

Caracterización de cepas cubanas de VIH-1 por ensayos biológicos y métodos bioinformáticos

Characterization of Cuban strains of HIV-1 by bioassays and bio-information methods

Leonor Lobaina Barthelemy^I; Liuber Yans Machado Zaldívar^{II}; Enrique Noa Romero^{III}; Madeline Blanco de Armas^{IV}; Leonor Navea Leyva^V; Marta Dubed Echevarría^{VI}; Héctor M. Díaz Torres^{VII}; Felipe Rolo Gómez^V

^IDoctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Laboratorios de Investigaciones del SIDA. San José de las Lajas. Cuba.

^{II}Licenciado en Bioquímica. Aspirante a Investigador. Laboratorios de Investigaciones del SIDA. San José de las Lajas, Cuba.

^{III}Máster en Microbiología. Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar. Laboratorios de Investigaciones del SIDA. San José de las Lajas, Cuba.

^{IV}Licenciada en Bioquímica. Investigador Agregado. Laboratorios de Investigaciones del SIDA. San José de las Lajas, Cuba.

^VEspecialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Laboratorios de Investigaciones del SIDA. San José de las Lajas, Cuba.

^{VI}Máster en Virología. Licenciada en Biología. Investigador Auxiliar. Laboratorios de Investigaciones del SIDA. San José de las Lajas, Cuba.

^{VII}Máster en Infectología. Especialista I Grado en Medicina Interna. Investigador Auxiliar. Laboratorios de Investigaciones del SIDA. San José de las Lajas, Cuba.

RESUMEN

Mediante ensayos biológicos clásicos se ha podido determinar el uso del correceptor por las cepas de VIH-1, las cuales se han clasificado en R5, X4 o R5/X4, características que guardan relación con el fenotipo NIS o IS y con la evolución clínica. Por métodos bioinformáticos se han relacionado cambios aminoacídicos en la región del lazo V3 del *env* con el uso del correceptor. En este trabajo se presentan los resultados del estudio de caracterización de once cepas provenientes de individuos infectados con VIH-1, cinco de ellos seropositivos asintomáticos y seis progresores rápidos al SIDA. Se compararon los resultados del estudio fenotípico realizado por dos ensayos biológicos clásicos, uso de correceptores y capacidad de inducir sincicios en MT2 y tres métodos bioinformáticos, regla 11/25, matrices de puntos en posiciones específicas (PSSM) y el programa geno2pheno. Las cinco cepas de seropositivos asintomáticos coincidieron por todos los métodos como R5/NIS. Cinco de las seis cepas de progresores rápidos se clasificaron R5/X4 e IS por los ensayos biológicos; mientras dos clasificaron R5/X4 por Geno 2 Pheno, una

por PSSM y todas fueron X4 puras por la regla 11/25. Los ensayos utilizados en el estudio permitieron caracterizar las cepas aisladas y relacionar el fenotipo con la evolución de la infección, por lo que valoramos que por ensayos biológicos o métodos bioinformáticas se pueden hacer estudios de caracterización, su utilidad está en dependencia del objetivo que se persiga.

Palabras clave: VIH, Fenotipo viral, correceptores, ensayos biológicos, herramientas bioinformáticas.

ABSTRACT

By the classic biological assays it has been possible to determine the use of HIV-1 strains co-receptor, which have been classified in R5, X4 or R5/X4, characteristic related to the NIS or IS phenotype and to the clinical course. By bio-information methods the amino acid changes in the region of V3 loop of the *env* using the co-receptor. In present paper are showed the results of a characterization study of eleven strains from HIV-1 infected subjects, five seropositive and six with a fast progression to AIDS. Authors compared the results of phenotype study conducted by two classic assays, use of co-receptors and ability to induce syncytia in MT2 and three bio-information methods, rule 11/25, point matrices in specific locations (PSSM) and the geno2pheno program. The five strains from asymptomatic seropositive patients coincided according all methods used as R5/NIS. Five of the six strains from fast progression patients were classified as R5/X4 and IS by biological assays; whereas two were classified as R5/X4 by Geno 2 Pheno, one by PSSM and all were pure X4 by the rule 11/25. The assays used in the study allowed us to characterize the isolated strains and to relate the phenotype to the infection course, thus, we considered that using biological assays or bio-information methods it is possible to conduct characterization studies, its usefulness depends on the pursued objectives.

