



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLÓGICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN
MESOAMERICA, PERIODO 2011-2016**

Por:

ANABEL LIAO

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología para optar por el título de Licenciado en Biología con orientación en Genética y Biología Molecular.

Panamá, República de Panamá

2022



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN MESOAMERICA, PERIODO 2011-2016”

Por:

Anabel Liao Orozco
PE-15-379

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Genética y Biología Molecular.

PROF. Yaxelis Mendoza
Tutor (preside)

PROF. Carlos Ramos
Jurado

PROF. Magaly De Chial
Jurado

DEDICATORIA

A tres de las personas más importantes en mi vida:

Este proyecto jamás habría sido posible sin el apoyo y ayuda de mis padres. Ustedes siempre han creído en mí y jamás cuestionaron si tenía las suficientes capacidades para lograr lo que me propusiera. La educación que me han brindado es la razón por la que cuento con lo necesario para conseguir todo lo que han deseado para mí y volar tan alto como ustedes siempre supieron que podía. Espero siempre darles razón para estar orgullosos de que soy su hija.

Y a mi mejor amigo, que siempre has creído en mí aún cuando hasta para mí es difícil. Mi mejor compañero, con quién compartí la presión, esfuerzo y constantes desveladas de estudio que demanda esta carrera. Las virtudes que encuentro en ti son demasiadas para nombrar, y aun sabiendo que me aceptas y amas tal como soy, espero seguir mejorando y algún día poder reflejar todo lo que admiro en ti. Espero construyamos una vida exitosa juntos y que también tú puedas estar por siempre orgulloso de estar a mi lado.

AGRADECIMIENTO

Con este trabajo de tesis termina un proceso de cinco años. En este periodo tuve la oportunidad de explorar habilidades y destrezas que desconocía sobre mí misma de las cuales hoy puedo estar orgullosa. Agradezco poder ver hacia atrás y observar cómo cada experiencia que me concedió el cursar esta licenciatura no solo contribuyó a mi formación académica, sino que además me permitió evolucionar como persona. Agradezco a la Universidad de Panamá por ser la institución que permitió que esta historia se desarrollara porque ahora que culmina este proyecto soy una nueva persona, con nuevas fortalezas y perspectivas, que me permiten estar mejor preparada para lo que me espera en el futuro.

Agradezco también a cada profesor que se tomó la dedicación de impartir sus conocimientos con nosotros, especialmente a mi asesora, una fuente de conocimiento sorprendente, y quién me empujó a optar por la orientación de genética a través de sus clases. Con usted tuve mi primer encuentro con la bioinformática, una disciplina que cambió la forma en que veía la biología y la ciencia en general, sin la cual este proyecto no habría sido posible.

Y por último pero más importante, me agradezco a mí.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	18
1.1. Breve Reseña Histórica del Descubrimiento del VIH	19
1.2. Características Generales	21
1.3. Estructura	23
1.4. Ciclo Replicativo	25
1.5. Diversidad genética del VIH	28
1.5.1. Grupos y subtipos de VIH	28
1.5.2. Formas circulante recombinantes y formas recombinantes únicas	30
1.5.3. Distribución global de la diversidad genética del VIH-1	31
1.5.4. Diversidad genética del VIH en Panamá	32
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	35
2.1. Construcción del set de datos de Referencia y secuencias de estudio	36
2.2. Análisis Filogenético	37
CAPÍTULO III: RESULTADOS	40
3.1. Subtipos “Puros”	41
3.2. Recombinantes	42
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	74
4.1. Subtipos “Puros”	75
4.2. Recombinantes	77

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES & RECOMENDACIONES	82
CONCLUSIONES	83
RECOMENDACIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virión maduro de VIH-1 mostrando las proteínas que componen la cápside (gp 42, gp120), la matriz (MA), y nucleocápside (NC, CA) que contiene enzimas RT y el RNA.	23
Figura 2. Estructura y organización del genoma del VIH-1.....	24
Figura 3. Ciclo Replicativo del VIH- 1.	26
Figura 4. Clasificación final en porcentajes de las muestras analizadas. A) Porcentajes en base al total de muestras (n=470) B) Porcentajes en base al total de recombinantes (n=104).	44
Figura 5. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo B.	46
Figura 6. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo C.	47
Figura 7. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo G.	48
Figura 8. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo F1.....	49
Figura 9. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo D.	50
Figura 10. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo A6. Nivel de confianza de 86. Países en los que se encontró muestras VIH-1 Subtipo A6: Panamá (circulo en rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este subtipo (n=1).	51
Figura 11. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como recombinante BF1.	52
Figura 12. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF12.	53
Figura 13. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF12.....	55
Figura 14. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF18_cpx.....	56

Figura 15. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF18_cpx, mostrando similar patrón de recombinación.	58
Figura 16. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF02_AG.....	59
Figura 17. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF02_AG, mostrando un patrón de recombinación similar entre las secuencias.....	60
Figura 18. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF01_AE.....	61
Figura 19. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF01_AE.	62
Figura 20. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF19.	63
Figura 21. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF019_cpx.....	64
Figura 22. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF20 BG.....	65
Figura 23. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF20_BG.	66
Figura 24. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF62_BC.....	67
Figura 25. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF62_BC.	68
Figura 26. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen pol de VIH-1 de secuencias identificadas como URFs.	71
Figura 27. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como URFs.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución por porcentaje de las variantes genotípicas en las diferentes regiones del continente americano.....33

Tabla 2. Resultados finales de la clasificación por subtipo y CRF de cada muestra analizada. Los porcentajes están basados en el total de muestras (n=470).45

LISTA DE ABREVIATURAS

VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
MINSA	Ministerio de Salud
CDC	Centro de Control de Enfermedades (Center for Disease Control and Prevention)
TARV	Terapia Antiretroviral
CD4	Cúmulo De Diferenciación 4 (Cluster of Differentiation 4)
HTLV	Virus de Células T de Humanos (Human T-lymphotropic virus)
NIH	Instituto Nacional de Salud (National Institute of Health)
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses)
AZT	Azidotimidina
UNAIDS	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida (United Nations Programme on HIV/AIDS)
ART	Antirretrovirales
ARN	Ácido Ribonucléico
ADN	Ácido Desoxiribonucléico
LTR	Repeticiones Largas en Tándem (Long Terminal Repeat)
CXCR4	Receptor de quimiocinas tipo 4 (C-X-C chemokine receptor type 4)
CCR5	Receptor de quimiocinas tipo 5 (C-C chemokine receptor type 5)
SIV	Virus de Inmunodeficiencia en Simios (Simian Immunodeficiency Virus)
tMRCA	Tiempo del Ancestro Común Más Reciente (Most Recent Common Ancestor)
CRF	Circulating Recombinant Form (Forma Recombinante Circulante)

URF	Unique Recombinant Form (Forma Recombinante Única)
SGR	Second Generation Recombinant (Recombinante de Segunda Generación)
REF	Secuencias de Referencia

RESUMEN

La extensa diversidad del VIH se debe a su capacidad de adaptarse al mutar constantemente bajo presión selectiva, mediada ya sea por el sistema inmune o los medicamentos antirretrovirales. Esta variación genómica afecta la eficacia de las pruebas de diagnóstico, la detección de la carga viral, la respuesta a tratamiento, y el desarrollo de vacunas. Estudios de diversidad genética del VIH-1 demuestran que si bien en la región mesoamericana predomina el VIH-1 subtipo B, también circulan otros subtipos y formas recombinantes. Es de suma importancia para la salud pública determinar la prevalencia y dispersión de las variantes genéticas del VIH en la población para proveer el mejor diagnóstico, tratamiento y mitigar el aumento de la diversidad genómica del virus. En este estudio se identificaron 470 secuencias del gen *pol* de VIH-1 provenientes de seis países de Mesoamérica obtenidas entre 2011 a 2016, mediante el uso de análisis filogenéticos y el análisis de patrones de recombinación en las variantes recombinantes. Se utilizaron como método comparativo matrices de secuencias de referencias de los diferentes subtipos y formas recombinantes del VIH-1 obtenidas de la base de datos de HIV Los Alamos. En concordancia con los reportes de la región mesoamericana, el subtipo VIH-1 subtipo B fue el predominante al ser identificado en el 69% (n=324) de secuencias. La forma recombinante más prevalente fue el recombinante dual VIH-1 BF identificado en el 8.9% (n=42) de las secuencias. Se identifica por primera vez en la región una secuencia del sub-subtipo A6, proveniente de Panamá. Como conclusión, con relación a los reportes de estudios previos, se observó un aumento en la diversidad genética del VIH-1 en la región mesoamericana.

ABSTRACT

The extensive diversity of HIV is due to its ability to adapt by constantly mutating under selective pressure mediated by either the immune system or antiretroviral drugs. This genetic diversity affects the efficacy of diagnostic tests, detection of viral load, response to treatment, and the development of vaccines. Studies focused on genetic diversity of HIV-1 indicate that although HIV-1 subtype B predominates in the Mesoamerican region, other subtypes and recombinant forms also circulate. It is of the utmost importance to determine the prevalence of genetic variants of HIV in the population to provide the best diagnosis and treatment, and to mitigate the spread and increase of genomic diversity of the virus. This study identified 470 sequences of the HIV *pol* gene from six Mesoamerican countries using phylogenetic analysis and the visualization of recombination patterns that the recombinant variants presented. Reference sequence arrays of the different subtypes and recombinant forms of HIV-1 obtained from the HIV Los Alamos database were used as a comparative method. In accordance with previous reports of the Mesoamerican region, the HIV-1 subtype B was the predominant subtype, identified in 69% (n=324) of sequences. The recombinant form most prevalent was the dual recombinant HIV-1 BF identified in 8.9% (n=42) of the sequences. This study identified for the first time in the region a sub-subtype A6 sequence, which came from Panama. In summary, in comparison with reports of previous studies, the genetic diversity of HIV-1 in the Mesoamerican region had an increase.

INTRODUCCIÓN

A finales de 1980 se comenzaron a presentar dos infecciones poco comunes: neumonía fúngica y un cáncer de piel impulsado por el virus del herpes llamado Sarcoma de Kaposi (Friedman-Kien, 1981). Con el tiempo, en Los Estados Unidos se observó un incremento de estas dos enfermedades y solo en personas con sistemas inmunes comprometidos, llamando la atención de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) y, en el verano de 1981, se reconoció por primera vez como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Greene, 2007). El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente causante del SIDA, el cual disminuye la cantidad de linfocitos T CD4, afectando la eficacia del sistema inmune. Es transmitido de manera sexual, percutánea y perinatal, y solo puede tratarse mediante medicamentos de tipo antirretroviral, los cuales no son accesibles para toda la población (Bartholomeusz & Locarnini, 2014; Hernandez-Sanchez *et al.*, 2018; Sharp & Hahn, 2011; Teva *et al.*, 2012). Con aproximadamente 1.7 millones de nuevos casos de infección solo en el año 2018 (UNAIDS, 2019), el VIH/SIDA es actualmente considerado como pandemia.

Con los años este virus ha desarrollado una extensa diversidad genómica como resultado de las recombinaciones y constantes mutaciones que experimenta durante la replicación viral dentro de la célula, de manera que se ha dividido en VIH tipo 1 y VIH tipo 2. El VIH-1, a su vez, se ha ramificado en los grupos M (Main), N (No M, No O), O (Outlier) y P. Del grupo M provienen la mayoría de las secuencias que han infectado al ser humano en la pandemia y se divide a su vez en diez subtipos denominados por las letras A-D, F-H, J, K y L (Hemelaar, 2012; Sharp & Hahn, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2020). Los genomas de los subtipos difieren en la codificación de las

proteínas que componen las estructuras del virus hasta en un 35%; mientras que las variantes genéticas pertenecientes a un mismo subtipo pueden diferir en un 20% (Gaschen *et al.*, 2002). Estas variaciones afectan la eficacia de los exámenes de diagnóstico, las investigaciones de respuesta a tratamiento, el diseño de estrategias de administración clínica de medicamentos antirretrovirales, el estudio de las variantes resistentes a medicamento y, principalmente, influye sobre el diseño y desarrollo de una vacuna que funcione de forma efectiva y confiable contra todos los subtipos y cada nueva variación que surja (Hemelaar *et al.*, 2019). Debido a este obstáculo, para el beneficio de la salud pública, es necesario contar con información fiable y actualizada de la prevalencia de los subtipos y recombinantes a nivel regional y global, para poder establecer estrategias que prioricen según la predominancia, lo que resulta en mayor beneficio, en el menor tiempo posible (Marzetta *et al.*, 2010). Por consiguiente, a nivel nacional es crucial que conozcamos las variantes que circulan en nuestro país y las nuevas variantes que han surgido o las que se han introducido a través de los años; en particular, por el incremento de inmigrantes a Panamá ya que, sólo en el año 2019 hubo una entrada de 2,571,610 extranjeros de diversas nacionalidades al territorio panameño (fuente: <https://www.migracion.gob.pa/inicio/estadisticas>).

En este estudio se busca identificar las variantes genéticas de 470 secuencias, que corresponden a la región de la proteasa y transcriptasa reversa del gen *pol*, provenientes de seis países de la región Mesoamericana (Nicaragua, México, Belice, Guatemala, Honduras y Panamá) obtenidas entre los años 2011 a 2016. Mediante el uso de análisis filogenéticos, la región del gen *pol* provee la suficiente información nucleotídica para identificar hasta un 95% de las variantes descritas en la base de datos de VIH de Los Alamos.

JUSTIFICACIÓN

En el 2016 se registraron 16,068 casos de personas vivas con VIH-1, recibiendo o no terapia antirretroviral (TARV); sin embargo, el número estimado podría ser aproximadamente de 20,873 casos (MINSA, 2018). Aunque el VIH-1 subtipo B es el predominante en nuestro país, es importante señalar que se ha reportado que un porcentaje de la población infectada presenta otras variantes. Los tratamientos desarrollados hasta ahora para la atención clínica no tienen el mismo resultado para todas las variantes (Santoro & Perno, 2013).

