga viral es generalmente más baja que en VIH-1 siendo la replicación del VIH-2, aproximadamente 100 veces menor, observándose una disminución más lenta en el recuento de los linfocitos CD4 (Martinez-Steele y cols., 2007; De Silva y cols., 2013; Gottlieb y cols., 2018). Se ha sugerido que un porcentaje de las personas infectadas con este tipo viral, se consideran “controladores élite” debido a su estado asintomático de la infección, manteniendo cargas virales indetectables durante décadas sin tratamiento (Kannangai y cols., 2012). Esto puede explicar por qué las tasas de transmisión son más bajas para este virus. Además presenta un período más prolongado en su ciclo natural hasta el desarrollo del SIDA (MacNeil y cols., 2007; Martínez-Steele y cols., 2007; Alford y cols., 2016).

Estudios realizados en pacientes VIH-2 positivos han demostrado una resistencia intrínseca de alto nivel a los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNRT), debido a la sustitución de una base en el gen de la RT, así también como al inhibidor de la fusión (Campbell-Yesufu y Gandhi, 2011).

Los datos disponibles sugieren que algunos de los IP activos contra el VIH-1 clínicamente son también efectivos contra el VIH-2 (Gottlieb y cols., 2018), aunque todavía hay muy pocos datos para aseverar un óptimo régimen de tratamiento antirretroviral para personas infectadas con ambos virus.

2.9 Epidemiología en Uruguay

En Uruguay la epidemia de VIH/SIDA es endémica, se trata de una epidemia de tipo “concentrada” donde existe una prevalencia del 0,6% en población general y superior al 5% en población clave (poblaciones consideradas con mayor riesgo) en particular personas privadas de libertad, usuarios de drogas, trabajadores/as sexuales masculinos y femeninos, hombres que tienen sexo con hombres, mujeres trans, usuarios de pasta base de cocaína (MSP, 2018).

Los primeros casos de SIDA identificados y tratados en el país fueron entre 1983 y 1988, la mayoría eran personas que se habían infectado en el exterior (Arbiza y Russi, 2002).

En la actualidad hay aproximadamente 12.684 personas viviendo con VIH en Uruguay. La tasa de notificación de nuevos diagnósticos ha presentado un descenso aunque se incrementó en la capital (MSP, 2018).

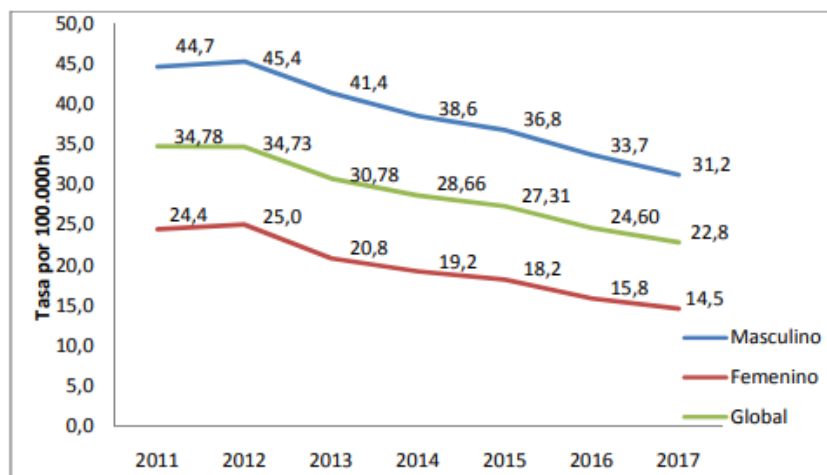


Figura 9. Evolución de la tasa de notificación de nuevas infecciones por VIH en ambos sexos. Uruguay. Período 2011-2017. Extraído del MSP, 2018.

Por el Laboratorio Nacional de Referencia VIH-SIDA del Ministerio de Salud Pública, se reportaron 27 casos de VIH-2 en el período 1997-2005. Dichas infecciones fueron diagnosticadas y confirmadas por serología, además de la caracterización molecular de estos virus circulantes (Ruchansky y cols., 2011).

2.10 Diagnóstico en Uruguay

El diagnóstico de la infección por VIH tiene una gran importancia clínica permitiendo la detección precoz de las personas infectadas por el virus, facilitando el acceso temprano a los tratamientos antirretrovirales (TARV).

Las personas en la etapa temprana de la infección por VIH pueden tener cargas virales elevadas, aumentando la posibilidad de transmisión, siendo de gran importancia detectar la infección precozmente, además el VIH-1 y VIH-2 difieren en el diagnóstico y en las estrategias de tratamiento (Díaz y cols., 2012), por lo que es de trascendencia clínica y epidemiológica, conocer el tipo de VIH en la persona infectada.

En Uruguay el diagnóstico de VIH se realiza por métodos indirectos, es decir, mediante la búsqueda de anticuerpos específicos contra proteínas del virus, así también como por métodos directos (detección de Antígeno p24 y/o ADN proviral) (MSP, 2018).

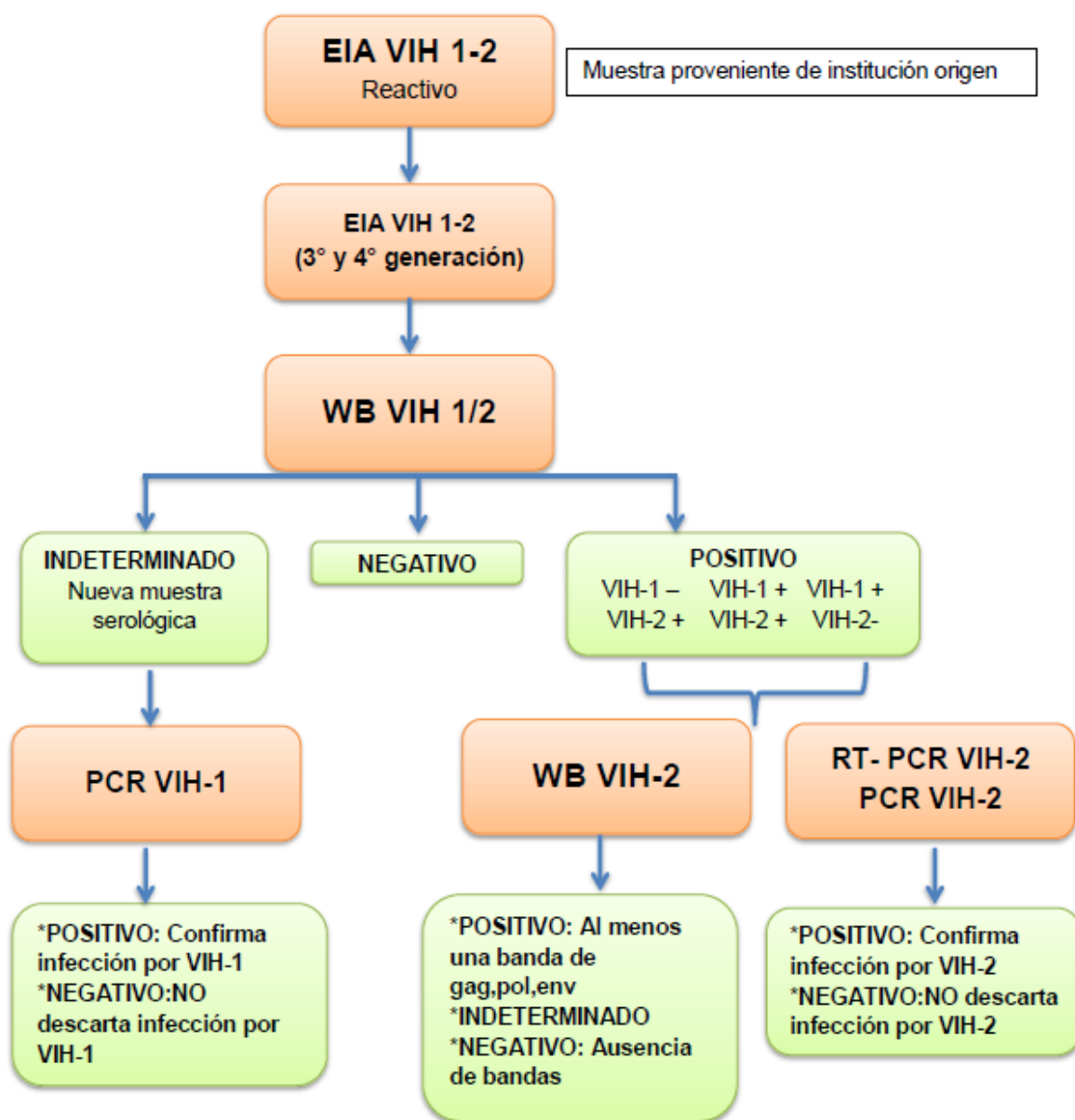


Figura 10. Algoritmo para el diagnóstico de la infección VIH-1 / VIH-2. Los cuadros rosados indican las técnicas utilizadas. Los cuadros en color verde los diferentes resultados que se pueden obtener. Extraído y modificado del MSP, 2016.