Key words: HIV, viral phenotype, co-receptors, biological assays, bio-information tools.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los receptores de quimioquina permitió revelar la base fisiológica de la variabilidad biológica del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la cual está determinada por el uso diferencial de los correceptores mayores, CCR5 y CXCR4, para infectar las células que expresan la molécula principal CD4. Como resultado de este descubrimiento, se diseñó un nuevo sistema de clasificación de las cepas que permite distinguir tres tipos de fenotipos: R5 (virus que solo usan el correceptor CCR5), X4 (variantes que solo utilizan el receptor CXCR4) y R5/X4 o «duales» (virus que utilizan ambos receptores).¹⁻³

Mediante un ensayo biológico clásico se ha podido determinar el uso del correceptor por los aislamientos primarios y los resultados de estos estudios fenotípicos se han relacionado con la evolución clínica de los individuos.⁴

Con el desarrollo de antagonistas de los correceptores que pueden ser utilizados con fines terapéuticos, se hizo necesario buscar otros métodos de ensayos fenotípicos, menos caros y laboriosos, que permitan hacer una valoración exacta y confiable del uso del correceptor, previo al uso de estos antagonistas y en su monitoreo. De esta forma surgieron los ensayos recombinantes (Trofile™ Monogram Biociences, Phenoscript™ HIV-1 Entry Inhibitor, Phen XR™ and Xtrack™ in Pheno y Virco Type HIV in Virco).⁴⁻⁷

Se ha progresado en la predicción del fenotipo y su rapidez, utilizando otros métodos que están basados en el análisis de las secuencias mediante herramientas bioinformáticas que permiten determinar los cambios aminoacídicos, fundamentalmente en la región del lazo V3 del *env*, los cuales se han relacionado con el uso del correceptor. El método genotípico más simple, denominado "regla 11/25" o "regla de la carga", permite clasificar un virus como X4 si los residuos de aminoácidos en las posiciones 11 y/o 25 están cargados positivamente, o R5 si la carga del aminoácido es negativa o neutra. Otros métodos genotípicos que también pueden predecir el fenotipo del correceptor basado en herramientas bioinformáticas son la red neural (en inglés *neural work*), matrices de puntos en posiciones específicas (por sus siglas en inglés PSSM), SVM (en inglés *support vector machines*) y el análisis de la estructura molecular de la gp120.^{5,8-12}

Varios estudios de sensibilidad y especificidad de estos métodos genotípicos se han realizado y los resultados se han relacionado con los cambios del uso del correceptor en estudios evolutivos, en los cuales se ha observado que el cambio mutacional precede al fenotípico, es por esto que se ha planteado que su utilidad está dada por el valor pronóstico que puede tener.^{4,8} Pero tanto los ensayos fenotípicos (biológicos o recombinantes) como genotípicos son retados cuando se aplican a datos de secuencias heterogéneas de muestras clínicas. Bajo estas circunstancias se determinó el fenotipo de 11 cepas aisladas de individuos, con diferentes estadios de la infección, por 2 ensayos biológicos clásicos y análisis de secuencia aplicando 2 métodos bioinformáticos.

MÉTODOS

Muestras

En el estudio se incluyeron los aislamientos primarios de 11 individuos cubanos infectados con VIH-1. De ellos 5 seropositivos asintomáticos (SA) y 6 pacientes con SIDA que evolucionaron en un período de 2 a 3 años (ER).