Es responsabilidad de quienes están a cargo de la salud pública mantenerse informados y en vigilancia constante de la diversidad genómica viral del territorio. Esto es necesario para proveer a los afectados de un tratamiento clínico más eficiente y personalizado según las complicaciones y especificidades propias de cada variante, especialmente si éstas han desarrollado resistencia y, al mismo tiempo, detectar cuándo éstas emergen y registrarlas (Ahumada-Ruiz *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar las variantes genéticas del VIH-1 de 470 secuencias del gen *pol* obtenidas de personas que viven con VIH-1 en seis países de Mesoamérica (Nicaragua, México, Belice, Guatemala, Honduras y Panamá).

Objetivos Específicos

- Construir matrices de las secuencias obtenidas de VIH con secuencias de referencia de subtipos y CRFs de la región *pol* obtenidas de base de datos de VIH.
- Determinar la diversidad genética de secuencias del VIH-1 gen *pol* mediante la construcción de árboles filogenéticos.
- Determinar el patrón de recombinación de variantes del VIH-1 identificadas mediante el método del Bootscan.
- Describir la diversidad genética del VIH-1 de Mesoamérica.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

1.1. Breve Reseña Histórica del Descubrimiento del VIH

A finales de 1980 varios integrantes de la comunidad de hombres que tienen sexo con hombres y de usuarios de drogas inyectables, estuvieron presentando casos de neumonía fúngica causada por *Pneumocystis jirovecii* (antes conocida como *Pneumocystis carinii*), una infección oportunista poco común que solo se presentaba en personas con sistemas inmunes comprometidos (Gottlieb, 2006; Masur *et al.*, 1981). Además, dicha población era susceptible a desarrollar un cáncer de piel impulsado por el virus del herpes llamado Sarcoma de Kaposi (Friedman-Kien, 1981). Con el tiempo, muchos más casos de estas dos enfermedades se fueron propagando y llamando la atención de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés). A medida que los casos aumentaban, así como los decesos, se empezó a utilizar el término “la plaga gay” y el miedo empezó a esparcirse. En el verano de 1981 se reconoció por primera vez el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) tras el notable patrón de características pertenecientes a infecciones oportunistas (Greene, 2007).

La enfermedad había sido reconocida, sin embargo, aún no se contaba con pruebas diagnósticas para su detección, por lo que no había forma de asegurar la calidad de las unidades de sangre que estaban siendo donadas en esa época. Debido a esto, los bancos de sangre fueron por muchos años un riesgo para la salud, contagiando de forma inconsciente por medio de transfusiones a sus recipientes; por lo que, entre 1981 y 1984, se infectaron de esta forma aproximadamente 15 000 personas en Los Estados Unidos (Greene, 2007). En las primeras investigaciones inmunológicas se pudo observar repetidamente una disminución en la cuenta de linfocitos tipo CD4 y a finales de

1982, se tenía evidencia de que el SIDA se estaba transmitiendo por medio de los fluidos corporales (CDC, 1982). Poco después, en 1983, también se presentaron reportes de transmisión heterosexual de SIDA, cambiando drásticamente la perspectiva y estigma que se tenía (Vahlne, 2009).

El agente causante del SIDA, fue descrito por primera vez en 1983 por Luc Montagnier y colaboradores en el Instituto Pasteur, utilizando tejidos con linfadenopatía (inflamación de los ganglios linfáticos) aguda tomados de pacientes con SIDA e individuos en riesgo de contraerlo. El equipo identificó a través de microscopía electrónica un nuevo virus linfotrópico de células T humanas (HTLV por sus siglas en inglés) distinto morfológicamente al HTLV-1 y al HTLV-2 (Vahlne, 2009). El virus parecía además poder infectar células CD4, sin embargo, fue hasta un año después que Robert Gallo y colaboradores, en el Instituto Nacional de Salud (NIH), asociaron al nuevo virus como el agente causante del SIDA (Gallo *et al.*, 1984). En mayo de 1986 finalmente se le dio el nombre de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) después de que Harold Varmus, del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés), así lo recomendara (Greene, 2007).

En poco tiempo, se pudieron identificar tres enzimas producidas por el virus entre las cuales además de la integrasa y proteasa, estaba la transcriptasa reversa. Esta última podía ser inhibida por una droga antirretroviral contra el cáncer llamada Azidotimidina (AZT) por lo que, en 1987, se convirtió en el primer medicamento aprobado para uso en el tratamiento de aquellos que padecían de SIDA (Greene, 2007). La terapia con este medicamento era efectiva, sin embargo, poco después empezaron a surgir variantes del virus con resistencia a la droga.

1.2. Características Generales

El Virus de Inmunodeficiencia Humana es actualmente reconocido como el agente causante del SIDA. En 1984 la proteína transmembrana de los linfocitos T CD4 fue identificada como uno de los receptores necesarios para la entrada del virus del VIH (Dalglish *et al.*, 1984; Greene, 2007). Estos linfocitos son precisamente los que controlan la respuesta del sistema inmune a las infecciones virales. Al disminuir la cantidad de estas células en el cuerpo, se disminuye también la capacidad de respuesta inmune del huésped, aumentando la susceptibilidad a cualquier tipo de infección oportunista que al complicarse puede conducir a la muerte (Sierra *et al.*, 2005). Por esta razón, un paciente es diagnosticado con SIDA cuando su cuenta de células T tipo CD4 es menor a 200 células por mm³. El VIH se puede transmitir de manera sexual, percutánea y perinatal; sin embargo, la mayoría de quienes lo contraen lo hacen por la ruta sexual (Sharp & Hahn, 2011). Con aproximadamente 1.7 millones de nuevos casos de infección solo en el año 2018 (UNAIDS, 2019), el VIH/SIDA es actualmente considerado como pandemia.

Hoy día existen medicamentos de tipo antirretrovirales (ART) para el tratamiento del SIDA que reducen la cantidad de virus, pero no lo eliminan; esto supone una dependencia al medicamento de por vida y crea la posibilidad de que surjan nuevas variantes del virus con resistencia a la droga. Además, estas terapias no son accesibles para todos los grupos demográficos, por lo que definitivamente aún es necesaria una vacuna. Mientras tanto, el SIDA se mantiene como una de las mayores causas de muerte en los países en desarrollo, con aproximadamente 32 millones de

muertes a nivel global desde que se inició la epidemia hasta finales de 2018. Se estima que existen actualmente alrededor de 37.9 millones de personas en todo el mundo infectadas con VIH (UNAIDS, 2019).

El VIH es un retrovirus que, al invadir a una célula huésped, tiene la capacidad de transcribir su genoma de ARN, a una molécula de ADN, gracias a la enzima transcriptasa reversa y, mediante la integrasa, incorpora el ADN viral resultante al genoma de la célula hospedera (Tang *et al.*, 1999). EL VIH pertenece al género Lentivirus, los cuales están asociados a enfermedades crónicas de tipo hematológicas y del sistema nervioso que afectan a distintos tipos de mamíferos, entre ellos el ser humano (Sharp & Hahn, 2011). El VIH tiene dos tipos de tropismo: T-trópicos y M-trópicos. Los T-trópicos son llamados así por su afinidad por la infección eficiente de células T CD4 y linfocitos T primarios. Los M-trópicos presentan en cambio, preferencia por los monocitos y macrófagos. Sin embargo, no todas las variantes se acomodan dentro de uno de estos dos grupos, algunas presentan tropismo dual y pueden infectar a ambos grupos de células (Tang *et al.*, 1999). A la fecha, se han identificado dos tipos de VIH llamados VIH-1, que es el responsable por la mayor parte de infecciones globalmente, y VIH-2, más prevalente en el Oeste africano y menos patogénico (Chavan, 2011).

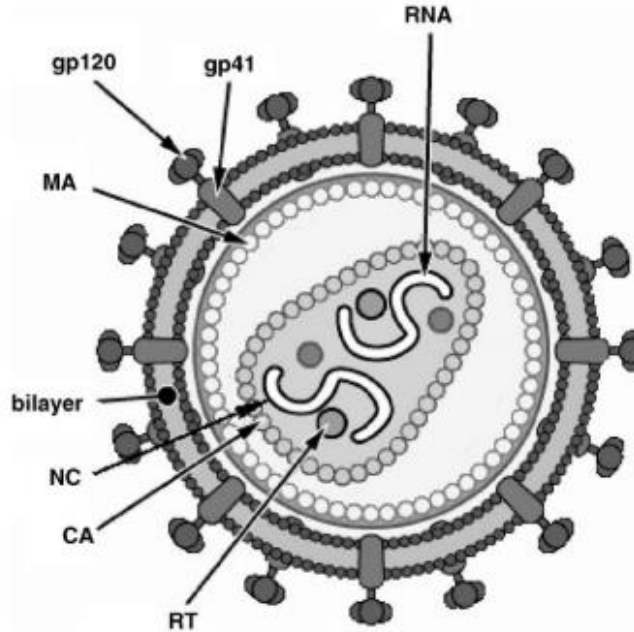


Figura 1. Virión maduro de VIH-1 mostrando las proteínas que componen la cápside (gp 42, gp120), la matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC), que contiene enzimas RT y el RNA.

Fuente: Sierra *et al.*, 2005.

1.3. Estructura

Un virion maduro de VIH-1 (Figura 1) presenta una morfología esférica delimitada por una membrana bilipídica que rodea el centro en forma de cono donde está la nucleocápside. El genoma que allí se encuentra presenta dos hebras individuales positivas de ARN viral de 9.2 kb, mientras que el provirus (forma integrada al ADN dentro de las células infectadas) dentro de las células infectadas es de una doble hebra de ADN (Sierra *et al.*, 2005).

El VIH presenta en su genoma el gen *env*, que codifica para el precursor polipeptídico gp160 a partir del cual se generan proteínas de la envoltura viral gp120 y gp42, las cuales constituyen el sitio de unión del virus a los receptores de las células diana, el cual se ha convertido en objeto de importantes investigaciones para el desarrollo de vacunas para el virus (Sundquist & Krausslich, 2012). La expresión de este gen es, entonces, crucial para la adhesión del virus. Por otro lado, el gen *pol* codifica para las enzimas ARNasa H, proteasa viral, integrasa, y la transcriptasa reversa (una ADN polimerasa dependiente de ARN que es la responsable de retro-transcribir la molécula de ARN a una doble hebra de ADN), que son necesarias para el proceso de replicación de un retrovirus. Igualmente importante, el gen *gag* codifica para el precursor de la poliproteína Gag, responsable de las proteínas estructurales que arman la infraestructura básica del virus (Sierra *et al.*, 2005).

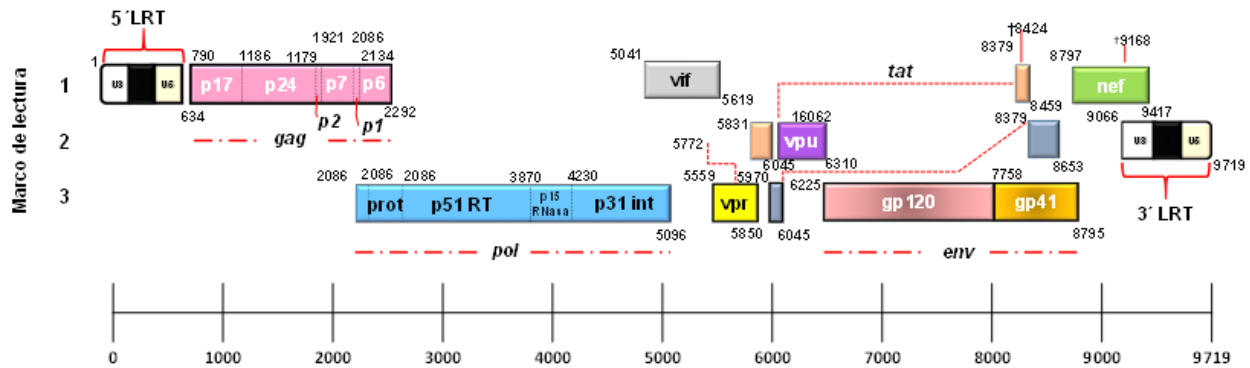


Figura 2. Estructura y organización del genoma del VIH-1 mostrando genes estructurales (*gag*, *pol*, *env*), reguladores (*tat*, *rev*, *nef*) y accesorios (*vpr*, *vpu*, *vif*) del provirus de VIH-1. Fuente: HIV Los Alamos, diseño Jacinto Pérez.

El genoma del VIH presenta, también, una región denominada Terminal Repetida Larga (LTR) con secuencias cortas redundantes en cada extremo de la hebra y ubicadas junto a las regiones U5 y U3, respectivamente, que está implicada en el proceso de integración al ADN de la célula huésped mediante la utilización de una integrasa específica de LTR encontrada en el cromosoma de la célula (Tang *et al.*, 1999). El VIH presenta además otros seis genes accesorios *tat*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*, y *nef*, que aseguran la eficiencia de la infección (Figura 2) (Seitz, 2016).

1.4. Ciclo Replicativo

El primer evento en la infección del VIH-1 es la unión mediante las glicoproteínas del virus a los receptores de las células CD4, como también a los correceptores. En los linfocitos T el correceptor es CXCR4, mientras que en macrófagos es CCR5 (Trkola *et al.*, 1996). Cuando la proteína gp120 del virus interactúan con los receptores de la célula, esta experimenta un cambio conformacional que permite la creación de una unión por alta afinidad de la glicoproteína con los correceptores. Así, esta última interacción resulta en la exposición de la proteína viral gp42, acercando el virus a la célula y conduciendo así a la fusión entre la membrana de la célula hospedera y la envoltura viral. De esta forma, el virus logra entrar en la célula, liberando su nucleocápside en el citoplasma celular (Figura 3) (Sierra *et al.*, 2005).