Pruebas de tamizaje

Habitualmente se emplean técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA), de fácil manejo siendo en la actualidad equipos automatizados, por lo que disminuye el margen de error y se obtienen los resultados en un corto lapso de tiempo. Estas pruebas son muy sensibles, reduciendo la posibilidad de obtener un resultado falso negativo.

En Uruguay, están disponibles los test de EIA de “3ª y 4ª generación”, que utilizan una mezcla de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos de ambos virus, para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2, en los que se destaca el de 4ta generación por la detección del antígeno viral p24 en las fases iniciales de la infección, disminuyendo así el período ventana.

Prueba confirmatoria

A todos los resultados reactivos por serología de tamizaje (realizada en la institución de origen), se les debe hacer una prueba de confirmación, estas se realizan por medio de un procedimiento de alta especificidad, como es la técnica de Western Blot, detectándose la respuesta humoral completa, aproximadamente 30 días post infección (Fiebig y cols ., 2003).

En situaciones particulares como niños nacidos de madres seropositivas, serología indeterminada y/o para diferenciar la infección por VIH-1 de VIH-2 se realiza la confirmación mediante el uso de técnicas de biología molecular que permiten la detección de fragmentos del ADN proviral (Ruchansky, 2016).

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Actualizar la información del diagnóstico y genotipos de VIH-2 circulante en Uruguay durante los años 2012-2017 a través del uso de diferentes técnicas y abordajes experimentales.

3.2 Objetivos específicos

- Evidenciar la infección por VIH-2 en personas con serología confirmatoria positiva de VIH1/2 a través de técnicas serológicas y moleculares.
- Puesta a punto del diagnóstico molecular de VIH-2.
- Secuenciar y estudiar filogenéticamente los hallazgos de VIH-2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Población estudiada

Con el fin de diagnosticar y caracterizar las cepas de VIH-2 que circulan en Uruguay, se analizó serológicamente muestras clínicas detalladas en la Tabla 2, ingresadas al Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP), cuyos test confirmatorios Western Blot VIH-1/2 HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostic™) resultaron reactivos para VIH-2 en el periodo 2012-2017.

Tabla 2. Muestras analizadas en este estudio, de acuerdo a las siguientes variables: Año de toma de muestra, identificación de la muestra (ID) y el tipo de muestra (suero y/o sangre total con EDTA).

AÑO	ID	TIPO DE MUESTRA
2017	17/77521A	Suero y sangre total con EDTA
	17/1127	Suero
	17/888	Suero
	17/1253	Suero y sangre total con EDTA
2016	16/004	sangre total con EDTA
	16/920	Suero
2015	15/6941	Suero y sangre total con EDTA
	15/211	Suero
2014	14/1149	Suero
	14/187	Suero
2013	13/1645	Suero
	13/136	Suero
	13/79	Suero
	13/455	Suero y sangre total con EDTA
	13/414	Suero
	13/252	Suero
2012	12/6077	Suero y sangre total con EDTA
	12/1712	Suero
	12/1645	Suero y sangre total con EDTA
	12/1547	Suero
	12/1606	Suero
	12/1636	Suero

4.2 Estudios serológicos

El Western Blot (WB), es una técnica basada en la separación de proteínas virales por su peso molecular mediante electroforesis, que luego son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. En esta membrana de nitrocelulosa se incuba el suero o plasma del paciente. La muestra que contiene anticuerpos específicos contra el VIH-1 y VIH-2, se unirá a las proteínas presentes en la membrana, si esto ocurre se revela, mediante un segundo anticuerpo marcado con una enzima, y su correspondiente sustrato, visualizándose "bandas coloreadas" en la tira.

Existen Western Blot tanto para VIH-1 como para VIH-2. En el WB para VIH-1 las bandas se pueden dividir en tres grupos: las glicoproteínas env o de envoltura (gp41, gp120, gp160), las proteínas gag o del núcleo (p17, p24, p55) y las proteínas pol o de endonucleasa-polimerasa (p31, p51, p66). El criterio de interpretación para VIH-1 es el utilizado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) considerando un WB positivo aquellas muestras que presentan las bandas p24 con al menos una de las siguientes bandas: gp41 o gp120/160; un WB negativo, muestras con ausencia de bandas y un WB Indeterminado, muestras con patrones diferentes a los mencionados anteriormente (Centers for Disease Control, 2001), en este caso, se realiza seguimiento serológico y/o detección de ADN proviral .

En este WB VIH1/2, en la parte inferior, hay proteínas de VIH-2 (gp36), que son reconocidas en caso de presencia de anticuerpos contra ese tipo viral. Pero a diferencia de las bandas que pueden aparecer para las proteínas de VIH-1 que confirman la infección por su especificidad, cuando aparece coloreada la banda correspondiente a VIH-2, se debe confirmar con un WB específico para este tipo viral (Figura 11).

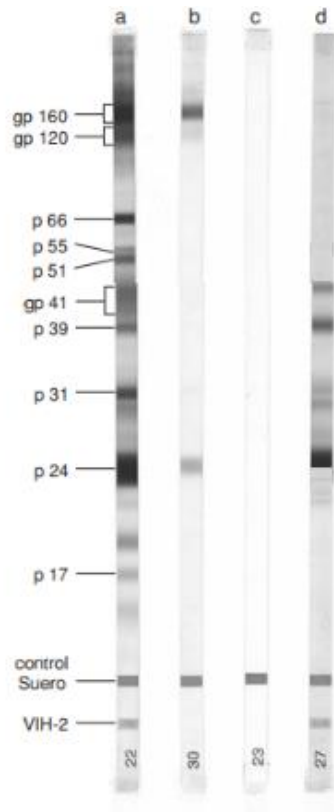


Figura 11. Banda a: Positivo fuerte (reactivo para el VIH-1 y el VIH-2), banda b: Positivo débil (reactivo sólo para el VIH-1), banda c: Negativo, banda d: Ejemplo de muestra reactiva para VIH-2. Extraído y modificado de MP Diagnostic™

En el caso del Western blot para VIH-2 las proteínas también se pueden dividir en tres grupos: las glicoproteínas env (gp36, gp105, gp140), las proteínas gag (p16, p26, p56) y las proteínas pol (p34 y p68). El criterio de interpretación para este WB es el utilizado por recomendación del fabricante del Kit comercial NEW LAV-BLOT II (Bio-Rad), siendo positivas aquellas muestras que presentan al menos una proteína de cada una de las siguientes regiones: env, pol y gag, negativas las que no presentan bandas, e indeterminadas las que no cumplen con ninguno de los dos criterios anteriores.

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo, se llevó a cabo una revisión completa de las tiras de nitrocelulosa de Western Blot VIH-1/2 (MP Diagnostic™) realizados en el DLSP en el período 2012-2017 buscando los patrones que presentaran banda reactiva para VIH-2. Una vez identificadas, fueron seleccionadas las muestras clínicas correspondientes que estaban conservadas a -20°C, hasta su procesamiento (Tabla 2).

Partiendo de 20 µL de suero de cada muestra seleccionada, se realizó el análisis por Western Blot específico VIH-2 para su confirmación serológica utilizando el Kit comercial NEW LAV-BLOT II (Bio-Rad) de acuerdo con instrucciones suministradas por el fabricante.

4.3 Estudios Moleculares

4.3.1 Extracción de ARN

El ARN total fue extraído a partir de 140 µL de de plasma y/o suero, utilizando el Kit comercial por columna de sílica QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®), siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. El ARN obtenido fue almacenado a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

4.3.2 Extracción de ADN

El ADN total fue obtenido a partir de 200 µL de sangre total con EDTA utilizando el Kit comercial QIAmp Viral DNA Mini Kit (QIAGEN®), de acuerdo con instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta el momento de su análisis.

4.3.3 Amplificación de un fragmento del gen *pol* correspondiente a la proteasa de VIH-2

Con el fin de realizar el diagnóstico molecular de VIH-2 a las muestras que presentaron serología positiva por WB VIH-2, se procedió a la amplificación de un fragmento del gen *pol* correspondiente a la proteasa (Posición 2553-2831 en SIVMAC239), por ser una proteína fundamental en el procesamiento de la poliproteína gag/pol. El gen *pol* es una de las regiones del genoma más conservada de este virus, resultando un blanco ideal para la detección molecular de dicho virus.