Ensayo biológico clásico

Los aislamientos primarios se cocultivaron con células U87.CD4 que tienen trasfectados los correceptores CCR5 y CXCR4. Los cultivos se mantuvieron en medio Dulbecco's modificado Eagle's con alto contenido de glucosa y sin piruvato (DMEM, Gibco), suplementado con 15 % de suero fetal bovino (Gibco), 10 U/mL penicilina y 10 mg/mL de estreptomina (Gibco). Las células se observaron diariamente al microscopio invertido para determinar la aparición de ECP y se determinó la infectividad por sistema inmunoenzimático de fase sólida (ELISA) DAVIH Ag p24 (Laboratorios DAVIH, Cuba). Se utilizaron como controles el aislamiento VIH-1 MN adaptado al cultivo en el laboratorio.

El fenotipo inductor de sincicios (IS) se evaluó por el micrométodo estandarizado y formularizado por el ACTG Virology Committee¹³ utilizando la línea celular MT2. Se clasificaron los virus en IS o no inductores de sincicios (NIS).

Estudio genotípico

Se extrajo el ADN de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas de los individuos infectados y se amplificó mediante la reacción en cadena a la polimerasa (RCP), para la cual se emplearon diferentes juegos de oligonucleótidos cebadores específicos para el gen de la envoltura, en particular la región que codifica para el lazo V3, secuencias que han sido utilizadas con anterioridad para trabajos de caracterización del VIH.

Los productos de amplificación por la RCP, se purificaron por columnas de Sephaglas Band Prep. Kit de Pharmacia y posteriormente una alícuota de cada producto se utilizó para montar directamente las reacciones de secuenciación, para lo cual se utilizaron los estuches de Gibco BRL y de Applied Biosystem, el clonaje se realizó en un vector T utilizando un estuche de Amersham. La lectura e interpretación de las secuencias se realizó automáticamente en un equipo de Applied Biosystem.

El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Vector NTI Suite 7.

Métodos bioinformáticos

La predicción genotípica del uso del correceptor se hizo del análisis de las secuencias del lazo V3 de la envoltura del virus, para lo cual se aplicaron 3 métodos bioinformáticos conocidos:

- 1) La regla 11/25 que utiliza el programa WebLogos (<http://www.bio.cam.ac.uk/cgi-bin/seqlogo/logo.cgi>) para determinar la existencia de los aminoácidos lisina o arginina, cargados positivamente, en esas posiciones. Las cepas con carga positiva se clasificaron como X4.
- 2) El predictor genotípico de matrices de puntos en posiciones específicas (en inglés PSSM), que emplea las matrices X4R5 y SINSIN (WebPSSM) (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>).
- 3) El programa geno2pheno correceptor (<http://creceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi/bincreceptor.pl>) para el cual se escogió como valor de corte una proporción de falsos-positivos normal de 0.10.

RESULTADOS

La determinación del fenotipo, por ensayo biológico clásico, de las 11 cepas primarias incluidas en el estudio se presenta en la tabla 1; en ella se puede observar que 5 de los aislamientos solo se multiplicaron en la línea celular U87. CD4 que tenía trasfectado el correceptor CCR5, por lo que estos virus se clasificaron R5. Los 6 aislamientos provenientes de individuos con ER al SIDA se multiplicaron en las células U87. CD4 con CXCR4, pero 5 lo hicieron además en la línea celular U87. CD4 CCR5, por lo que se clasificaron R5X4 o duales; solo 1 cepa, la CU091 se consideró como X4 pura.

Las cepas clasificadas R5 no se replicaron en la línea celular MT2 por lo que se clasificaron como virus NIS, mientras que todos los aislamientos caracterizados como duales o la cepa X4 pura, se multiplicaron en esta línea celular y se clasificaron como IS.

Las secuencias de la región del lazo V3 de la gp 120, de las 5 cepas clasificadas R5 NIS por los ensayos biológicos, no tenían cambio aminoacídico en las posiciones 11 y/o 25 por lo que del mismo modo se consideraron R5. Estas cepas asimismo se clasificaron R5 por el análisis genotípico realizado por los métodos de matrices de punto en posiciones específicas y el programa Geno 2 pheno (tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la caracterización de los aislamientos primarios por dos ensayos biológicos clásicos