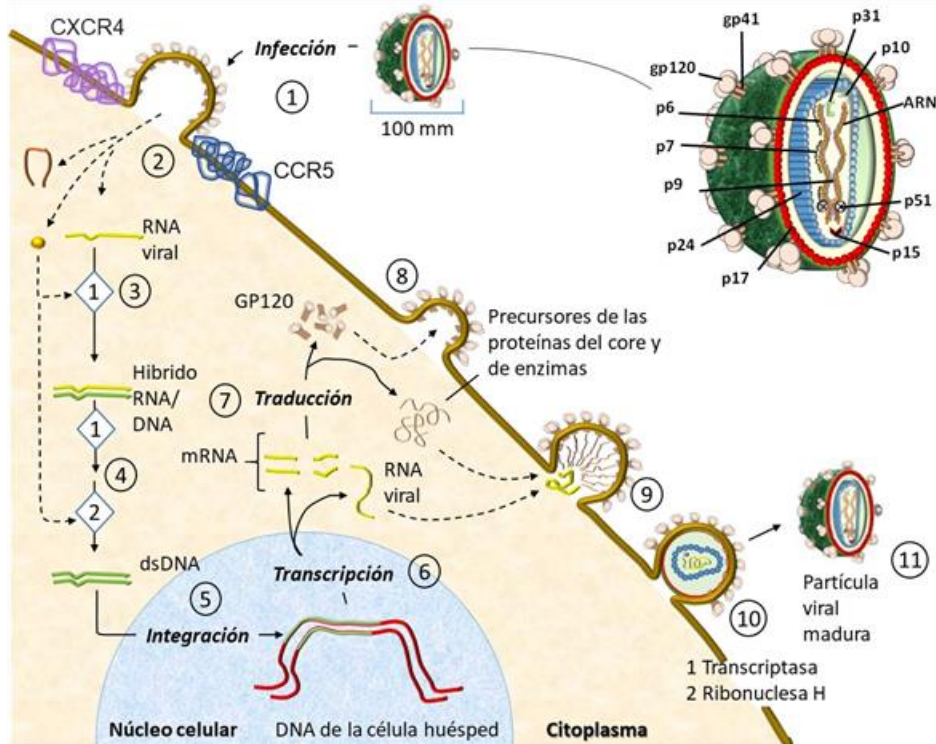


Figura 3. Ciclo Replicativo del VIH- 1. Se ilustra la unión del virus a la célula (1), su entrada (2) y posterior transcripción reversa produciendo una molécula de ADN a partir del ARN del virus (3, 4) que es entonces integrada al ADN cromosómico de la célula (5) para luego transcribir (6) este ADN proviral y traducirse (7) utilizando los polisomas de la célula. Una vez sintetizados las proteínas estructurales, enzimas y dos moléculas de ARN virales, se forma la matrix viral la cual es luego rodeada por la envoltura viral, viaja a la membrana celular (8) donde se procede al ensamblaje (9), gemación (10) y maduración del nuevo virión (11). Fuente: Sierra *et al.*, 2005. Diseño Jacinto Pérez.

Con el ARN viral libre, después de la desintegración de la proteína de la nucleocápside, la enzima transcriptasa reversa puede producir una nueva primera molécula de ADN, mientras otra porción de la enzima degrada el ARN viral y, luego, la retrotranscriptasa produce una segunda hebra complementaria de ADN viral. Esta doble hebra de ADN migra entonces al núcleo de la célula huésped y es insertada en el ADN cromosómico por la integrasa (Sundquist & Krausslich, 2012).

Una vez integrada en el cromosoma de la célula infectada la doble hebra de ADN viral es denominada ADN proviral y puede ser transcrito mediante la ARN pol II, influenciada por múltiples factores reguladores característicos. Las secuencias LTR localizadas antes y después del sitio de inicio de transcripción son elementos reguladores de acción cis al igual que la proteína viral trans-reguladora o *tat*, la cual es expresada en la fase inicial junto a los genes *nef* y *rev* (Jordan, 2001). Los ARNm son entonces traducidos por los polisomas de la célula para producir las enzimas virales y sus proteínas estructurales. Sin embargo, estos productos son inicialmente precursores inactivos, eventualmente activos por proteólisis. La matriz resultante estará compuesta por las proteínas virales y dos moléculas de ARN virales. Las glicoproteínas de la envoltura viral de las gp120 y gp42 se insertan en la membrana celular donde también ocurren los eventos que hacen posible el ensamblaje del virión, mediados por la poliproteína Gag. Finalmente se da la gemación, donde el virión brota de la célula infectada (Freed, 2015).

1.5. Diversidad genética del VIH

1.5.1. Grupos y subtipos de VIH

Este virus ha desarrollado una extensa diversidad genética como resultado de las recombinaciones entre variantes y constantes mutaciones que experimenta durante la replicación viral. Esta alta tasa de mutación se relaciona con el hecho de que depende de la enzima transcriptasa reversa la cual no posee un mecanismo de corrección de lectura, y de las presiones de selección evolutiva que sufre el virus ante los mecanismos de defensa del sistema inmune (Roberts *et al.*, 1988).

El gen pol contiene las regiones codificantes para las proteasa y transcriptasa reversa, conocidas como objetivos de los medicamentos antirretrovirales utilizados en la terapia del VIH (Souza *et al.*, 2019b). En esta región podemos encontrar también polimorfismos con la capacidad de afectar la probabilidad a desarrollar mutaciones que le confieran resistencia a los antirretrovirales, alterar su forma de respuesta a la terapia, o incluso llevar a la amplificación de dichos polimorfismos al reaccionar con los antirretrovirales, agravando la situación epidemiológica (Santoro & Perno, 2013). La forma en que estas mutaciones afectan la función de estos genes aún no es comprendida por completo, sin embargo, el uso de antirretrovirales sigue demostrando ser una estrategia efectiva aun, teniendo en cuenta la variedad de subtipos.

Hoy es ampliamente aceptado que el VIH fue transmitido de otras especies de primates hacia el humano, fenómeno llamado zoonosis, probablemente como consecuencia de las antiguas prácticas de caza y manipulación de las carnes capturadas, así como del intercambio dado entre humanos y otros primates. Una gran variedad de primates no humanos presenta un tipo específico de virus de

inmunodeficiencia y se les conoce como SIVs (siglas en inglés para Virus de Inmunodeficiencia en Simios) (Hemelaar, 2012). Los SIVs que han sido detectados y caracterizados se han nombrado con un sufijo que representa la especie de la que se origina, aunque cabe señalar que muchos de estos virus se han determinado como no patogénicos, aunque compartan filogenia con el VIH (Keele *et al.*, 2006).

El VIH se cree que provino de los chimpancés del Oeste-Central de África, específicamente de la región sur de Camerún (Gao *et al.*, 1999) pero, además, el VIH tipo 1 se cree se ramificó en los grupos M (Main), N (No M, No O), O (Outlier) y P (el más nuevo, se le reconoció su propio grupo al ser tan distinto de los otros tres) (Sharp *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha encontrado que el SIVcpz fue el resultado de la recombinación entre especies ancestrales con SIVrcm (de *Cercocebus torquatus*) y SIVgsn (de *Cercopithecus nictitans*) y, según F. Gao *et al* (1999), los grupos M y N provienen del SIVcpz que se encuentra en el chimpancé *Pan troglodytes troglodytes*. Además, según Keele *et al* (2006), el grupo M tuvo su asentamiento de forma independiente en el área de lo que hoy conocemos como Kinsasa, en la República Democrática del Congo. En esta región también se ha obtenido la más antigua evidencia de infección por VIH en una muestra de suero, y en una biopsia de un ganglio linfático que, por medio de programas bioinformáticos, han permitido estimar el tiempo del ancestro común más reciente (tMRCA) y calcular las tasas evolutivas de distintos linajes. Así, se ha encontrado al grupo M como el linaje más viejo en humanos, compartiendo con el SIVcpz un tMRCA entre 1800 y 1900 aproximadamente (B. Korber *et al.*, 2000). Sin embargo, entre estas dos muestras se ha observado una diferencia en secuencia de 12%, lo que indica que ya desde ese tiempo el grupo M había empezado a diversificarse (Worobey *et al.*, 2008).

El VIH-1 grupo M es conocido por ser aquel al que pertenecen la mayoría de las variaciones que han infectado a los humanos, causando la pandemia del VIH y diversificándose en diez subtipos denominados por las letras A-D, F-H, J, K y L; este último reconocido recientemente (Yamaguchi *et al.*, 2020). La variación genómica entre estos subtipos puede ir de 17% a 35% aunque también podría llegar hasta un 42% dependiendo de distintos factores (Bette Korber *et al.*, 2001).

1.5.2. Formas circulante recombinantes y formas recombinantes únicas

Debido a la naturaleza del virus, la recombinación entre distintos subtipos del VIH-1 grupo M es bastante frecuente, incluso, se da además entre subtipos del VIH-2, por muy distintas que sean las secuencias (Ibe *et al.*, 2010; Peeters *et al.*, 1999; Registro de CRFs en <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>; <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>). Estas recombinaciones entre subtipos son denominadas formas recombinantes circulantes (CRFs) cuando se pueden reconocer en tres o más individuos que no tengan relación epidemiológica entre sí, además de presentar sitios de recombinación similares; mientras que las formas recombinantes únicas (URFs) no comparten sitios de recombinación entre los subtipos con las CRFs. Los CRFs son nombrados en relación al orden en que son descubiertos y caracterizados, además de denotar de qué subtipo provienen (Robertson *et al.*, 2000). La recombinación entre cepas es muy constante a nivel global e incluso existen algunos lugares denominados “hotspots” (puntos calientes) de recombinación, dado que distintos CRFs y subtipos circulan en esa misma área, lo que resulta en la creación continua de URFs. Así, si estos

URFs circulan en una misma población, por definición, se crearían también entonces nuevos CRFs. Esta situación de alta diversidad en una misma zona permite que los CRFs algunas veces también se recombinen entre sí o con otros subtipos, y el resultado es llamado recombinante de segunda generación (SGRs) (Hemelaar, 2012).

1.5.3. Distribución global de la diversidad genética del VIH-1

La diversificación entre los subtipos del VIH-1 ha resultado en diferencias en cuanto a factores como transmisibilidad, reacción a medicamentos antirretrovirales, y patogenicidad (Taylor *et al.*, 2008). El efecto epidemiológico que ha sido generado por cada subtipo varía por región. La distribución de subtipos a nivel global depende de múltiples y complejos factores donde se pueden incluir efectos de fundador, co-infecciones, diferencias biológicas, factores ambientales, factores socioeconómicos, prácticas sexuales (individuales y aquellas influenciadas por políticas de cuidado mandatarias para trabajadores sexuales), migración, entre otros (Hemelaar, 2012).

La variación genotípica de los subtipos de VIH-1 se da por región y en relación al tiempo, por lo que en diferentes partes del mundo predominan distintos subtipos, con diferencias según la época (Tabla 1). Actualmente la mayor diversidad se encuentra en África Central presentando todos los subtipos y diversos CRFs y URFs; mientras que, en Sudáfrica, se presenta una clara dominancia del subtipo C (así como en el sur de Asia, India), que es precisamente la región con mayor prevalencia de VIH a nivel global, haciendo del subtipo C el principal causante de infecciones por VIH mundialmente (Bbosa *et al.*, 2019). En Europa Oriental y Asia Central predomina el VIH-1 subtipo A (aunque el VIH-1 subtipo B también es encontrado en múltiples infecciones); mientras

que, en Europa Occidental y Central, Oceanía, y todo el continente americano, el VIH-1 subtipo B es el responsable de al menos 75% de las infecciones entre 2010 y 2015 (Hemelaar *et al.*, 2019). El VIH-1 subtipo B es un ejemplo de variante cuyo genoma ha evolucionado desde su sitio de origen en África a la variante que circulaba en el Caribe antes de expandirse al resto del continente como variante pandémica aproximadamente alrededor de los años 1960 (Junqueira *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2018; Pagán & Holguín, 2013). La historia evolutiva de este subtipo demuestra la influencia que tuvieron los constantes movimientos migratorios y colonizadores realizados en la época y que aún puede ejercer la movilización poblacional (Junqueira *et al.*, 2011).

1.5.4. Diversidad genética del VIH en Panamá

Debido a su posición geográfica, Panamá se ha definido desde su descubrimiento como un punto de encuentro internacional multiétnico, así como de tránsito y comercio gracias a la construcción del Canal. Gracias a esto, su población ha mantenido desde sus inicios un constante intercambio a nivel biológico con diversos países, especialmente con los norteamericanos durante su asentamiento en el territorio, por lo que no es de sorprenderse que Panamá presente un perfil parecido, con el VIH-1 subtipo B como predominante (Hemelaar *et al.*, 2019). En Panamá, según estudios publicados en 2009 y 2014 (Ahumada-Ruiz *et al.*, 2009; Mendoza, Bello, *et al.*, 2014), el VIH-1 subtipo B tiene una prevalencia del 97% y 98.9% respectivamente. Además, en el estudio realizado por Mendoza *et al* (2014), se describió la circulación del VIH-1 subtipo F1, VIH-1 subtipo C, CRF 20_BG, CRF28/29_BF y URFs_BC, en donde se destaca su posible introducción por parte de Brasil, Cuba, República Dominicana e India.

Tabla 1. Distribución por porcentaje de las variantes genotípicas en las diferentes regiones del Caribe, América y Europa. Se destaca el subtipo predominante de la región y su porcentaje, así como de cada variante presente.

Región	Predominancia		Subtipos del VIH-1 grupo M							
	Subtipo	%	Sub	%	Sub	%	Sub	%	Sub	%
El Caribe	B	94.4	A	0.89	B	91.4	C	0.40	D	1.26
			E	0.00	F	0.03	G	1.18	H	0.07
			J	0.01	K	0.00	URF	1.64	NI	0.11
			A	0.20	B	77.3	C	7.62	D	0.02
			E	0.00	F	4.98	G	0.03	H	0.02
			J	0.00	K	0.00	URF	9.81	NI	0.00
Norte América, Europa Occidental y Central	B	82.4	A	6.60	B	82.4	C	4.19	D	0.38
			E	0.00	F	2.21	G	2.04	H	0.03
			J	0.01	K	0.03	URF	1.98	NI	0.16

Nota: NI: No Identificado. Fuente: Esta tabla fue elaborada gracias a los datos de un estudio anterior en donde se analizaron genomas completos y las variantes recombinantes fueron reasignadas a los subtipos que más contribuyen a cada CRF (Elangovan *et al.*, 2021).