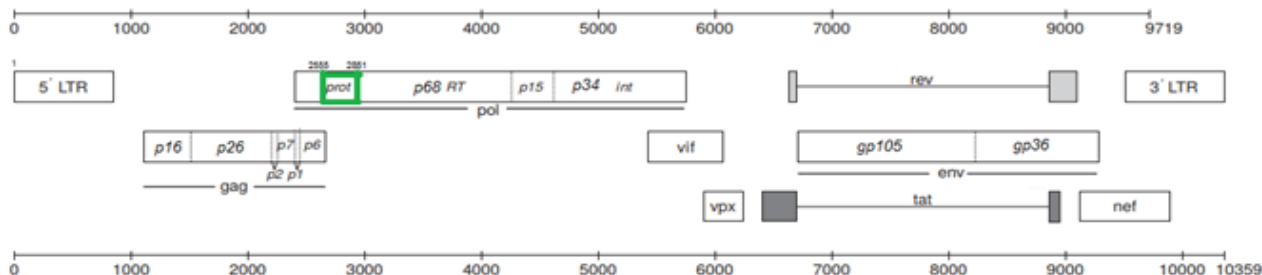


Figura 12. Esquema del genoma de VIH-2 con el fragmento del gen *pol* estudiado .. ■

Posición nucleotídicas en base a SIVmac239 (acceso en GenBank M33262).

4.3.3.1 RT-PCR anidada

Partiendo de extractos de ARN correspondiente a las muestras clínicas y a controles positivos y negativos que se realizan en cada experiencia, la amplificación por RT-PCR se realizó con el kit comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello 12.5 µL del extracto de ARN fue agregado a una mezcla conteniendo 10 µL de tampón 5xQiagen, 2 µL de dNTPs 10mM, 1 µL de cada cebador externo (10 µM) (Tabla 3), 2 µL Mix de Enzima RT-PCR QIAGEN OneStep, 0.25 µL de Rnasin 40 U y se completó con agua ultrapura libre de ARNasas y ADNasas (QIAGEN®) hasta un volumen final de 50 µL.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Multigene (Labnet) bajo las siguientes condiciones:

- 1) 30 minutos a 50°C
- 2) 15 minutos a 95°C.
- 3) 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C.
- 4) 10 minutos a 72 °C.
- 5) ∞ a 15°C.

Partiendo del producto amplificado detallado anteriormente, se realizó una puesta a punto de la PCR anidada con el fin de aumentar la especificidad y sensibilidad del ensayo trabajando con diferentes volúmenes del producto de la RT. Se trabajó con la enzima FastStart DNA Polymerase (ROCHE®). Para ello 7.5 µL del producto de amplificación fue agregado a una mezcla conteniendo 5 µL de 10X PCR Buffer (c/MgCl₂), 1 µL de dNTPs 10mM, 1 µL de cada cebador interno (10 µM) (Tabla 3), 0.4 µL de enzima FastStart DNA Polymerase (5U/mL), y se completó con agua ultrapura libre de ARNasas y ADNasas (Amresco®) hasta un volumen final de 50 µL.

La PCR anidada se realizó en un termociclador Multigene (Labnet) bajo las siguientes condiciones:

- 1) 5 minutos a 95 °C.
- 2) 35 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, 1 minuto a 72 °C.
- 3) 10 minutos a 72 °C.

4) ∞ 15 °C.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen *pol* correspondiente a la proteasa del genoma VIH-2 (Pieniazek y cols., 1998).

	Cebadores	Secuencias 5' → 3'	Posición SIVmac239
1°Amplificación	DP20	GACAGAGGACTTGCTGCA	2537-2554
1°Amplificación	DP21	GGCCATTGTCTCAGTTTTGG	2925-2906
Amplificación anidada	DP26a	CACCTCAATTCTCTCTTTGGA	2553-2573
Amplificación anidada	DP27	TAGATTTAATGACATGCCTAA	2851-2831

4.3.3.2 Puesta a punto de las PCRs para VIH-2

La puesta a punto de los protocolos de amplificación se llevó a cabo trabajando con diferentes variables: volumen de muestra (extracto de ADN y producto de amplificación para PCR anidada), temperatura de hibridación de los cebadores y concentración de MgCl₂ (1,5 mM- 3,0 mM) en la mezcla de PCR. Se llevaron a cabo varias reacciones con diferentes condiciones hasta encontrar la más efectiva.

Se trabajó en un comienzo con el Kit de enzima comercial FastStart DNA Polymerase (ROCHE®) y luego se finalizó con el Kit comercial Taq DNA Polymerase Recombinant (ThermoScientific™)

A continuación se detallan los protocolos finales utilizados en la optimización de la PCR anidada:

FastStart DNA Polymerase (Roche)

REACTIVOS	X1 µL
Agua calidad biología molecular	29.1
10X PCR Buffer(c/MgCl ₂)	5
dNTPs Mix 10Mm	1
DP20 10 Mm	1
DP21 10 µM	1
Taq DNA pol 5U/MI	0.4
ADN (Extracto)	12.5

1er Ciclado

95°C	5 minutos	} 35 ciclos
94°C	30 segundos	
55°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minuto	
15°C	∞	

REACTIVOS	X1 μ L
Agua calidad biología molecular	31.6
10X PCR Buffer(c/MgCl ₂)	5
dNTPs Mix 10mM	1
DP26a 10 μ M	1
DP27 10 μ M	1
Taq DNA pol 5U/mL	0.4
Producto 1er Round	10

2do Ciclado

95°C	5 minutos	} 35 ciclos
94°C	30 segundos	
55°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minuto	
15°C	∞	

Taq DNA Polymerase (ThermoScientific)

REACTIVOS	X1 μ L
Agua calidad biología molecular	25.1
10X PCR Buffer(NH ₄) ₂ SO ₄	5
MgCl ₂ 25 mM	4
dNTPs Mix 10mM	1
DP20 10 μ M	1
DP21 10 μ M	1
Taq DNA pol 5U/mL	0.4
ADN (Extracto)	12.5

1er Ciclado

95°C	5 minutos	} 35 ciclos
94°C	30 segundos	
55°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minuto	
15°C	∞	

REACTIVOS	X1 μ L
Agua calidad biología molecular	32.6
10X PCR Buffer(NH ₄) ₂ SO ₄	5
MgCl ₂ 25 Mm	4
dNTPs Mix 10mM	1
DP20 10 Mm	1
DP21 10 Mm	1
Taq DNA pol 5U/mL	0.4
Producto 1er Round	5

2do Ciclado

95°C	5 minutos	} 35 ciclos
94°C	30 segundos	
55°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minuto	
15°C	∞	

4.3.4 Amplificación del gen *p17* de VIH-1

Con el fin de evidenciar posibles coinfecciones de VIH-1/VIH-2, se partió de los extractos de ADN obtenidos (correspondiente a las muestras clínicas y a controles positivos y negativos), realizando una PCR anidada de VIH-1 correspondiente al gen *p17*, posición 790-1184 nt de HXB2 (acceso en GenBank K03455) utilizando como control interno de la reacción un fragmento del gen *CCR5* celular mediante los cebadores p290 y p291 (Tabla 4).

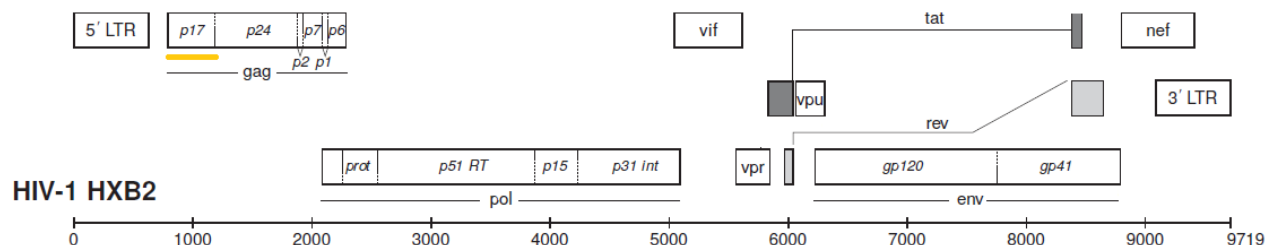


Figura 13. Esquema del genoma de VIH-1 con el fragmento estudiado . Posición nucleotídica en base a la secuencia de referencia **B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU_K03455**.

Dichas experiencias se realizaron usando la enzima FastStart DNA Polymerase (ROCHE®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello 10 µL del extracto de ADN fue agregado a una mezcla conteniendo 5 µL de 10X PCR Buffer(c/MgCl₂), 1 µL de dNTPs 10mM, 1 µL de cada cebador p290, p291, p170 y p174 todos ellos a una concentración de 100 ng/µL(Tabla 4), 0.4 µL de enzima FastStart DNA Polymerase (5U/mL) (ROCHE®), y se completó con agua ultrapura libre de ARNasas y ADNasas (Amresco®) hasta un volumen final de 50 µL.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Multigene bajo las siguientes condiciones:

- 1) 2 minutos a 95°C.
- 2) 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56.5°C, 1 minuto a 72°C.
- 3) 10 minutos a 72 °C.
- 4) ∞ 15 °C.