Estadio clínico	Aislamientos	Líneas celulares			Clasificación cepas
		U87, CD4 CCR5	U87, CD4 CXCR4	MT2	
Seropositivos asintomáticos (n=5)	CUPL042	+	-	-	R5 NIS
	95CU082	+	-	-	R5 NIS
	CU083	+	-	-	R5 NIS
	CU087	+	-	-	R5 NIS
	CU111	+	-	-	R5 NIS
Evolución rápida al sida (n=6)	CU053	+	+	+	R5/X4 IS
	CU088	+	+	+	R5/X4 IS
	CU091	-	+	+	X4 IS
	CU097	+	+	+	R5/X4 IS
	CU104	+	+	+	R5/X4 IS
	CU110	+	+	+	R5/X4 IS

De pacientes con ER al SIDA, 5 de las 6 cepas aisladas se clasificaron como R5/X4 e IS por el ensayo biológico; sin embargo en todas este resultado no coincidió con la clasificación realizada de estos virus por la regla 11/25, debido a que los 6 virus se clasificaron como X4 puros por la regla 11/25, solo 2 (CU088 y CU097) se clasificaron como duales por geno2pheno y 1 (CU097) por PSSM. Es de señalar que la cepa CU091 se clasificó como X4 puro por el ensayo biológico y los 3 métodos bioinformáticos (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la clasificación de las cepas por los ensayos biológicos y los métodos bioinformáticos. Relación con el estadio clínico de la infección

Estadio clínico	Aislamientos	Clasificación			
		Ensayo fenotípico	Métodos bioinformáticos		
			Regla 11/25	PSSM	Geno 2 Pheno
Seropositivos asintomáticos (n= 5)	CUPL042	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
	CU082	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
	CU083	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
	CU087	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
	CU111	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
Evolución rápida al sida (n= 6) 2	CU053	R5/X4 IS	X4	X4	X4
	CU088	R5/X4 IS	X4	R5/X4	R5/X4
	CU091	X4 IS	X4	X4	X4
	CU097	R5/X4 IS	X4	X4	R5/X4
	CU104	R5/X4 IS	X4	X4	X4
	CU110	R5/X4 IS	X4	X4	X4

En la figura se puede observar la conservación de aminoácidos en las diferentes posiciones de la región V3 de las secuencias estudiadas; en la primera secuencia, identificada como A, predominó la lisina en la posición 25, aminoácido básico que sirvió de marcador predictivo para clasificar esta cepa con fenotipo X4, mientras que en la B no se observaron cambios en las posiciones 11 y/o 25 y esto permitió clasificar estos virus como R5.