El primer caso en el país se detectó en septiembre de 1984; desde entonces hasta el 2016, se ha registrado en el Ministerio de Salud (MINSa) un total acumulado de 37 690 casos, de los cuales han fallecido 10 811 personas, dejando un porcentaje de letalidad acumulada de 66% (Ministerio de Salud de Panamá, 2018). La epidemia ha progresado de un inicio en donde la mayoría de las infecciones eran transmitidas por el sexo entre hombres, a la actualidad donde no hay una forma predominante de transmisión sexual (Teva *et al.*, 2012). Según el Minsa (2018), dentro de las personas vivas con VIH-1 registradas al 2016, los cuales eran 16 068 casos, el 70% lo adquirió por la vía sexual, dentro de los cuales un 77% eran heterosexuales, 17.4% homosexuales, 5.4% bisexuales y 0.2% transexuales. Los demás porcentajes de adquisición fueron 2.5% de forma perinatal, 1% por vía sanguínea y el 26,5% restante ignoraba cómo lo adquirió. En este reporte se identificó a la provincia de Colón como el punto con la mayor tasa de casos (451.3/100 000) del país, seguida por la comarca indígena Guna-Yala (398.9/100 000) y por último el área metropolitana (336.7/100 000) (Ministerio de Salud de Panamá, 2018).

CAPITULO II: METODOLOGÍA

2.1. Construcción del set de datos de Referencia y secuencias de estudio

Para construir la matriz de secuencias de referencia se descargaron 87 secuencias de referencia (REF) de la región *pol* iniciando en la posición nucleotídicas 2253 a 3600 de todos los subtipos del grupo M, de los grupos N, O y P, así como de todos los CRFs descritos a la fecha de la Base de Datos de Secuencias de VIH en línea Los Alamos (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>).

Del proyecto “Estudio de la epidemiología molecular y vigilancia de la farmacoresistencia del virus de la inmunodeficiencia humana en la región mesoamericana” se adquirieron 470 secuencias del gen *pol* que habían sido previamente clasificadas como “posibles recombinantes” según la herramienta REGA incorporada en la base de datos de resistencia de Stanford (<https://hivdb.stanford.edu>). El objetivo de este proyecto fue estudiar las mutaciones de resistencia asociadas a los fármacos que inhiben la acción de la proteasa y transcriptasa reversa. Las secuencias fueron obtenidas de personas que viven con VIH, y que firmaron consentimiento informado según protocolo aprobado por el Comité de Bioética de la Investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas (Avila-Ríos *et al.*, 2016; Avila-Ríos, García-Morales, Garrido-Rodríguez, *et al.*, 2015; Avila-Ríos, García-Morales, Tapia-Trejo, *et al.*, 2015; Chaillon *et al.*, 2017; García-Morales *et al.*, 2017). Las 470 secuencias de virus provinieron de seis países de la región de Mesoamérica siendo estos: Nicaragua (n=21), México (n=107), Belice (n=38), Guatemala (n=135), Honduras (n=56) y Panamá (n=113).

Se alinearon las 470 secuencias del estudio con las matrices de secuencias de referencia de los subtipos y de las de referencias de los CRFs. Se utilizó el programa de alineamiento de secuencia

múltiple ClustalW implementado en el software Mega X 10.2.2, donde también fueron luego eliminados los residuos que ocasionaban aberturas o “gaps” en el alineamiento. Una vez eliminados, obtuvimos un data set con 1197 nucleótidos en total, con el primer nucleótido correspondiente a la posición 2253 del genoma del VIH-1.

2.2. Análisis Filogenético

Una vez depurado el alineamiento, con el mismo software, se construyeron árboles mediante el método de distancias evolutivas Neighbor-Joining y el modelo evolutivo Tamura-Nei, utilizando como medida de confianza el análisis por réplicas (300) de Bootstrap en donde se consideraron los valores mayores a 70 como confiables o de buen soporte. Primero se construyó un árbol guía solo de REF de subtipo para observar el correcto posicionamiento de todos los clados y posteriormente se construyeron árboles de los CRFs, sin incluir las secuencias REF. Se construyó un árbol con cada secuencia en estudio para determinar el subtipo y se registró el subtipo con el cual presentaban mayor afinidad y buen soporte. Aquellas secuencias de un mismo subtipo se utilizaron en conjunto para construir otro árbol, y si dicho clado presentaba buen soporte entonces las secuencias eran clasificadas según fuese el subtipo. Aquellas secuencias que no mostraron buen soporte dentro del clado o que ocasionaron un cambio significativo en la filogenia del árbol, fueron luego agregadas a otros árboles donde sí se incluyeron las REF de los CRFs compuestas por los subtipos con los cuales las secuencias tuvieron mayor afinidad. Después, con las secuencias que fueron asociadas a un CRF, se construyeron árboles donde se incluyera solo ese CRF y las REF de los subtipos, con el objetivo de confirmar su identificación de CRF a aquellas que reflejaran en el árbol valores de Bootstrap mayores a 70. Una vez todas las secuencias muestra fueron clasificadas, se construyeron árboles grupales para cada subtipo y CRF identificado siguiendo los mismos parámetros descritos

anteriormente, donde se agruparon todas las secuencias de todos los países muestreados que correspondían a cada variante.

Análisis de Recombinación mediante REGA

Se realizó un análisis adicional con la herramienta de tipificación de REGA en línea (<http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/job/63456604/>) solo con las secuencias que fueron identificadas como VIH-1 Subtipo B anteriormente mediante los árboles filogenéticos individuales del programa Mega X 10.2.2 con el objetivo de solucionar errores en la topología del árbol dedicado a este subtipo. Mediante este nuevo análisis se utilizó el Bootscan de cada secuencia para observar si presentaban regiones de recombinación. Las 42 secuencias que demostraron ser recombinantes fueron entonces eliminadas del árbol del VIH-1 Subtipo B y luego se agruparon en un mismo árbol ya que resultaron ser el mismo recombinante. Para estas recombinantes no se realizó análisis de patrones de recombinación en Simplot debido a que no son afines a un CRF descrito con patrones de recombinación que puedan ser confirmados mediante este programa.

Análisis de Patrones de Recombinación mediante Simplot

Las secuencias identificadas como CRF o URF fueron analizadas mediante la herramienta de análisis por bootscan del programa Simplot versión 3.5.1, donde se obtuvo de forma gráfica la composición de cada secuencia por medio de comparaciones con cada REF utilizada para describir cada subtipo del grupo M en la base de datos Los Alamos. Durante estos análisis se optó por 500 réplicas de Bootstrap como medida de soporte y los árboles Neighbor-Joining fueron construidos con el modelo de distancia Kimura (de 2 parámetros), con una ventana de corrida de 250 bp

moviéndose a pasos de 10 bases. Con este programa se buscaba visualizar las posiciones en la secuencia en las que ocurría la recombinación y confirmar así si concordaban con los patrones descritos para el CRF respectivo.

CAPÍTULO III:

RESULTADOS

En este estudio analizamos muestras de secuencias de VIH-1 encontrados en seis países de Mesoamérica mediante el uso de análisis filogenéticos realizados a 470 secuencias correspondientes al gen *pol*. En la Figura 4 observamos los porcentajes de cada subtipo encontrado del total de muestras (n=470) y los porcentajes de cada CRF encontrado según el total de recombinantes (n=89). En la Tabla 2 se muestran los subtipos puros y recombinantes encontrados por país.

3.1. Subtipos “Puros”

Se encontró que el VIH-1 Subtipo B fue el más prevalente (Figura 5) al ser el 69% del total de muestras (n=324/470) similar a la mayoría de los países estudiados representando en orden descendente: 85.7% de las muestras de Nicaragua (n=18/21), 83.2% de Panamá (n=94/113), 74.8% de Guatemala (n=101/135), el 69.2% de México (n=74/107), el 62.5% de las muestras de Honduras (n=35/56), con excepción de ser minoría en Belice (n=2/38, 5.3%) (Tabla 2). Las muestras se organizaron con la topología correcta en el árbol filogenético en el clado del subtipo identificado con una medida de confianza de Bootstrap de 71 (Figura 5).

Por otra parte, las muestras clasificadas como VIH-1 Subtipo C mostraron un valor de confianza de Bootstrap de 99 cuando fueron agrupadas en un mismo árbol (Figura 6). Con esta confirmación, el subtipo C representó el 9.8% (n=46) del total de muestras, el segundo subtipo puro más observado. Más de la mitad de las muestras del subtipo C provenían de Belice, quién le aportó el 58.7% (n=27) de su total.

El resto de las secuencias fueron clasificadas como VIH-1 Subtipo G (0.85%, n=4) (Figura 7), VIH-1 Subtipo F1 (0.64%, n=3) (Figura 8) y VIH-1 Subtipo D (0.64%, n=3) (Figura 9). Además, los análisis filogenéticos realizados en el presente estudio permiten reportar por primera vez una muestra del VIH-1 Subtipo A6 (0.21% del total de muestras, n=1) proveniente de Panamá, con un soporte alto de Bootstrap de 95 (Figura 10).

3.2. Recombinantes

Inicialmente se identificaron 366 secuencias como VIH-1 Subtipo B durante la construcción de árboles individuales en el programa Mega X 10.2.2, sin embargo, al construirse un árbol del subtipo con todas estas secuencias, la medida de soporte era muy baja y no se observaba la topología correcta del árbol. Debido a esto, se utilizó la herramienta de tipificación de Rega para la visualización del Bootscan de cada secuencia y se observó que 42 secuencias presentaban recombinación de regiones pertenecientes al VIH-1 Subtipo F1, por lo que fueron removidas del árbol del VIH-1 Subtipo B. En la Figura 27.2 se observan 8 bootscans representativos de las 42 secuencias determinadas como recombinantes BF. Después de dicha eliminación se construyó con las 324 secuencias restantes el árbol final para el VIH-1 Subtipo B el cual presentó una medida de soporte de 71 y la topología correcta (Figura 5). Debido a que las 42 secuencias recombinantes no mostraban afinidad por un CRF, no se realizó un análisis por Simplot, sino que fueron agrupadas en un mismo árbol de recombinantes de VIH-1 Subtipo B y VIH-1 Subtipo F1 donde obtuvieron una buena medida de soporte de 87 y topología correcta (Figura 11) por lo que representan el 47% (n=42/89) de las muestras recombinantes y el 8.9% (n=42/470) del total de muestras. Estas 42 secuencias son recombinantes únicos URF_BF.

La Forma Recombinante Circulante (con patrón de recombinación específico registrado en base de datos Los Alamos) más observada fue la VIH-1 CRF12 BF aportando el 3.4% (n=16/470) del total estudiado, encontrada mayormente en Panamá (n=9), México (n=4) y en los países Nicaragua (n=1), Honduras (n=1) y Guatemala (n=1). El árbol filogenético de esta variante mostró un soporte de 84 (Figura 12). En la Figura 13 además, se observa cómo cada secuencia que fue clasificada VIH-1 CRF12 BF estaba compuesta en esta región del genoma (gen *pol*) mediante la herramienta del bootscanning del programa Simplot, demostrando que en efecto muestran un patrón de recombinación descrito para el VIH-1 CRF12 BF.

Las demás secuencias recombinantes fueron identificadas como CRF18cpx (1.9%, n=9) (Figura 14), CRF02 AG (1.5%, n=7) (Figura 16), CRF01 AE (0.64%, n=3) (Figura 18), CRF19cpx (0.64%, n=3) (Figura 20), CRF20 BG (0.21%, n=1) (Figura 22) y CRF62 BC (0.21%, n=1) (Figura 24). Estas secuencias también se analizaron mediante la herramienta Bootscan y se puede observar los resultados donde se demuestra que presentan los patrones de recombinación correspondientes en las Figuras 15, 17, 19, 21, 23, y 25 para CRF 18cpx, CRF 02AG, CRF 01AE, CRF 19cpx, CRF 20BG y CRF 62BC, respectivamente.

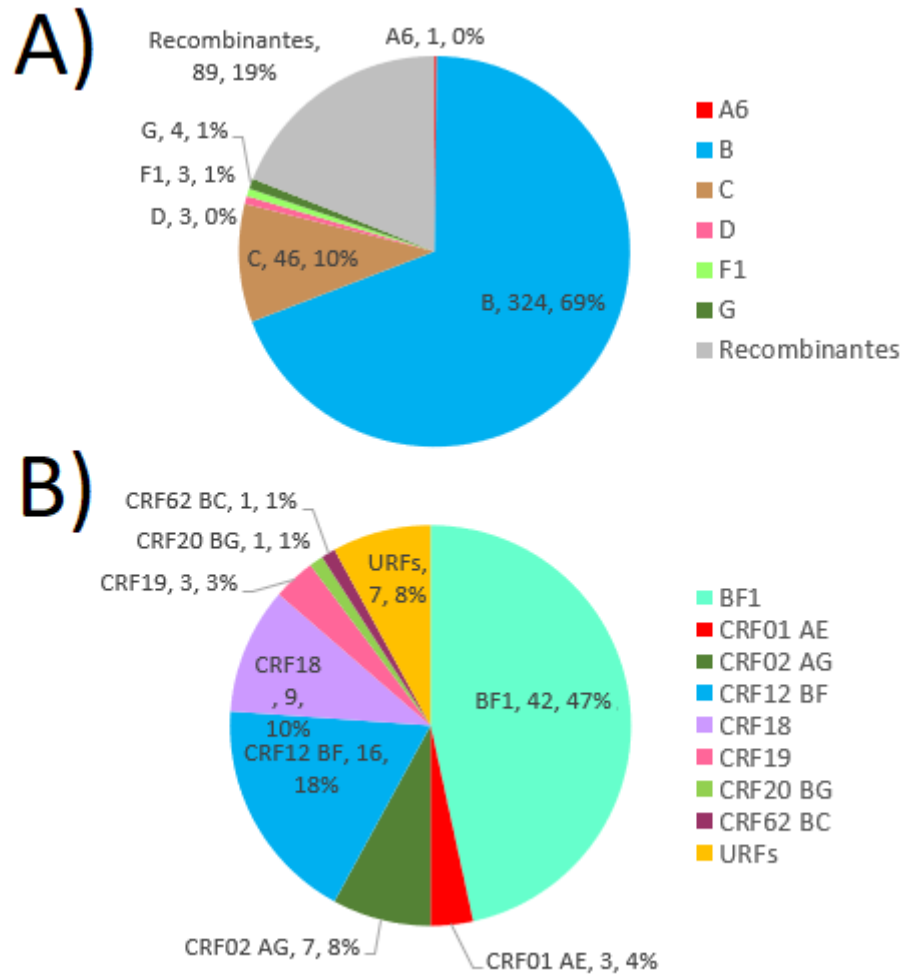


Figura 4. Clasificación final en porcentajes de las muestras analizadas. A. Porcentajes en base al total de muestras (n=470) B. Porcentajes en base al total de recombinantes (n=89).