Se realizó una segunda ronda de amplificación con el fin de aumentar la especificidad y sensibilidad de la PCR. Para ello 5 µL del producto de amplificación de la primera ronda fue agregado a una mezcla conteniendo 5 µL de 10X PCR Buffer (c/MgCl₂), 1 µL de

dNTPs 10mM, 1 μ L de cada cebador p171 y p173, ambos a una concentración de 100ng/ μ L (Tabla 4), 0.4 μ L de enzima FastStart DNA Polymerase (5U/mL) (ROCHE®) y se completó con agua ultrapura libre de ARNasas y ADNasas (Amresco®) hasta un volumen final de 50 μ L.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Multigene en las siguientes condiciones:

1) 5 minutos a 94°C.

2) 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C.

3) 10 minutos a 72 °C.

4) ∞ a 15°C.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación del gen *p17* del genoma de VIH-1 (Korber y cols., 2014) y cebadores para amplificar el gen *CCR5* de linfocitos humanos.

Fragmento	Nombre	Secuencias 5' → 3'	
CCR5 (1°Amplific)	p290	ACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCT	
CCR5(1°Amplific)	p291	CATGATGGTGAAGATAAGCCTCACA	
Fragmento <i>gag</i> de VIH-1	Nombre	Secuencias 5' → 3'	Posición HXB2
p17 (1°Amplific.)	p170	TCTCTAGCAGTGGCGCCCAACAGGGAC	623-653
p17 (1°Amplific.)	p174	TCTATCCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGAT	1431-1402
p17 (Amplific. anidada.)	p171	TTTGACTAGCGGAGGCTAGA	760-779
P17 (Amplific. anidada)	p173	GGTGATATGGCCTGATGTACCATTGCCCCTG	1235-1204

4.3.5 Electroforesis

Los amplicones resultantes fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% en buffer TBE 0.5%, utilizando GelRed™ (Olerup SSP AB, Sweden) como intercalador de ADN. Se sembraron en cada pocillo 10 µL de cada producto de amplificación con 2 µL de buffer de carga 6x Orange DNA LoadingDye (ThermoScientific), acompañado de un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder). La visualización de los productos fue realizada en un transiluminador bajo luz ultravioleta (UV).

4.3.6 Purificación de amplicones

Una vez obtenidos los amplicones del tamaño esperado (298 pb al fragmento de la proteasa de VIH-2; 200pb (correspondiente al gen *CCR5 humano*) y 475 pb (correspondiente al gen *p17* de VIH-1), se procedió a la purificación de los productos de PCR (*p17* de VIH-1 y *pr* de VIH-2), con el fin de eliminar los restos de cebadores, dNTPs y sales que pudieran interferir en la secuenciación nucleotídica. Cuando se visualizaron bandas inespecíficas las muestras fueron purificadas a partir del gel de agarosa mediante el Kit comercial PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen™). Por otra parte, cuando el gel no presentaba bandas inespecíficas, las muestras fueron purificadas directamente utilizando el kit comercial PureLink® Quick PCR Purification (Invitrogen™) siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante.

4.3.7 Secuenciación

Los productos purificados fueron secuenciados en la empresa MacroGen en un secuenciador Applied Biosystems 3730XL (empresa Humanizing Genomics MacroGen). Todos los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones, utilizando los cebadores de segunda ronda de la PCR anidada, tanto para VIH-2 como para VIH-1.

Los electroferogramas obtenidos fueron revisados y editados utilizando el programa SeqMan de Lasergene (DNASTAR, Inc, Madison, WI, USA). Luego de la edición, dichas secuencias fueron analizadas con BLAST GenBank (Benson y cols., 2012) y HIV Databases (HIV Databases, 2018). Las secuencias obtenidas fueron nombradas con el prefijo UY seguida por el año de toma de la muestra y el número identificador de ésta.

4.3.8 Análisis filogenético

Las secuencias nucleotídicas de VIH-2 obtenidas mediante la edición con el programa SeqMan (DNASTAR, Inc, Madison, WI, USA), fueron alineadas, y se analizaron filogenéticamente utilizando el programa MEGA 6 (Tamura y cols., 2013) por métodos basados en distancia, calculadas según el algoritmo de Kimura dos parámetros. Se generaron árboles filogenéticos utilizando el algoritmo del “vecino más próximo” (neighbor-joining en inglés), el apoyo relativo de los nodos fue estimado realizando 1000 pseudoréplicas de bootstraps, considerando significativos los valores por encima de 70%.

5.RESULTADOS

5.1 Resultados serológicos

Serológicamente se analizaron muestras clínicas ingresadas en el laboratorio dentro del periodo comprendido 2012-2017, las cuales presentaron en el WB VIH1/2 patrones de bandas que manifiestan solo presencia de anticuerpos contra la proteína de la envoltura gp36 para VIH-2 y/o algunas bandas de VIH-1 tal como se indica en la Figura 14.

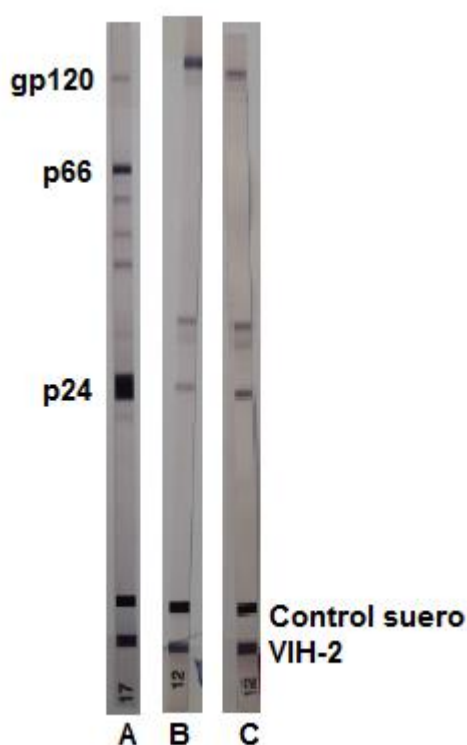


Figura 14. Patrones de bandas WB VIH 1/2 de anticuerpos presentes en las muestras analizadas que presentan banda VIH-2 reactiva. A) Muestra 12/1645; B) Muestra 17/77521A; C) Muestra 17/1253.

Se seleccionaron 22 muestras para continuar el análisis de confirmación por VIH-2. El 100% de las muestras analizadas presentaron serología positiva por WB VIH-2, una vez analizadas estas muestras se clasificaron en 8 patrones distintos de WB VIH-2 correspondiente a la presencia de anticuerpos contra proteínas de la envoltura, cápside y de la polimerasa, detectando así, diferentes perfiles de muestras (Figura 15) (Tabla 5).