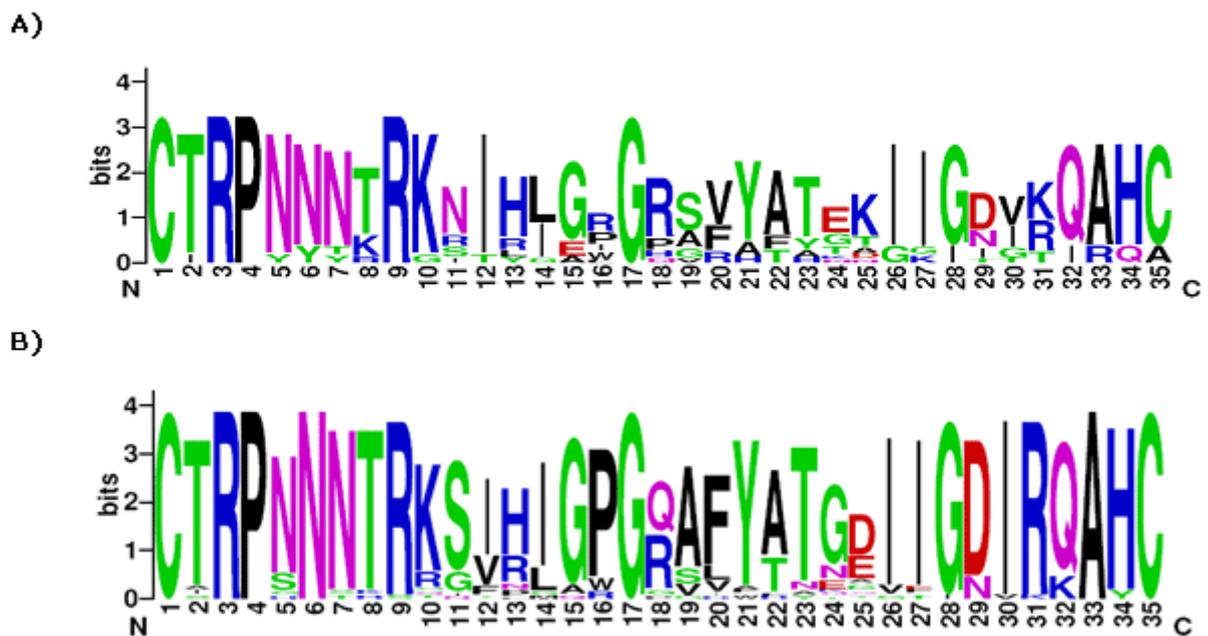


Fig. Secuencias logos de la región V3 de dos cepas con fenotipos diferentes. A) Cepa X4, B) Cepa R5.

Se observó asociación del fenotipo R5 NIS con el estadio asintomático de la infección. Sin embargo se advirtieron diferencias en el fenotipo de las cepas provenientes del grupo de pacientes con SIDA y ER, el cual varió entre los ensayos, ya que el fenotipo X4 puro solo se advirtió en 1 cepa de este grupo en el ensayo clásico, mientras que predominó cuando se hicieron los análisis de las secuencias por los métodos bioinformáticos (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la clasificación de las cepas por los ensayos biológicos y los métodos bioinformáticos. Relación con el estadio clínico de la infección

Estadio clínico	Aislamientos	Clasificación			
		Ensayo fenotípico	Métodos bioinformáticos		
			Regla 11/25	PSSM	Geno 2 Pheno
Seropositivos asintomáticos (n= 5)	CUPL042	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
	CU082	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
	CU083	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
	CU087	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
	CU111	R5 NIS	R5 NIS	R5	R5
Evolución rápida al sida (n= 6) 2	CU053	R5/X4 IS	X4	X4	X4
	CU088	R5/X4 IS	X4	R5/X4	R5/X4
	CU091	X4 IS	X4	X4	X4
	CU097	R5/X4 IS	X4	X4	R5/X4
	CU104	R5/X4 IS	X4	X4	X4
	CU110	R5/X4 IS	X4	X4	X4

En el análisis de las secuencias se observó un predominio del subtipo B, el cual se identificó en 90,90 % del total de cepas aisladas. Llamó la atención en el análisis de 4 (80,00 %) cepas con este subtipo y provenientes de pacientes con ER al SIDA, la presencia del tetrámero GRGR en la punta del lazo V3 y su relación significativa con el fenotipo R5X4 determinado por el ensayo biológico; las otras 2 cepas aisladas de este grupo tenían el tetrámero GWGR/GRGR, 1 con fenotipo X4 puro y la otra R5/X4 (tabla 3).

Tabla 3. Relación del fenotipo de las cepas de pacientes con evolución rápida al sida y el tetrámero GRGR

Fenotipo ^a	Tetrámero GRGR	Tetrámero GWGR/GRGR	Total
R5/X4	4 (80,00 %)	1 (20,00 %)	5
X4	-	1 (100%)	1
Total	4	2	6

^a Fenotipo determinado por ensayo biológico.

DISCUSIÓN

Desde el inicio de la pandemia del VIH la caracterización de las cepas constituyó una necesidad para el conocimiento de la patogenia de la infección, la importancia clínica que esta tiene para el seguimiento de los pacientes y el desarrollo de medidas terapéuticas. En la actualidad se ha avanzado en el desarrollo de herramientas útiles con estos propósitos; dos de ellas se utilizaron en este estudio, ambas con abordajes diferentes y los resultados obtenidos posibilitaron conocer el fenotipo de las 11 cepas estudiadas y su relación con el estadio clínico de la infección.