Tabla 2. Resultados finales de la clasificación por subtipo y CRF de cada muestra analizada. Los porcentajes están basados en el total de muestras (n=470).

	NI (n=21)	MX (n=107)	BZ (n=38)	GU (n=135)	HO (n=56)	PA (n=113)	Total
Subtipos puros							
A6	0	0	0	0	0	1(0.21%)	1(0.21%)
B	18(3.8%)	74(15.7%)	2(0.42%)	101(21.5%)	35(7.4%)	94(20%)	324 (69%)
C	1(0.21%)	4(0.85%)	27(5.7%)	12(2.6%)	1(0.21%)	1(0.21%)	46(9.8%)
D	0	0	0	3(0.64%)	0	0	3(0.64%)
F1	0	1(0.21%)	1(0.21%)	0	0	1(0.21%)	3(0.64%)
G	0	4(0.85%)	0	0	0	0	4(0.85%)
Total	19	83	30	116	36	97	381
Recombinantes							
BF1	1(0.21%)	15(3.2%)	0	5(1.1%)	17(3.6%)	4(0.85%)	42(8.9%)
CRF01 A	0	2(0.42%)	0	0	0	1(0.21%)	3(0.64%)
CRF02 AG	0	0	0	6(1.3%)	1(0.21%)	0	7(1.5%)
CRF12 BF	1(0.21%)	4(0.85%)	0	1(0.21%)	1(0.21%)	9(1.9%)	16(3.4%)
CRF18 cpx	0	1(0.21%)	4(0.85%)	4(0.85%)	0	0	9(1.9%)
CRF19 cpx	0	0	0	2(0.42%)	0	1(0.21%)	3(0.64%)
CRF20 BG	0	1(0.21%)	0	0	0	0	1(0.21%)
CRF62 BC	0	0	1(0.21%)	0	0	0	1(0.21%)
URFs	0	1(0.21%)	3(0.64%)	1(0.21%)	1(0.21%)	1(0.21%)	7(1.5%)
Total	2	24	8	19	20	16	89

Nota: NI, Nicaragua; MX, México; BZ, Belice; GU, Guatemala; HO, Honduras; PA, Panamá.

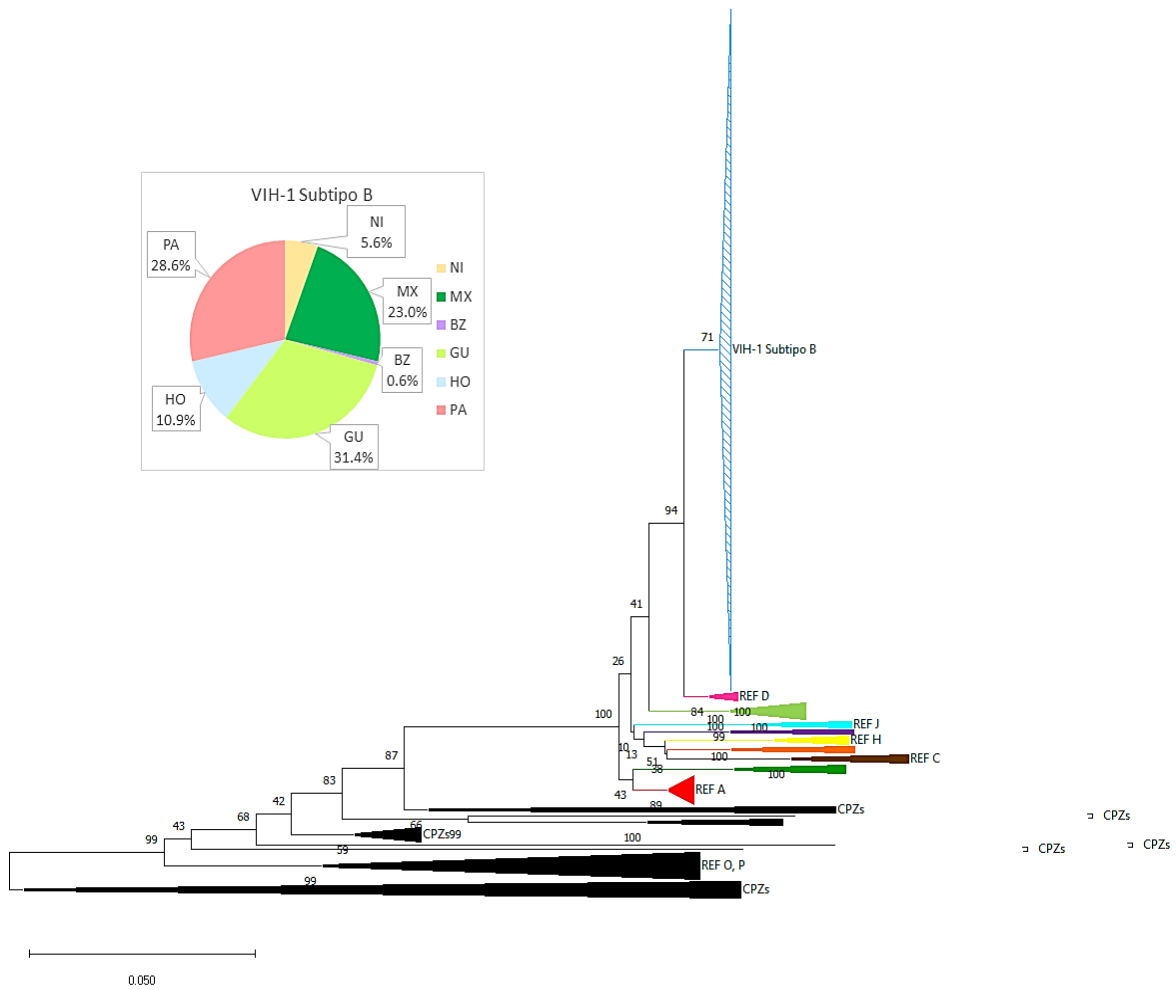


Figura 5. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo B. Medida de confianza de 71. Los porcentajes están basados en el total de muestras para este subtipo (n=324).

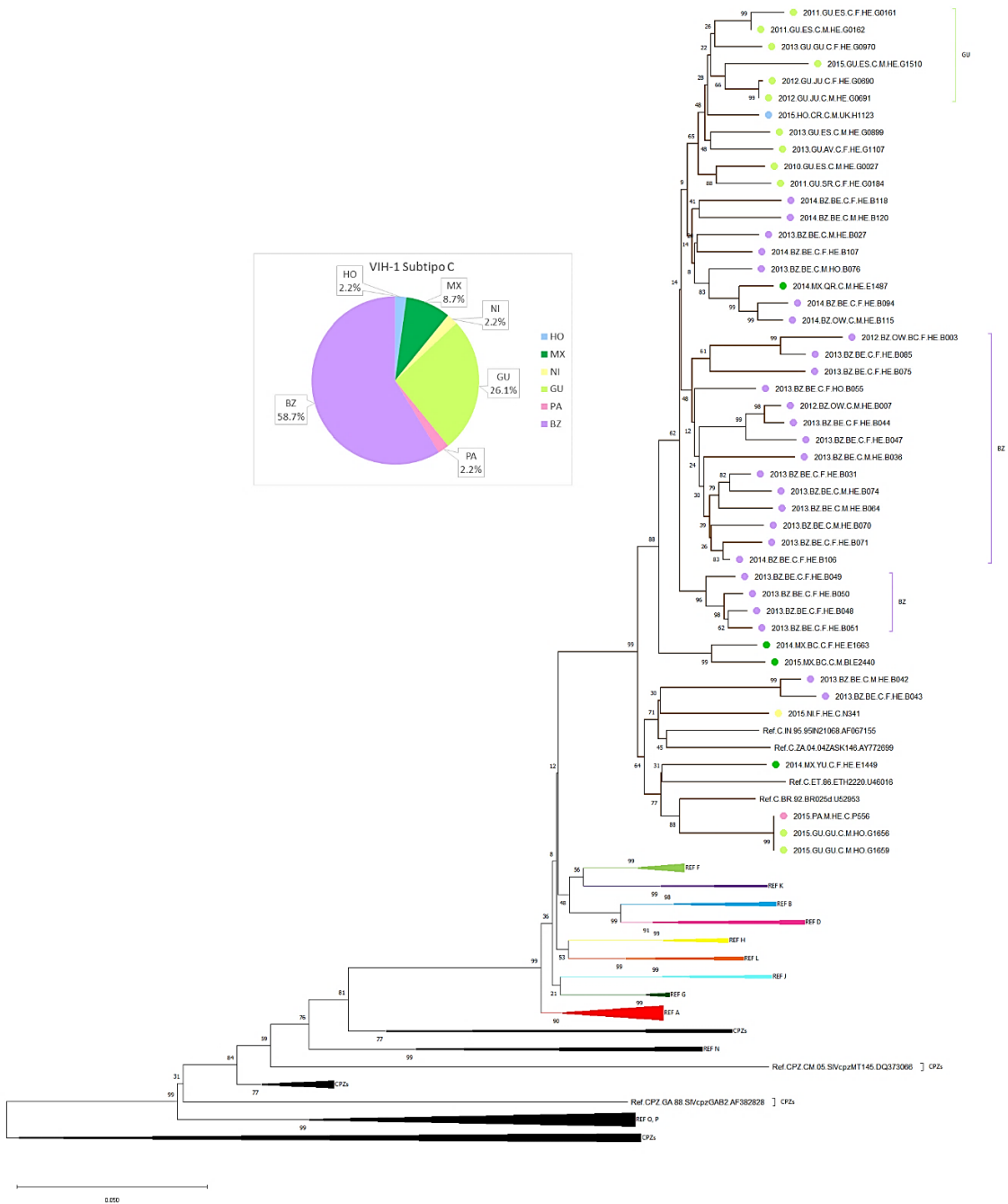


Figura 6. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo C. Países en los que se encontró muestras VIH-1 Subtipo C: Nicaragua (amarillo), México (verde oscuro), Belice (lila), Guatemala (verde claro), Honduras (celeste) y, Panamá (rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este subtipo (n=46).

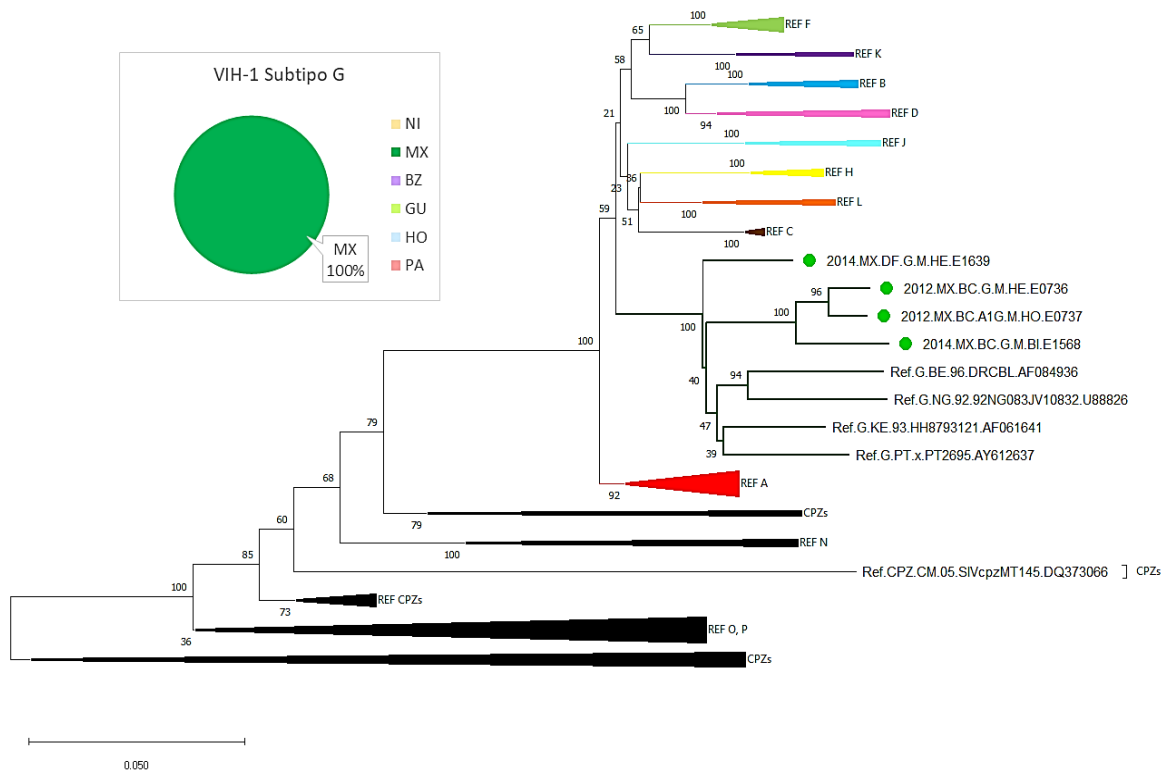


Figura 7. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo G. Países en los que se encontró muestras del VIH-1 Subtipo G: México (verde oscuro). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este subtipo (n=4).