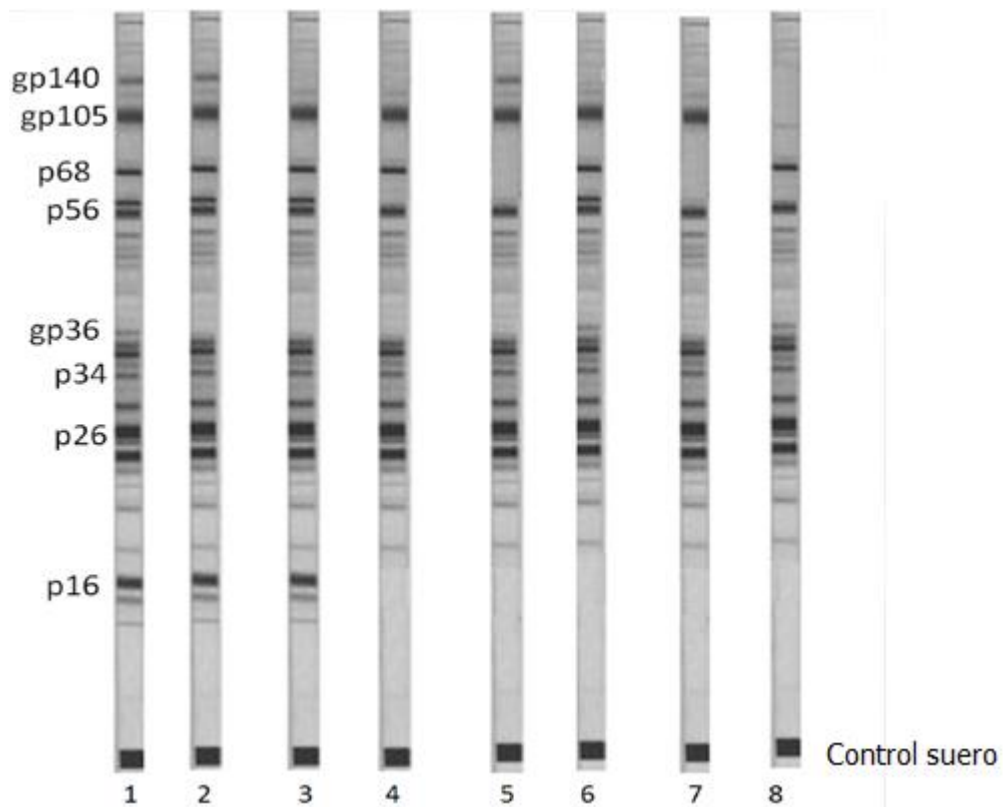


Figura 15. Patrones de bandas WB específico VIH-2 de anticuerpos presentes en las muestras analizadas. En forma vertical se indican las posiciones de las proteínas (p) y glicoproteínas (gp) en las tiras de nitrocelulosa. La numeración inferior (1 a 8) corresponde a los diferentes patrones hallados en las tiras, que se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las bandas observadas en el WB VIH-2. Patrón definido en figura 15 e ID (año de toma de muestra /nº muestra)

Bandas de proteínas en WB VIH-2									
PATRON	p16	p26	p34	gp36	p56	p68	gp105	gp140	ID
1	X	X	X	X	X	X	X	X	17/77521A
	X	X	X	X	X	X	X	X	17/1127
	X	X	X	X	X	X	X	X	17/888
	X	X	X	X	X	X	X	X	16/004
	X	X	X	X	X	X	X	X	15/6941
	X	X	X	X	X	X	X	X	14/1149
	X	X	X	X	X	X	X	X	14/187
	X	X	X	X	X	X	X	X	12/6077
2	X	X	X		X	X	X	X	17/1253
	X	X	X		X	X	X	X	15/211
3	X	X	X		X	X	X		13/1645
	X	X	X		X	X	X		13/136
	X	X	X		X	X	X		13/79
	X	X	X		X	X	X		12/1712
	X	X	X		X	X	X		12/1645
4		X	X			X	X		13/455
		X	X			X	X		13/414
5		X	X				X	X	12/1547
6		X	X	X	X	X	X		12/1606
7		X	X					X	16/920
		X	X					X	12/1636
8		X	X	X		X			13/252

Los porcentajes obtenidos en el diagnóstico de VIH-2 entre los años 2015-2017 son los presentados en la tabla 6; de 2974 muestras analizadas surge un porcentaje de 0.27% de VIH-2, teniendo en cuenta que no se obtuvo acceso a datos de años anteriores (2012-2014).

Tabla 6. Diagnóstico serológico de VIH-2, de acuerdo a las siguientes variables: Año de toma de muestra, N° total de muestras analizadas serológicamente, muestras VIH-2 positivas, % de muestras positivas VIH-2.

Año de la muestra	N° total de muestras	VIH-2 positivos	%
2015	955	2	0.20
2016	996	2	0.20
2017	1023	4	0.39

5.2 Resultados moleculares

5.2.1 Amplificación de un fragmento del gen *pol* correspondiente a la proteasa de VIH-2 por RT-PCR Anidada

Solo se logró amplificar tres extractos de ARN a través de una RT-PCR anidada de un fragmento del gen *pol* (Posición 2553-2831 en SIVMAC239) de las 22 muestras analizadas con serología positiva VIH-2 (datos no mostrados).

5.2.2 Amplificación de un fragmento del gen *pol* correspondiente a la proteasa de VIH-2 por PCR Anidada

Siete de las veintidós muestras tuvieron las condiciones adecuadas para ser amplificadas desde ADN proviral, presentando todas una confirmación molecular por VIH-2 mediante una PCR anidada amplificando un fragmento del gen *pol* correspondiente a la proteasa (Posición 2553-2831 en SIVmac239) utilizando dos tipos de enzimas FastStart DNA Polymerase (Roche®) y Taq DNA Polymerase (ThermoScientific™). En ambos casos se visualizaron bandas de 298 pb y bandas inespecíficas de acuerdo a la figura 16.

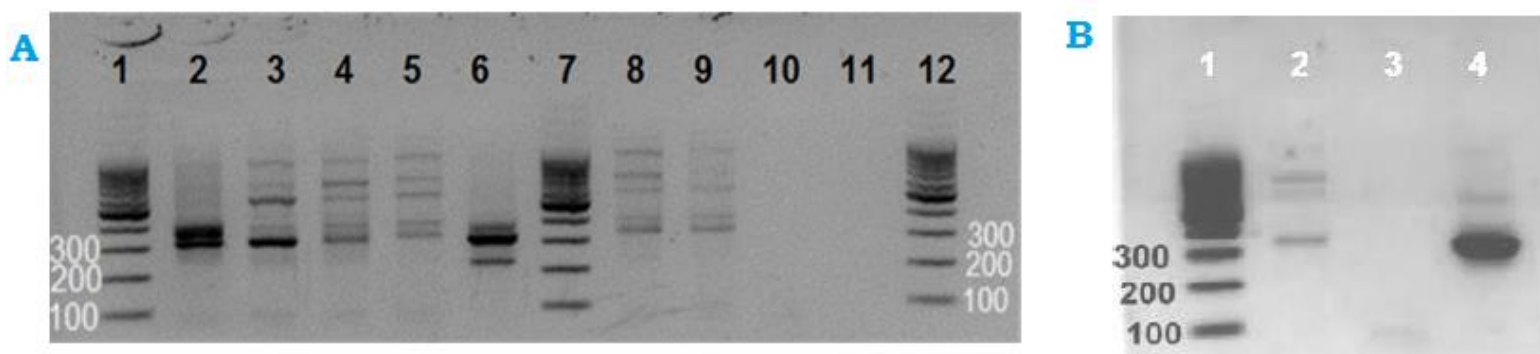


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 0.5% con intercalador GelRed™ de los productos de PCR amplificados. **A)** utilizando la enzima FastStart DNA Polymerase (Roche®). **Carril 1:** Marcador de peso molecular 100pb; **Carril 2:** Control positivo VIH-2 ; **Carril 3:** Muestra 17/77521A; **Carril 4:** Muestra 15/6941; **Carril 5:** Muestra 13/455; **Carril 6:** Muestra 12/6077; **Carril 7:** Marcador de peso molecular 100pb; **Carril 8:** Muestra 16/004; **Carril 9:** Muestra 12/1645; **Carril 10:** Control negativo (C-) primer ciclado; **Carril 11:** Control negativo (C-) segundo ciclado; **Carril 12:** Marcador de peso molecular 100pb. **B)** utilizando la enzima Taq DNA Polymerase (ThermoScientific™) **Carril 1:** Marcador de peso molecular 100pb; **Carril 2:** Muestra 17/1253; **Carril 3:** Control negativo (C-); **Carril 4:** Control positivo (C+).

5.2.3 Amplificación del gen *p17* de VIH-1

Se realizó la amplificación por PCR anidada para el gen *p17* de *VIH-1* a las siete muestras que fueron amplificadas para VIH-2.

De acuerdo a este análisis solo una muestra (12/1645) resultó positiva para VIH-1 (Figura 17 B), revelando una coinfección VIH-1/VIH-2.

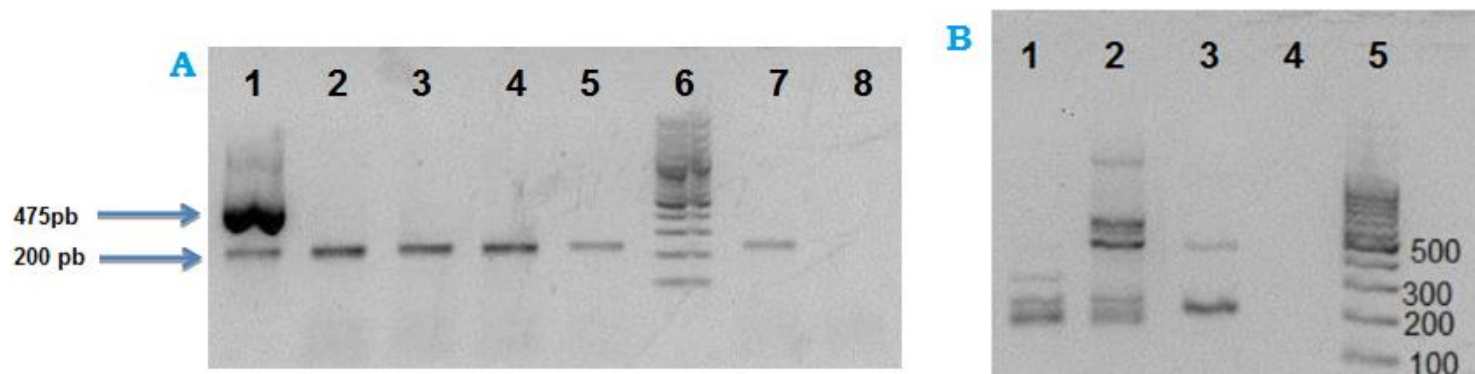


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 0.5%, con intercalador GelRed™ de los productos de PCR amplificados, observándose bandas de un tamaño de 200pb pertenecientes al control interno *CCR5* y 475 pb del gen *p17*. **A)** Carril 1: Control positivo (C+); Carril 2: Muestra 17/77521A; Carril 3: 17/1253; Carril 4: Muestra 15/6941; Carril 5: Muestra 12/6077; Carril 6: Marcador de peso molecular 100pb; Carril 7: 13/455; Carril 8: Control negativo (C-). **B)** Carril 1: Muestra 16/001; Carril 2: Muestra 12/1645; Carril 3: Control positivo; Carril 4: Control negativo (C-); Carril 5: Marcador de peso molecular 100pb.