El empleo de los métodos biológicos clásicos para la caracterización de las cepas permitió observar la coincidencia del fenotipo NIS con el uso del correceptor CCR5 y la capacidad de inducir sincicios con el uso del correceptor CXCR4, solo o de manera simultánea con el receptor CCR5; este fenómeno, observado por muchos autores y relacionado con el estadio clínico de la infección, ha devenido en una regla y se debe a la presencia del correceptor CXCR4 en las células MT2 utilizadas en el ensayo de inducción de sincicios.^{5,14}

La coincidencia de los resultados de los ensayos biológicos clásicos y los análisis de las secuencias, observados en el grupo de cepas provenientes de seropositivos asintomáticos puede estar relacionada con el predominio del fenotipo R5NIS en este grupo de individuos. Esta variante viral es la que con mayor eficiencia se transmite, predomina durante la fase aguda, el período asintomático de la infección e inclusive puede prevalecer en aproximadamente la mitad de los pacientes durante todo el curso natural de la infección.^{6,13,14}

Las diferencias encontradas en los resultados de los ensayos biológicos clásicos y los métodos bioinformáticos, en la caracterización de las cepas provenientes de individuos con ER al SIDA, pudiera explicarse por la teoría del proceso gradual de las mutaciones, las cuales anteceden al cambio fenotípico. Se han observado secuencias de ADN predictivas del correceptor CXCR4 en las CMSP, sin que se haya constatado la replicación de estas variantes fenotípicas en los cultivos. Es por esto que se plantea que los métodos bioinformáticos son predictores del cambio del correceptor. Por otro lado se ha postulado que con la evolución de la infección, las poblaciones virales van cambiando por lo que las variantes duales constituyen una transición entre R5 y X4; no obstante las cepas X4 puras son raras *in vivo*, en su mayoría se encuentran como parte de poblaciones heterogéneas de especies virales que utilizan ambos correceptores, posiblemente su tropismo verdadero es dual. Estas cepas no constituyen un prerrequisito para la progresión de la infección, aproximadamente la mitad de los pacientes infectados nunca experimentan este variante fenotípica durante el curso natural de la enfermedad.^{3,5,9,14}

Aunque los cambios aminoacídicos observados en la región de la envoltura estudiada se correspondieron con los verificados por otros autores en posiciones específicas, utilizando estas mismas herramientas, la no coincidencia de los 3 métodos bioinformáticos utilizados en el grupo de cepas de pacientes con ER al SIDA se debe a que la regla 11/25 no permite determinar la dualidad del uso del correceptor, mientras que PSSM y Geno2Pheno sí permiten clasificar los virus que utilizan ambos correceptores; por otro lado la diferencia observada con la secuencia de la cepa CU088, estuvo determinada por la puntuación (-5,69), asignada por el método de análisis de posiciones de matrices específicas y que está dentro del rango intermedio considerado para determinar un fenotipo dual.^{9,10}

El hallazgo de la presencia de otra arginina en el tetrámero del lazo V3 observado en el grupo de secuencias de pacientes con ER al SIDA y el fenotipo dual, llamó la atención; este cambio, que contrasta con otros ya reportados en cepas del subtipo B, se encontró por vez primera en Cuba en un paciente con características clínicas similares; es por ello que planteamos la presencia de un fenómeno de convergencia donde se está produciendo un cambio o mutación de un aminoácido cargado negativamente a otro con carga positiva, en una posición específica, diferente a las observadas por los otros métodos, que puede estar asociado a un fenotipo determinado.^{15,16}

Aunque hubo diferencias los resultados de los ensayos clásicos con los métodos bioinformáticos, en el grupo de muestras de pacientes con ER al SIDA, de manera general se valoró que los resultados alcanzados con ambos métodos permitieron caracterizar las cepas estudiadas y que hubo correspondencia de la clasificación de los virus con el estadio clínico de la infección, observado en estudios que utilizan uno u otro de estos ensayos con objetivos similares.