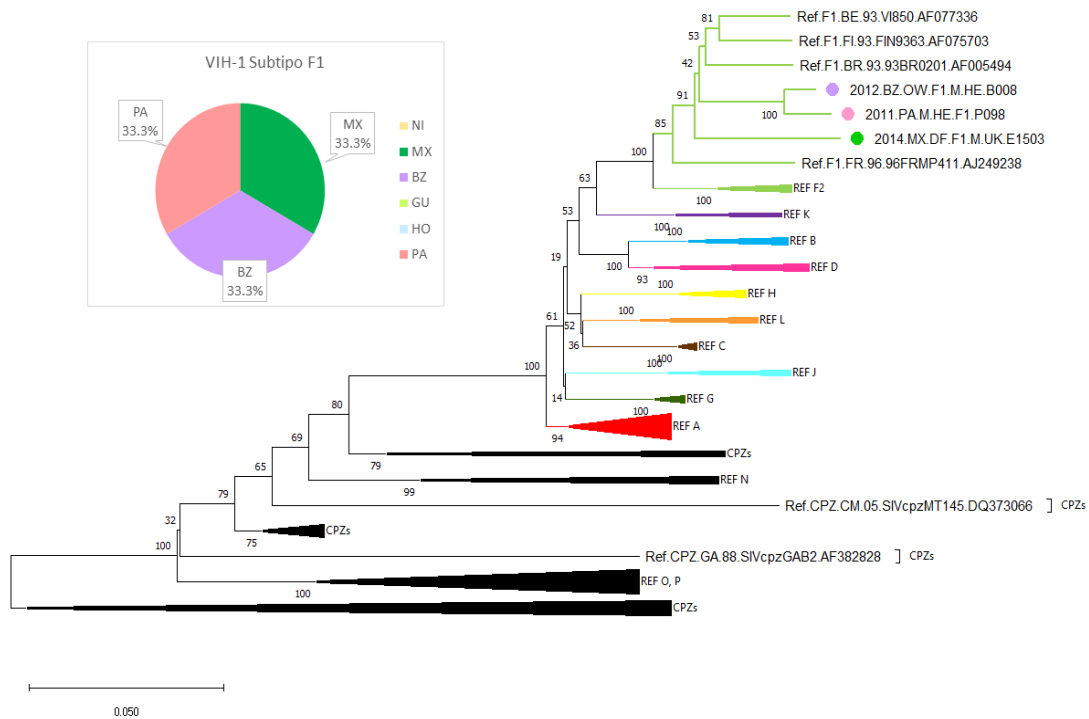


Figura 8. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo F1. Países en los que se encontró muestras del VIH-1 Subtipo F1: México (verde oscuro), Belice (lila) y, Panamá (rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este subtipo (n=3).

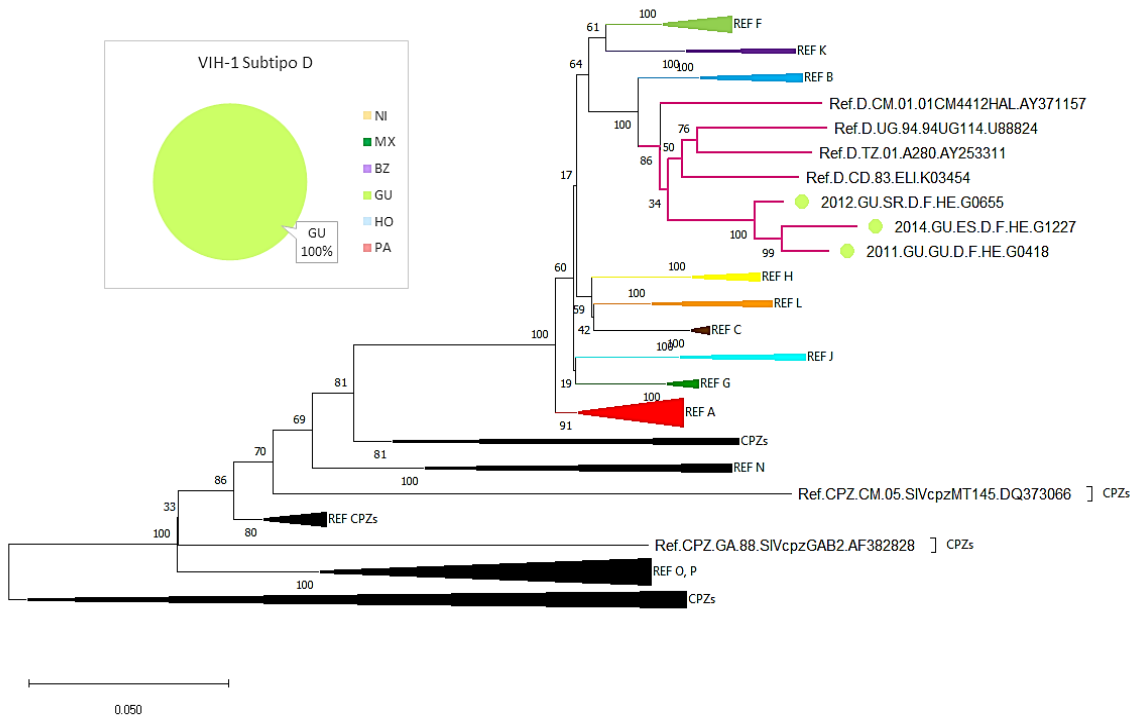


Figura 9. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo D. Países en los que se encontró muestras del VIH-1 Subtipo D: Guatemala (verde claro). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este subtipo (n=3).

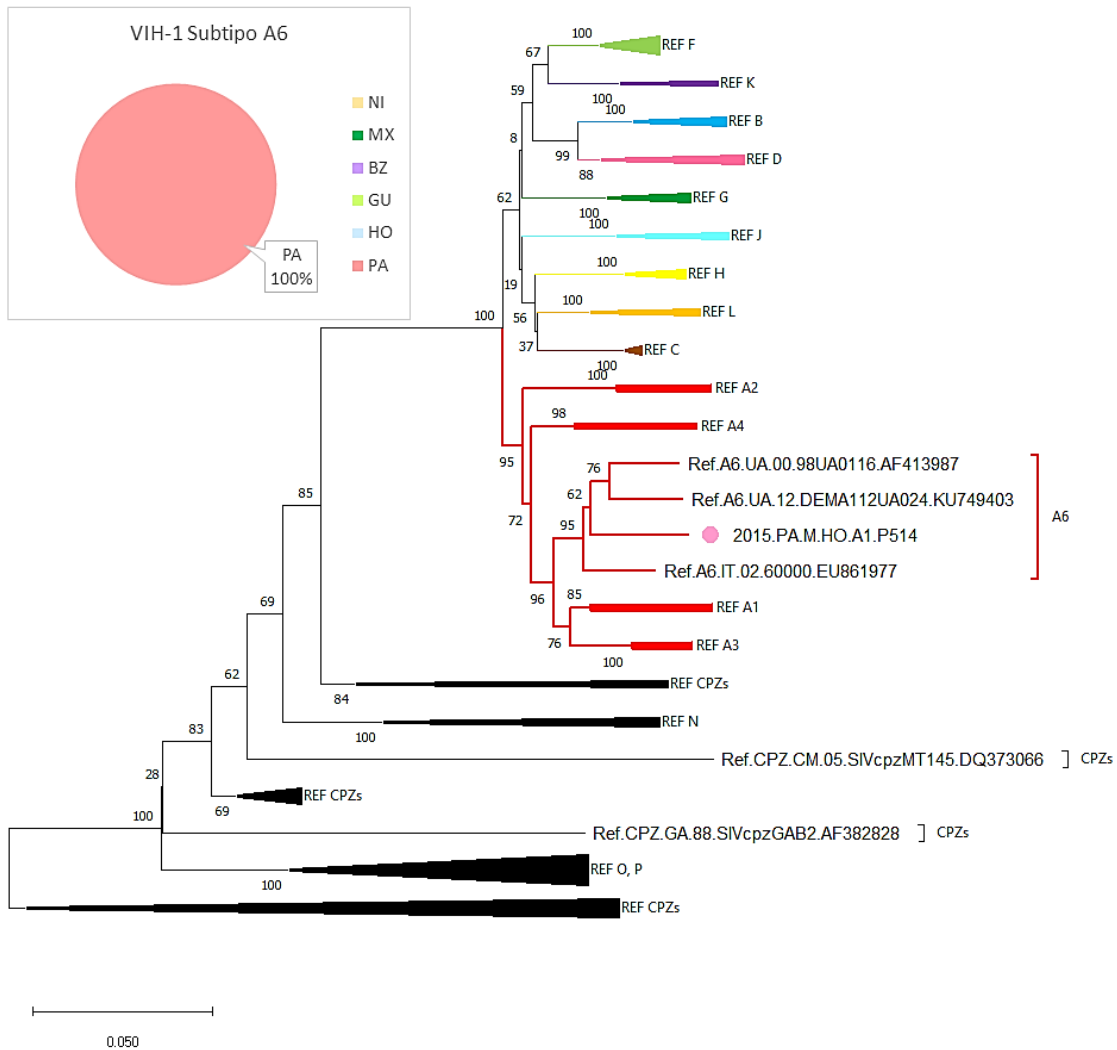


Figura 10. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como VIH-1 Subtipo A6. Nivel de confianza de 86. Países en los que se encontró muestras VIH-1 Subtipo A6: Panamá (circulo en rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este subtipo (n=1).

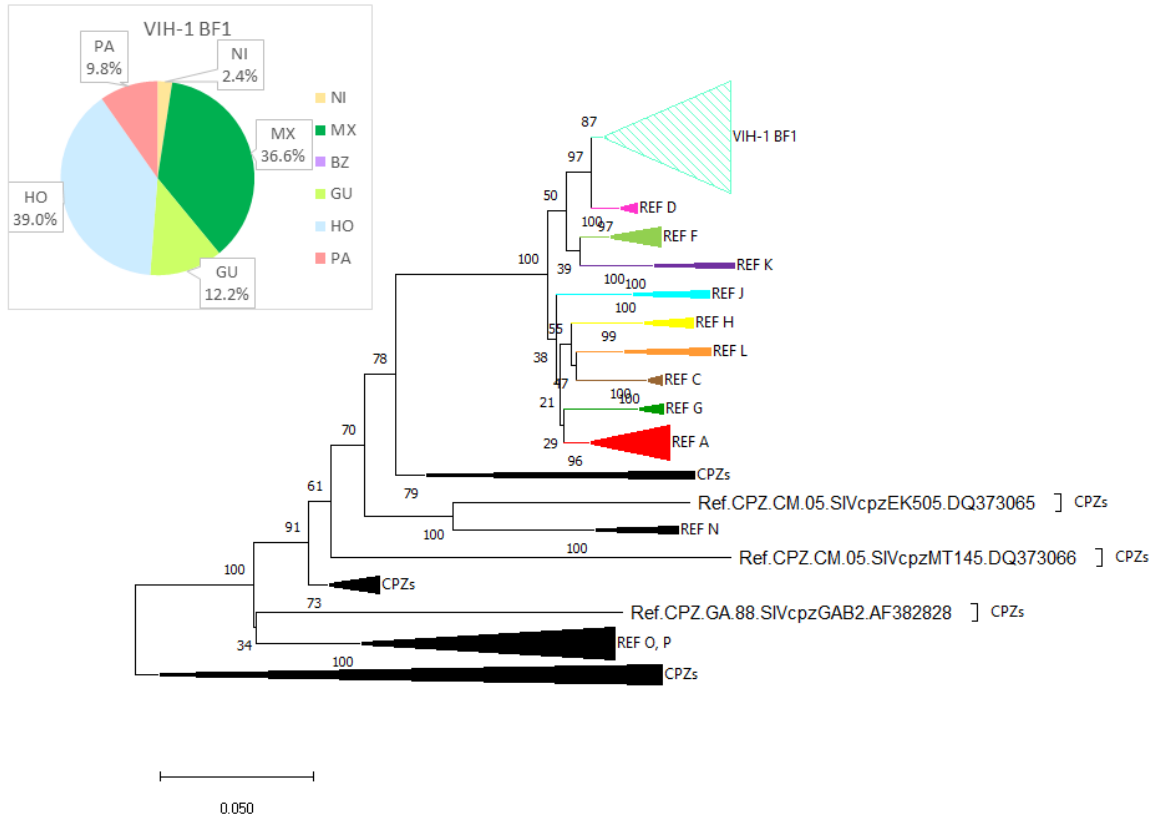


Figura 11. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como recombinante BF1. Nivel de confianza de 87. Países en los que se encontró muestras BF1: Nicaragua (amarillo), México (verde oscuro), Guatemala (verde claro), Honduras (celeste) y, Panamá (rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este recombinante (n=42).