5.2.4 Análisis bioinformático

Con los productos de PCR se procedió a la purificación de los mismos de acuerdo a lo detallado en materiales y métodos. Cuatro muestras tuvieron las condiciones adecuadas para ser secuenciadas por VIH-2 y una para VIH-1 (la única que resultó ser amplificada) Tabla 7.

De los electroferogramas obtenidos en la secuenciación, se obtuvo una secuencia consenso para cada una de las muestras antes mencionadas.

A través del análisis de las secuencias obtenidas por medio del programa de alineamiento de HIV Databases (HIV Databases, 2018), se pudo determinar que la muestra UY 12/1645 pertenece al subtipo B de VIH-1 (Figura 18). De este análisis bioinformático se

determinó una identidad nucleotídica cercana al 94% con cepas de origen brasilero, estadounidense y español, demostrando así, que nos encontramos en presencia de dicho virus.

Query: UY_12_1645

Download sequences fasta Align

NCBI Blast Result Geography

	Número de acceso	Subtipo	Pais	Año	Descripción	Score	Identidad	Ubicación del mach en el genoma
<input checked="" type="checkbox"/>	EF637051	BREPM1032	B	BR	2003 HIV-1 isolate BREPM1032 from Brazil, complete genome	457	5e-127 338/359 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	KF701874	gag264	B	US	1984 HIV-1 isolate gag264 from USA gag protein gene, complete cds	454	4e-126 336/357 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	KF701872	gag255	B	US	1981 HIV-1 isolate gag255 from USA gag protein gene, complete cds	454	4e-126 336/357 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	FJ469728	F706	B	US	2002 HIV-1 isolate F706 from USA gag protein (gag) gene, complete cds; pol protein (pol) gene, partial cds; and envelope glycoprotein (env) and nef protein (nef) genes, complete cds	454	4e-126 336/357 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	JQ846222	82	B	ES	1993 HIV-1 isolate 82 from Spain gag protein (gag) gene, complete cds; and pol protein (pol) gene, partial cds	450	9e-125 335/357 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	KF701800	gag172	B	US	1988 HIV-1 isolate gag172 from USA gag protein gene, complete cds	450	9e-125 335/357 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	KT427783	10BR_RJ025	B	BR	2010 UNVERIFIED: HIV-1 isolate 10BR_RJ025 from Brazil genomic sequence	450	9e-125 335/357 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	KF701721	gag85	B	US	1987 HIV-1 isolate gag85 from USA gag protein gene, complete cds	450	9e-125 334/357 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	U68511	p2_135_1987	B	SE	1986 HIV-1 sample 135 patient 2 from Sweden matrix protein (gag) gene, p17 region, partial cds	450	9e-125 335/357 (94%)	
<input checked="" type="checkbox"/>	KF701650	gag8	B	US	1985 HIV-1 isolate gag8 from USA gag protein gene, complete cds	448	3e-124 334/357 (94%)	

Figura 18. Resultado del análisis bioinformático por medio de la herramienta HIV BLAST perteneciente a HIV Databases (HIV Databases, 2018). En ella se detalla el número de acceso, subtipo, país, año, descripción, score, identidad nucleotídica y ubicación del genoma, con respecto a la muestra UY 12/1645 pertenece al subtipo B de VIH-1.

5.2.5 Análisis Filogenético

Las secuencias consenso obtenidas se alinearon y analizaron filogenéticamente junto con secuencias estudiadas anteriormente en Uruguay (UY_03/323, UY_03/435, UY_03/140, UY_04/936, UY_04/936H2, UY_03/1443, UY 03/469) y secuencias de referencia de VIH-2 (Figura 19), disponible en la base de datos GenBank (Benson y cols., 2012) y HIV Databases (HIV Databases, 2018). De acuerdo a estos estudios las muestras UY12/6077, UY15/6941, UY16/004 y UY 17/77521A pertenecen al grupo A de VIH-2.

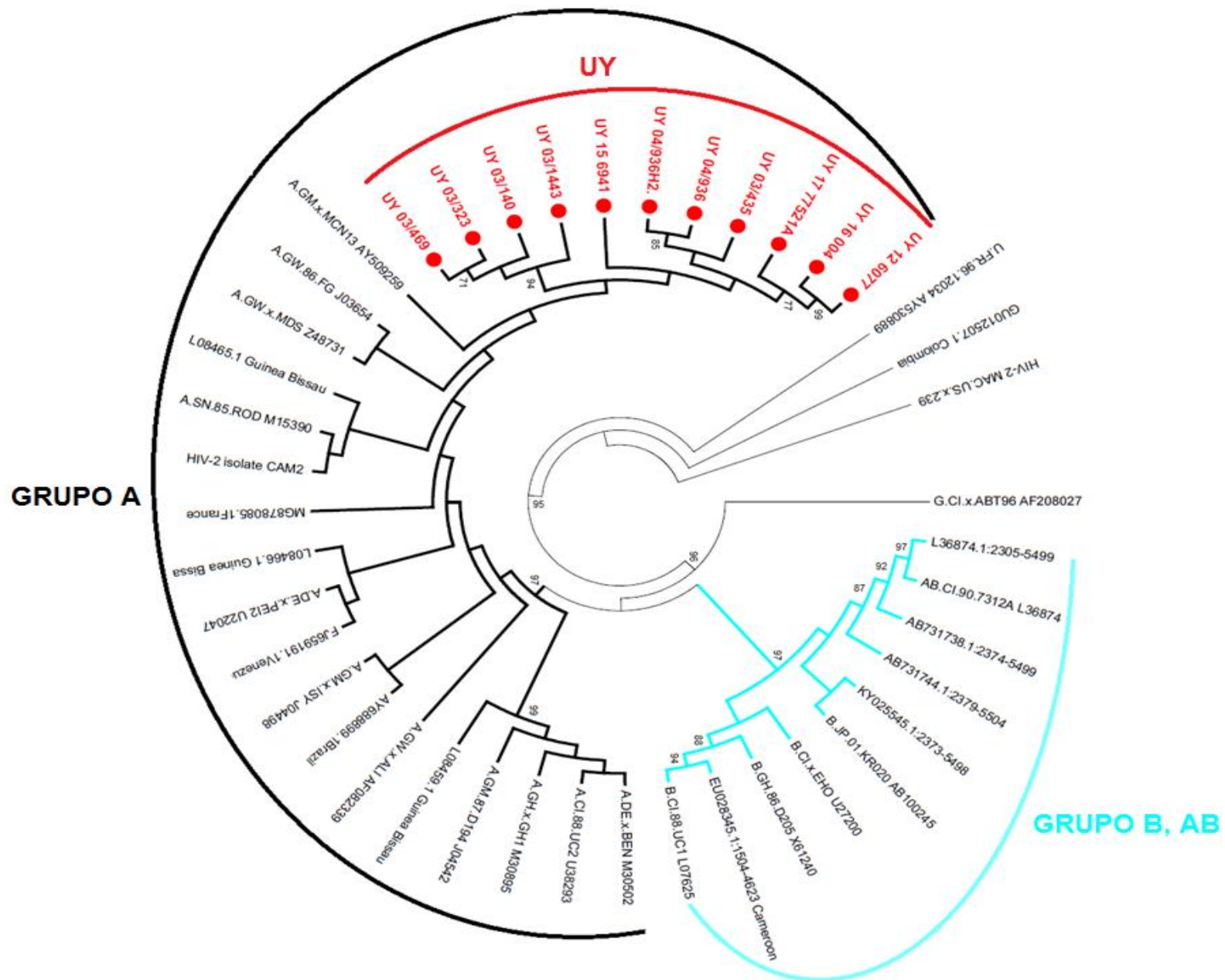


Figura 19. Árbol filogenético obtenido por método Neighbor-joining de las secuencias en la región del gen *pol* (298 nt) de VIH-2. El soporte estadístico se realizó mediante 1000 réplicas de Bootstrap, se indican los valores ≥ 70 . Las secuencias uruguayas se indican en rojo (UY año n° muestra) y las secuencias de referencia disponibles en la base de datos GenBank (Benson y cols., 2012) y HIV Databases (HIV Databases, 2018) se indican en color negro. Los corchetes indican los diferentes grupos de VIH-2.