La correspondencia de los resultados de los métodos biológicos con los bioinformáticos, en el grupo de seropositivos asintomáticos y los razonamientos tomados en cuenta en el grupo de pacientes con ER al SIDA se valoraron para considerar que los métodos bioinformáticos utilizados avalan su empleo para la caracterización de las cepas de los pacientes previo al empleo de drogas del grupo de los antagonistas de los correceptores. Otra ventaja de estos métodos con relación a los biológicos está dada por la posibilidad de encontrar otros cambios mutacionales indicadores de cambios fenotípicos, dada la naturaleza variable de este virus como los descritos anteriormente; no obstante es bueno tomar en cuenta que los ensayos biológicos son necesarios para la validación de las herramientas bioinformáticas y que unidos a otros parámetros clínicos e inmunológicos son de gran utilidad para los estudios de patogenia, necesarios para un mejor manejo de los pacientes desde el punto de vista clínico y terapéutico.¹⁷⁻²⁰

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles i viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:657-700.
2. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P. The CCR5 and CXCR4 coreceptors central o understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004;20:111-26.
3. Lusso P. HIV and the chemokine system: 10 years late. *EMBO J.* 2006;25:447-56.
4. Baun PB, Wiesmann F. Phenotypic assays for the determination of correceptor tropism in HIV infected individuals. *Eur J Med Res.* 2007;12:463-72.
5. Brumme ZL, Moyle G. The epidemiology of HIV-1 coreceptor usage. *J Viral Entry.* 2006;2:13-20.
6. Whitcomb JM, Huang W, Frasen S. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007;51:566-75.

7. Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different Human Immunodeficiency Virus type 1 subtype. *J Clin Microbiology*. 2008;46(3):887-91.
8. Resch W, Hoffman N, Swanstrom R. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology*. 2001;288:51-62.
9. Jensen MA, Li Fu-Sheng, Vant't Wout A, Nicle DC, Shriner D. Improved correceptor usage prediction and genotypic monitoring virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virology*. 2003;77:13376-88.
10. Pillai S, Good B, Richman D, Corbeil J. A new perspective on V3 phenotype prediction. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19:145-9.
11. Sander O, Sing T, Sommer I, Low A, Cheung P. Structural descriptors of 120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage. *PLOS Computacional Biology*. 2007;3:0555-64.
12. Cardozo T, Kimura T, Philpott S, Weiser B, Burger H, Zolla Pazner S. Structural basis for correceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res and Hum Retroviruses*. 2007;23:415-26.
13. Koot M, Vos AHV, Keet RPM, de Goede RY, Derckesen MW. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with and MT2 cocultivation assay. *AIDS*. 1992;6:49-54.
14. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, et al. Change in correceptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals. *J Exp Med*. 1997;185:621-8.
15. Gómez C, Fernández J, Iglesias E, López A, Lobaina L. Complete DNA sequence of the gene encoding the external glycoprotein (gp 120) from the Cuban HIV Type 1 isolate. *Sequence Note. AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996;12:553.
16. Gómez C, Iglesias E, Walmer P, Rolo F, Blanco M. Isolates from four different HIV Type 1 classes circulating in Cuba identified by DNA séquence of the C2-V3 region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17:55-8.
17. Baba M, Miyake H, Wang X. Isolation and characterization of Human Immunodeficiency Virus type 1 resistant to small-molecule CCR5 antagonist AK-652. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51:707-15.
18. Hoffmann C. The epidemiology of HIV correceptor tropism. *Eur J Med Res*. 2007;12:385-90.
19. Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Aiser R. Bioinformatics prediction of HIV co-receptor usage. *Nature Biotechnololy*. 2007;25(12):1407-10.
20. Low Aj, Swenson LC, Harrigan PR. HIV co-receptor phenotyping in the clinical setting. *AIDS Rev*. 2008;1:143-51.

Recibido: 20 de mayo de 2010.
Aprobado: 2 de junio de 2010.

Dr C. *Leonor Lobaina Barthelemy*. Laboratorios de Investigaciones del SIDA.
Carretera de Tapaste y Autopista Nacional. San José de las Lajas. La Habana, Cuba.
CP 32700. Correo electrónico: lisida@infomed.sld.cu;
leonorlobaina.@infomed.sld.cu