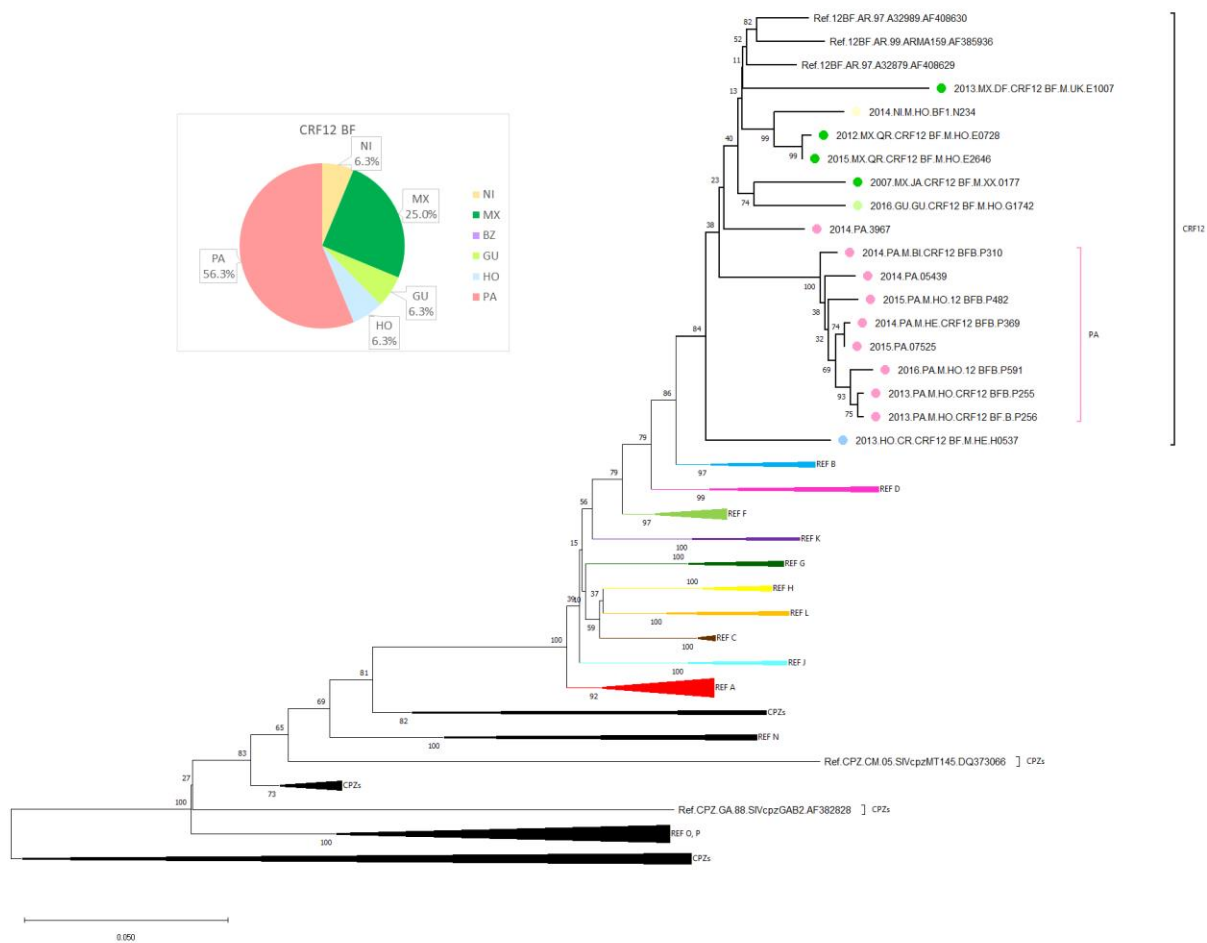
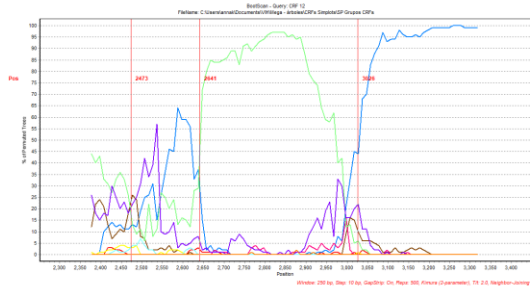
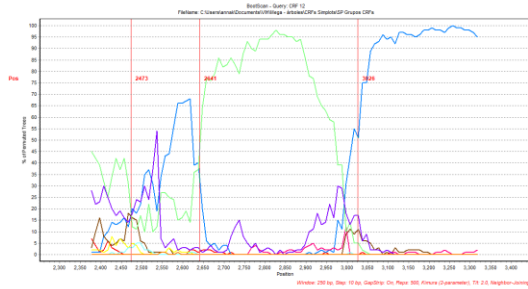


Figura 12. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF12. Países en los que se encontró muestras CRF12: Nicaragua (amarillo), México (verde oscuro), Guatemala (verde claro), Honduras (celeste) y, Panamá (rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este recombinante (n=16).

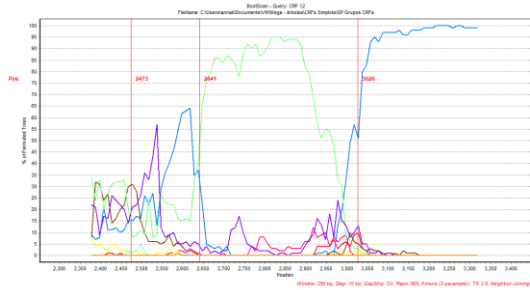
2014.PA.05439



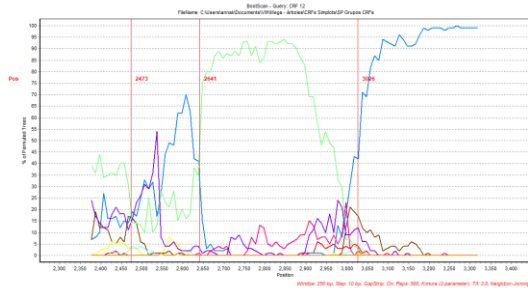
2014.PA.M.BI.CRF12_BF,B.P310



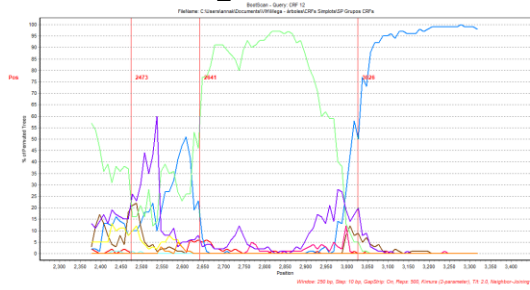
2016.PA.M.HO.12_BF,B.P591



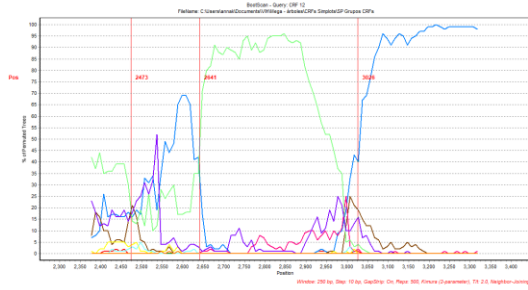
2013.PA.M.HO.CRF12_BF,B.P256



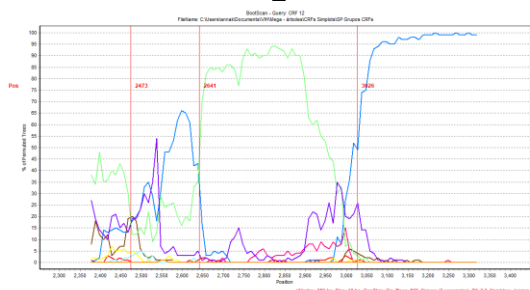
2015.PA.M.HO.12_BF, B.P482



2013.PA.M.HO.CRF12_BF,B.P255



2014.PA.M.HE.CRF12_BF,B.P369



2013.HO.CR.CRF12 BF.M.HE.H0537

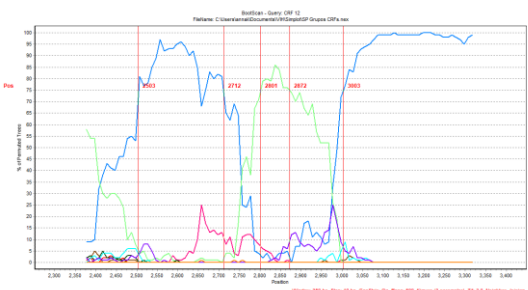


Figura 13.2. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF12_BF. En la primera fila se observa el patrón de recombinación descrito para el CRF12_BF y el bootscan de una muestra de referencia. En las demás filas se observa el bootscan de cada muestra analizada.

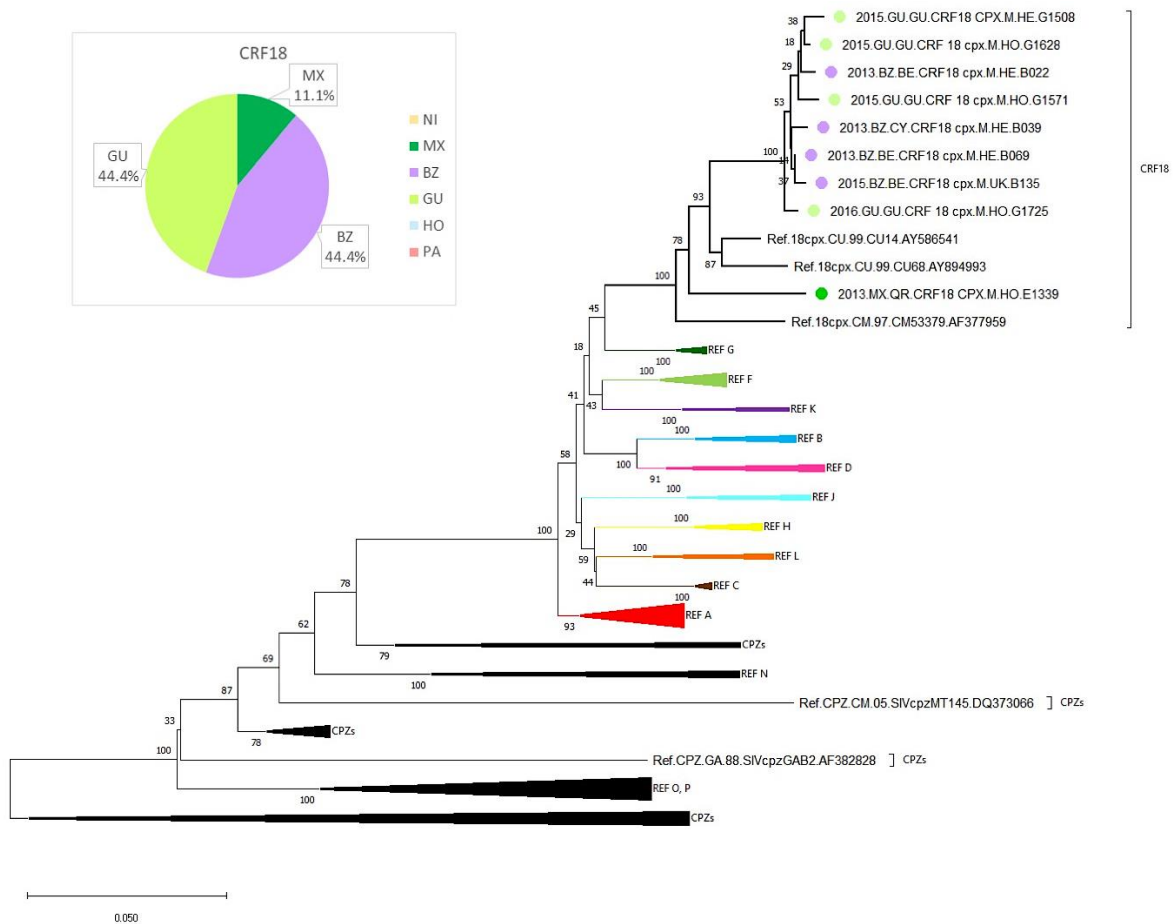


Figura 14. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF18_cpx. Países con este recombinante: México (verde oscuro), Belice (lila) y, Guatemala (verde claro). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este recombinante (n=9).

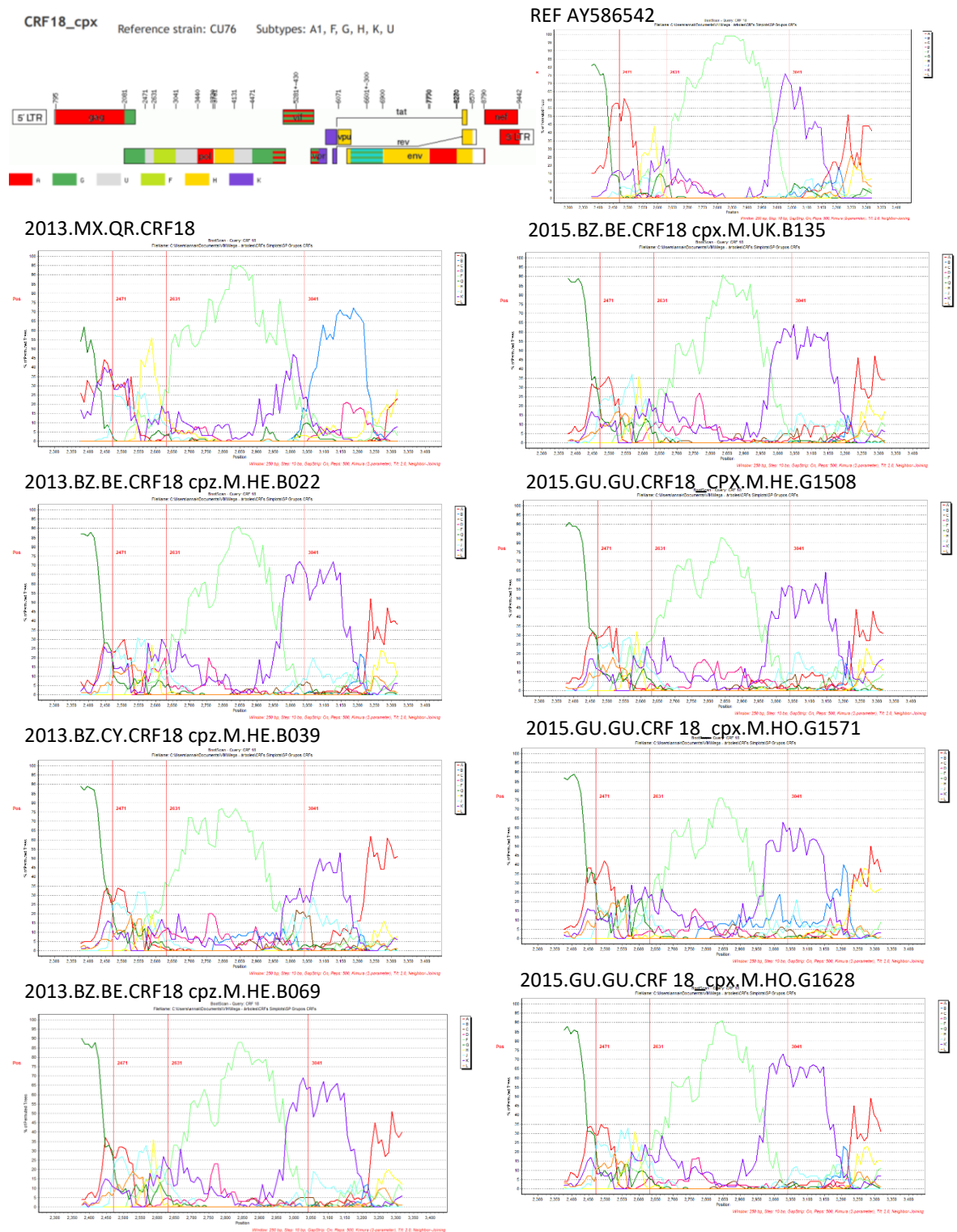


Figura 15.1. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF18_cpx, mostrando similar patrón de recombinación.