Se presenta en la tabla 7 a modo de resumen, las técnicas y resultados obtenidos en el estudio realizado.

Tabla 7. Resultados de las muestras analizadas, de acuerdo a las siguientes variables: Patrón WB VIH-2 definidos en figura 15, ID (año de toma de muestra /nº muestra), PCR VIH-2, PCR VIH-1, Genotipo VIH-2 y Genotipo VIH-1. s/d: Sin dato.

PATRON WB VIH-2	ID	PCR VIH-2	PCR VIH-1	GENOTIPO VIH-2	GENOTIPO VIH-1
1	17/77521A	POSITIVO	NEGATIVO	A	s/d
	16/004				
	15/6941				
	12/6077				
	17/1127	s/d	s/d		
	17/888				
	14/1149				
	14/187				
2	17/1253	POSITIVO	NEGATIVO		
	15/211				
3	13/1645	s/d	s/d	s/d	
	13/136				
	13/79				
	12/1712				
	12/1645	POSITIVO	POSITIVO		B
4	13/455	POSITIVO	NEGATIVO		
	13/414				
5	12/1547				
6	12/1606	s/d	s/d		s/d
7	12/1636				
	16/920				
8	13/252				

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se planteó actualizar la información diagnóstica y circulación de grupos de VIH-2 en Uruguay durante los años 2012-2017.

El diagnóstico de la infección por VIH-2 requiere un manejo clínico diferente, específicamente con respecto a la elección de la terapia antirretroviral, para prevenir el fracaso del tratamiento y la progresión clínica de la enfermedad, además se suma el aporte en el conocimiento de cepas circulantes y en la epidemiología de este tipo de virus (Taylor et al., 2014).

En la década de los 90 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA sigla en inglés) validó el primer ensayo para el diagnóstico serológico del VIH-2 y el primer sistema combinado de VIH-1/2 permitiendo la detección simultánea de anticuerpos para ambos virus (Constantine, 2006).

Como antecedente en Uruguay, fueron reportados por el Laboratorio Nacional de Referencia VIH-SIDA del Ministerio de Salud Pública, 27 casos de VIH-2 en el período 1997-2005 (Ruchansky, 2009, 2011).

La propuesta de este estudio, nos llevó a definir un algoritmo específico para VIH-2. La técnica de WB VIH1/2, nos aproximó a un primer *screening* de los posibles casos de este tipo de virus (Figura 14). En base a los resultados obtenidos, se analizaron 22 muestras, que presentaban bandas correspondientes a anticuerpos contra proteínas de VIH-2, siendo este el punto de partida para la realización del WB específico para este tipo viral en nuestra población objetivo.

Las metodologías directas utilizadas, como la amplificación de ADN proviral por PCR anidada fue la más eficiente, los amplicones presentaron bandas con menos inespecificidad respecto a las otras técnicas utilizadas por biología molecular.

Por otra parte no se obtuvo buenos resultados de la amplificación de ARN viral por RT-PCR anidada, uno de los motivos, pudo deberse a que las muestras no estuvieron preservadas en condiciones óptimas para el mantenimiento del ARN, y/o podrían haber presentado cargas de ARN viral muy bajas en plasma, dificultando la obtención de un extracto de ARN apto para ser amplificado, no descartando la infección por VIH-2 (Gottlieb y cols., 2018).

La utilización de técnicas moleculares nos permiten una confirmación rápida de la infección dual por VIH-1 y VIH-2 en pacientes con serología positiva (Gottlieb y cols., 2018).

La presencia de una coinfección VIH-1/VIH-2 en un paciente uruguayo, coincide con los reportes a nivel internacional de casos en los cuales los dos tipos virales co-circulan en un mismo individuo. Esto acentúa la importancia del uso de metodologías diagnósticas que discriminen la infección por VIH-1 y VIH-2 (Cazals y cols., 2018).

Del total de las muestras amplificadas, la secuenciación fue exitosa sólo para cuatro, las cuales están referidas en el patrón 1 del WB VIH-2, que presentan anticuerpos contra todas las proteínas de la tira, (tabla 7). El resto de las muestras amplificadas no lograron concentraciones óptimas para su secuenciación, aunque sí fueron concluyentes respecto a la presencia de ADN proviral de VIH-2.

El estudio filogenético realizado, revela la presencia de dos clusters que incluyen las muestras analizadas en este trabajo, como las ya estudiadas anteriormente en Uruguay que corresponden al grupo A de VIH-2 (Figura 19).

La falta de acceso a los datos epidemiológicos e historia clínica de los pacientes estudiados, no nos permite completar el estudio de cómo ingresó y se diseminó el VIH-2 en nuestro país; pero podríamos estar frente a dos eventos distintos de ingreso del virus con una diseminación lenta a lo largo de los años estudiados (1999-2017).

La baja pero continua propagación del VIH-2 a áreas no endémicas requiere criterios diagnósticos precisos y confiables. Es por ello que este tipo de virus se lo debe considerar en los algoritmos de diagnóstico de infección por VIH (Cazals y cols., 2018; Taylor y cols., 2014).

Por lo tanto, la mejora de la vigilancia epidemiológica y los algoritmos diagnósticos, son necesarios para garantizar la confirmación de infección por VIH-1 / VIH-2 y lograr así lo planteado en la "meta 90-90-90" de ONUSIDA / OMS (90% de todas las personas que viven con VIH-2 conocerán su estado de VIH y el 90% de todos los pacientes con VIH-2 tratados con terapia antirretroviral tendrán supresión viral) (Taylor y cols., 2014; Gottlieb y cols., 2018).

7. CONCLUSIONES

- Se desarrollaron ensayos de diagnóstico para detectar VIH-2 en personas con serología reactiva a VIH 1/2, pudiendo discriminar VIH-1 del VIH-2.
- Se obtuvo la confirmación serológica por VIH-2 de veintidós pacientes, como también se evidenció un caso de coinfección VIH-1/VIH-2.
- La circulación de VIH-2 sigue manteniéndose en Uruguay (Ruchansky y cols., 2011) con casos serológicamente positivos, que al ser caracterizados molecularmente, confirman la presencia del grupo A.
- Se destaca en este trabajo la necesidad de seguir monitorizando la circulación de VIH-2 serológica y molecularmente, aportando a los perfiles de circulación de este virus, inicialmente originado en África occidental y del que se observa una lenta expansión al resto de los continentes.

8. PERSPECTIVAS

- Investigar y desarrollar la búsqueda de datos epidemiológicos de cada una de las muestras estudiadas, de las cuales hasta el momento no se ha podido tener acceso, para poder estudiar la introducción de este tipo viral en nuestro país y su diseminación.
- Desarrollar y optimizar una PCR a tiempo real que daría mayor sensibilidad al diagnóstico molecular, y en la cual se pudiera cuantificar la carga viral del VIH-2. Esto sería de suma importancia para el seguimiento del tratamiento de estos pacientes.
- Pruebas de resistencia para pacientes con VIH-2 que presentan fracaso al tratamiento.

9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcamí, J. y Coiras, M. (2011). Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(3), 216-226.
- Alford, J.E., Marongiu, M., Watkins, G.L. y Anderson, E.C. (2016). Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Gag Is Trafficked in an AP-3 and AP-5 Dependent Manner. *PloS one*, 11(7), 1-16.
- Arbiza, J. y Russi, J. (2002). *Virus al acecho*. Uruguay. Editorial Fin de Siglo.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., y cols.(1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at Risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., y cols. (2012) GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(1), D36–D42.
- Campbell-Yesufu, O.T. y Gandhi, R.T. (2011). Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical infectious diseases*, 52(6), 780-787.
- Cazals, N., Le Hingrat, Q., Abraham, B., Da Silva, P., Guindre, L., Goffart, S., y cols. (2018). HIV-2 Primary Infection in a French 69-Year-Old Bisexual Man. *Open forum infectious diseases*, 5(10), 1-4.
- Centers for Disease Control.(2001). *Revised Guidelines for HIV Counseling, Testing, and Referral and Revised Recommendations for HIV Screening of Pregnant Women*. Recuperado de <https://npin.cdc.gov/publication/revised-guidelines-hiv-counseling-testing-and-referral-and-revised-recommendations-hiv>

- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., y cols. (1986). Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343-346.
- Constantine (2006). *HIV Antibody Assays*. Recuperado de <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-02-01#S6X>
- De Silva, T.I., van Tienen, C., Onyango, C., Jabang, A., Vincent, T., Loeff, M.F., y cols (2013). Population dynamics of HIV-2 in rural West Africa: comparison with HIV-1 and on going transmission at the heart of the epidemic. *AIDS*, 27(1),125–134.
- Diaz, D.F., Ortiz, E., Martin, D., Nibot, C., Rizo, A., Silva, E. (2012). HIV-2 Antibody Detection after Indeterminate or Negative HIV-1 Western Blot in Cuba, 2005-2008. *Medicc Review*, 14(1), 25-29.
- Domingo, E., Menendez-Arias, L., Holland, J.J. (1997).RNA virus fitness. *Reviews in Medical Virology*, 7(2), 87-96.
- Domingo, E., Mas, A., Yuste, E., Pariente, N., Sierra, S., Gutierrez-Riva, M., y cols. (2001).Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Prog. Drug Res*, 57,77–115.
- Fiebig, E.W., Wright, D.J., Rawal, B.D., Garrett, P.E., Schumacher, R.T., Peddada, L., y cols. (2003) Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* ,17(13), 1871-1879.
- Fields, B.N., Knipe, D.M. y Howley, P.M. (2013). *Fields virology*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. Wolters Kluwer business.
- Flint, S.J., Racaniell, V.R., Rall, G.F., Skalka, A.M., Enquist, L.W (2015). *Principles of Virology*, 4th ed. Washington, DC : ASM.

- Foley, B.T., Leitner, T., Apetrei, C., Hahn, B., Mizrahi, I., Mullins, J., y cols. (2018) *HIV Sequence Compendium 2018*. Recuperado de <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2018/sequence2018.pdf>
- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., y cols. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 865-867.
- Gottlieb, G.S., Raugi, D.N. y Smith, R.A. (2018). 90-90-90 for HIV-2? Ending the HIV-2 epidemic by enhancing care and clinical management of patients infected with HIV-2. *The Lancet HIV*, 5(7) 390-399.
- Harrison's Principles of Internal Medicine (2015). *Human Immunodeficiency Virus Disease: AIDS and Related Disorders*. Recuperado de <https://clinicalgate.com/human-immunodeficiency-virus-disease-aids-and-related-disorders/>
- HIV Database (10 de diciembre de 2018). Recuperado de <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>
- INFOSIDA 2019 (24 de febrero de 2019). Recuperado de <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/medicamentos-contra-el-vih-autorizados-por-la-fda>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (Online (10th) Report) (20 de febrero de 2019). Recuperado de <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Kannangai, R., David, S. y Sridharan, G. (2012). Human immunodeficiency virus type-2- A milder, kinder virus: An update. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30(1),6-15.
- Korber, B.T., Foley, B.T., Kuiken, C.L., Pillai, S.K., Sodroski, J.G. (2014). Numbering Positions in HIV Relative to HXB2CG.HIV sequence data base. Recuperado de <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/HXB2.html>

- MacNeil, A., Sankalé, J.L., Meloni, S.T., Sarr, A.D., Mboup, S. y Kanki, P. (2007). Long-Term Inpatient Viral Evolution during HIV-2 Infection. *The Journal of infectious Diseases*, 195(5), 726-733.
- Maueia, C., Costa, D., Meggi, B., Ismael, N., Walle, C., Curvo, R., y cols. (2011). Frequency of human immunodeficiency virus type-2 in hiv infected patients in Maputo City, Mozambique. *Virology journal*, 8(1),1-7.
- Martinez-Steele, E., Awasana, A.A., Corrah, T., Sabally, S., van der Sande, M., Jaye, A., y cols. (2007). Is HIV-2- induced AIDS different from HIV-1- associated AIDS ? Data from a West African clinic. *AIDS*, 21(3), 317–324.
- Ministerio de Salud Pública [MSP] (2016). *Pautas de atención a personas con VIH en el primer nivel de atención*. Recuperado de <http://www.mysu.org.uy/wp-content/uploads/2016/10/2016-Pautas-de-atencion-a-personas-con-VIH-en-el-primer-nivel-de-atencio%CC%81n.pdf>
- Ministerio de Salud Pública [MSP] (27 de diciembre de 2018). *Boletín epidemiológico VIH/SIDA*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/boletin-epidemiologico-vihsida-diciembre-2018>
- Nikolopoulos, G.K., Kostaki, E.G. y Paraskevis, D. (2016). Overview of HIV molecular epidemiology among people who inject drugs in Europe and Asia. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 256-268.
- Nsagha, D.S., Njunda, A.L., Kamga, H.L., Assob, J.C. y Bongkem, E A. (2012). HIV-1/HIV-2 co-infection among voluntary counselling and testing subjects at a regional hospital in Cameroon. *African health sciences*, 12(3), 276-281.
- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K., Macallan, D. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection : Lessonsfor viral immunopathogenesis. *Reviews in Medical Virology*, 23(4), 221-40

- Organización Mundial de la Salud [OMS] (20 de diciembre de 2018). Recuperado de https://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/prevalence/en/
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M. y Ho D.D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271(5255), 1582-1586.
- Pieniazek, D., Baggs, J., Hu, D.J., Matar, G.M., Abdelnoor, A.M., Mokhbat, J., y cols. (1998). Introduction of HIV-2 and multiple HIV-1 subtypes to Lebanon. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 649-656.
- Programa adjunto de naciones unidas [ONUSIDA] (20 de febrero de 2019). Recuperado de <http://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>
- Reeves, J.D. y Doms, R.W (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *Journal of General Virology*, 83, 1253–1265.
- Rosas, N., Hernandez, P., Najar, I., Guzman, C. y Castañeda, D. (2013). Características estructurales y funcionales del Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Enfermedades Infecciosas Microbiología*, (33)4, 163-173.
- Ruchansky, D. (2009). *Variabilidad Genética del Virus de Inmunodeficiencia Humana en Uruguay* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias- Universidad de la República.
- Ruchansky, D., Somma, S., Brasso, S., Chiparelli, H., Henry, S., Russi, J.C. (2011). Evidencias Serológicas y Moleculares de Infección por el Virus de inmunodeficiencia Humana Tipo 2 en Uruguay. Trabajo presentado en el *X Congreso Argentino de Virología*, Buenos Aires, Argentina.
- Ruchansky, D. (2016). *Retrovirus. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)*. Recuperado de <http://eva.fmed.edu.uy/mod/folder/view.php?id=47507>

- Sharp, P.M. y Hahn, B.H. (2010). The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological sciences*, 365(1552), 2487-2494.
- Sharp, P.M. y Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), 1-22.
- Shaw, G.M. y Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11), 1-23.
- Simon, V., Ho, D.D. y Abdool Karim, Q. (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, 368(9534), 489-504.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetic sAnalysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Taylor, N., Kern, JM., Prammer, W., Lang, A., Haas, B., Gisinger, M., y cols. (2014). Human immunodeficiency virus type 2 infections in Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 126(7-8), 212-216.
- Tyagi, M. y Bukrinsky, M. (2012). Human immunodeficiency virus (HIV) latency: the major hurdle in HIV eradication. *Molecular medicine*, 18(1), 1096-1108.
- ViralZone (10 de marzo de 2019). Recuperado de <https://viralzone.expasy.org/5182>
- Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., Charpentier, C. (2016). HIV-2 molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*; 46, 233-240.

10. AGRADECIMIENTOS

A los Drs. Juan Arbiza y Santiago Mirazo quienes a través de sus enseñanzas marcaron mi orientación hacia la virología en los comienzos de la carrera.

Al MSP por haberme aceptado para realizar mi tesina de grado, en particular a mi tutora Dora por estar bajo su dirección, por su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas, ha sido un aporte invaluable para la tesis y para mi formación como investigadora.

A Natalia, por estar siempre dispuesta a ayudar y aportar ideas.

A Silvana, Rosina y Mariate por esos mates a las 7:00 de la mañana, generando un lindo ambiente de trabajo, tanto académico como en lo personal, llevándome un recuerdo y afecto de lindas personas que es lo más importante.

A mis amigos por su apoyo incondicional y comprensión durante todo este proceso de formación.

A mis compañeros de trabajo, por haberme acompañado en esta última etapa de la tesina y estar siempre dispuestos a ayudarme.

A mi familia por siempre estar, especialmente a vos ma, que estás en todo. Los amo!!!