2016.GU.GU.CRF 18_cpx.M.HO.G1725

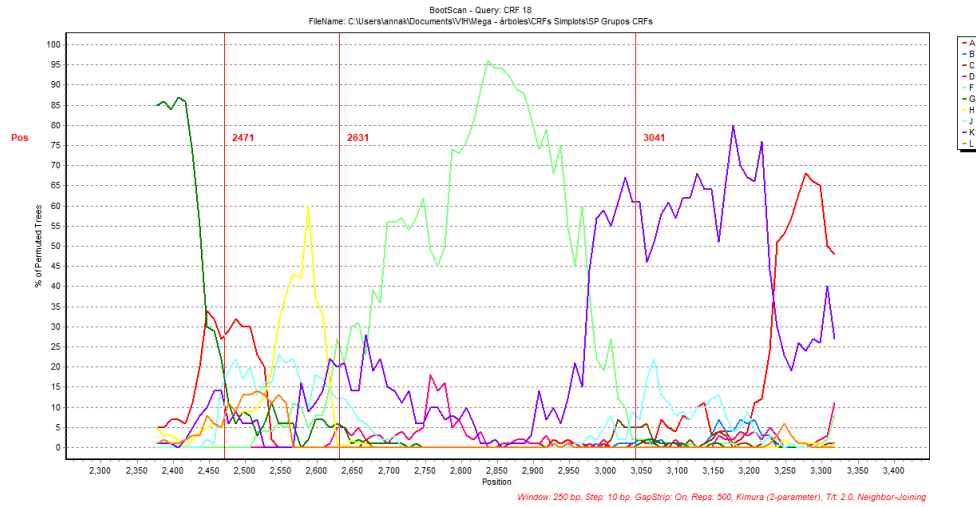


Figura 15.2. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF18_cpx, mostrando similar patrón de recombinación.

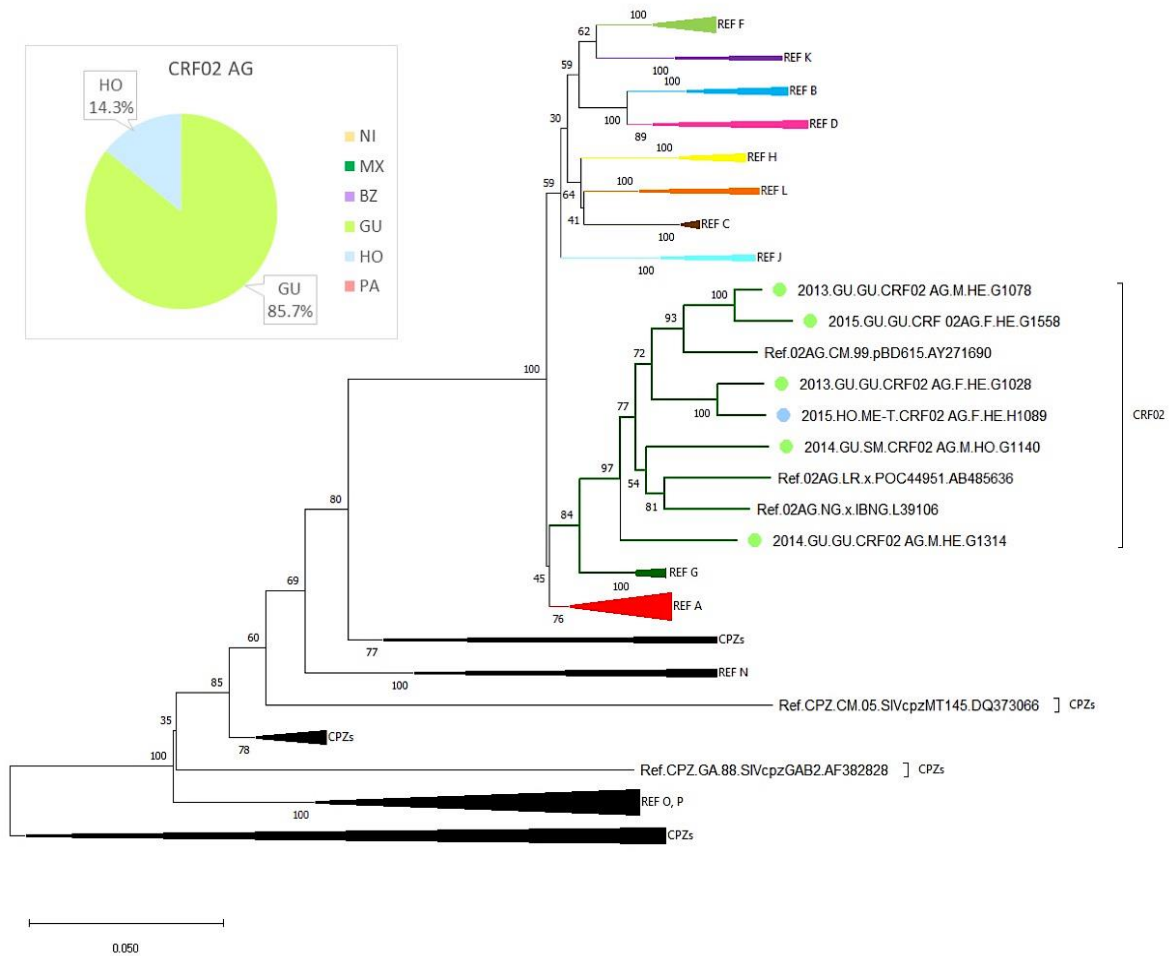


Figura 16. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF02_AG. Países en los que se encontró muestras CRF02_AG: Guatemala (verde claro) y Honduras (celeste). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este recombinante (n=7).

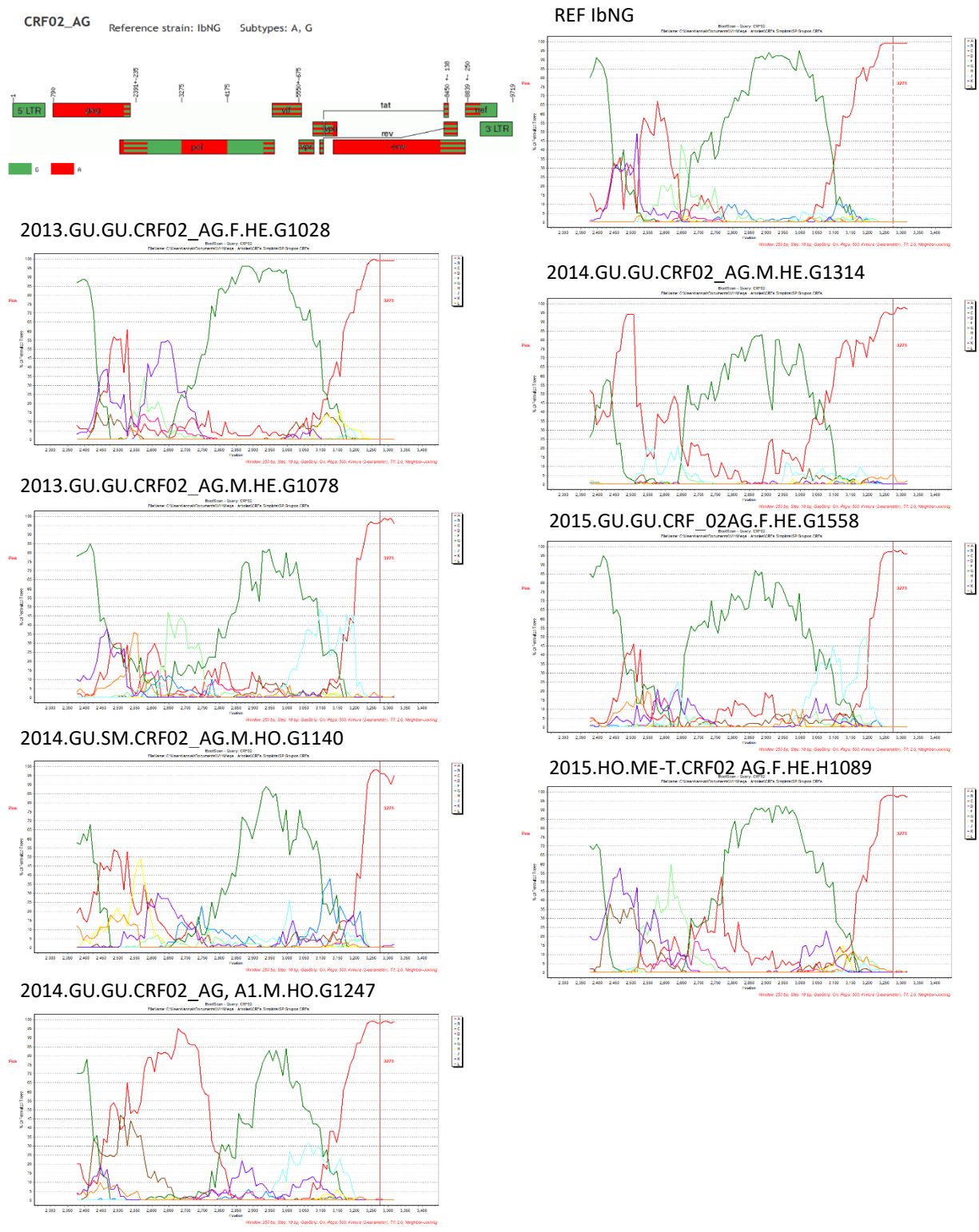


Figura 17. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF02_AG, mostrando un patrón de recombinación similar entre las secuencias.

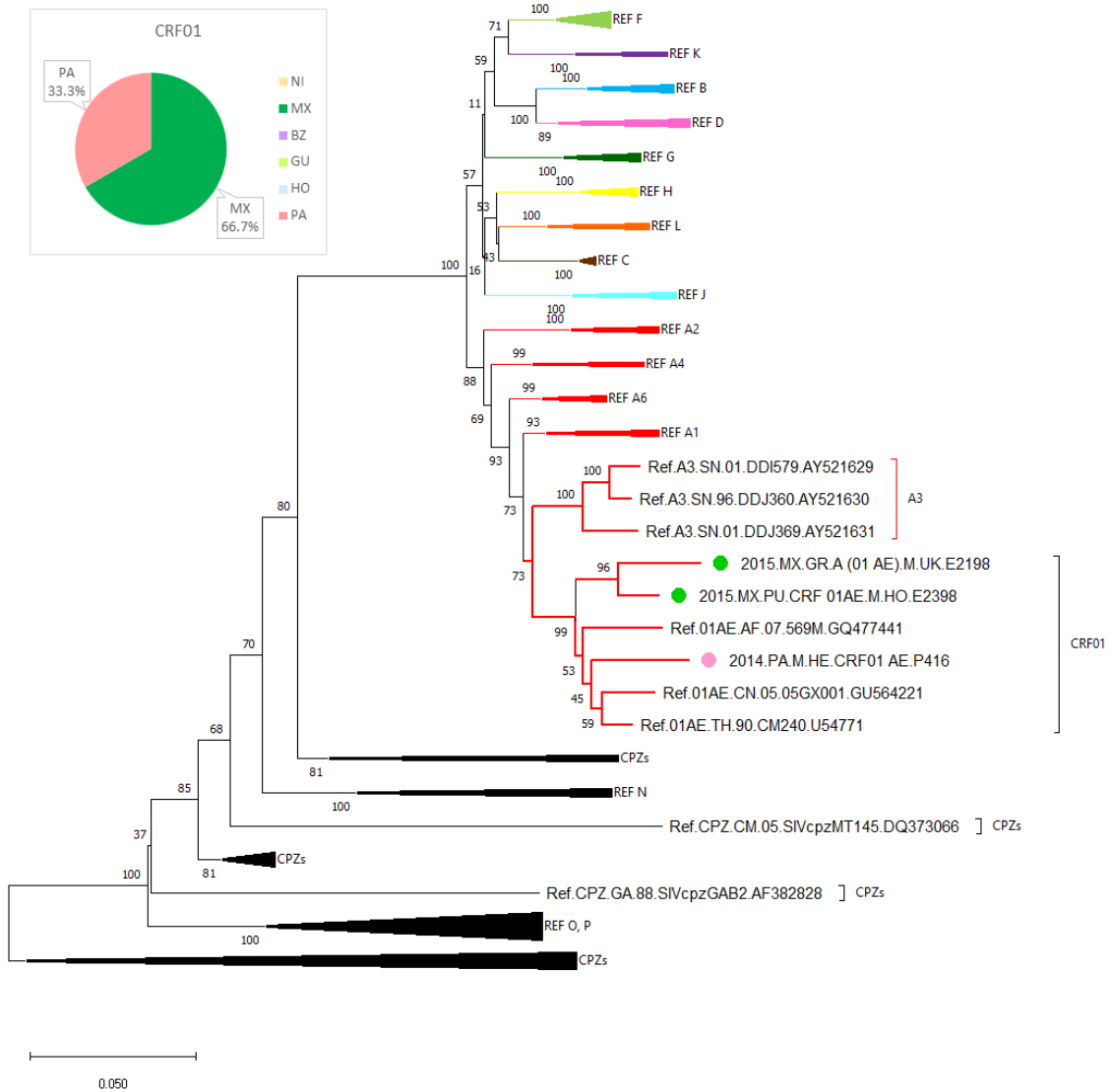


Figura 18. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF01_AE. Países en los que se encontró muestras CRF01_AE: México (círculo verde oscuro) y Panamá (círculo rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este recombinante (n=3).

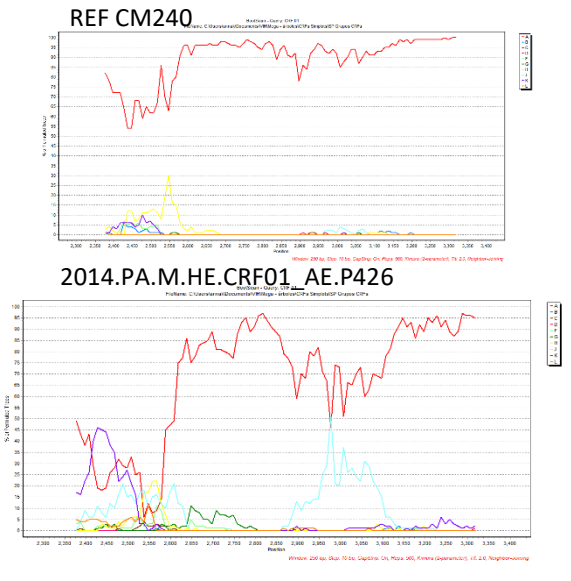
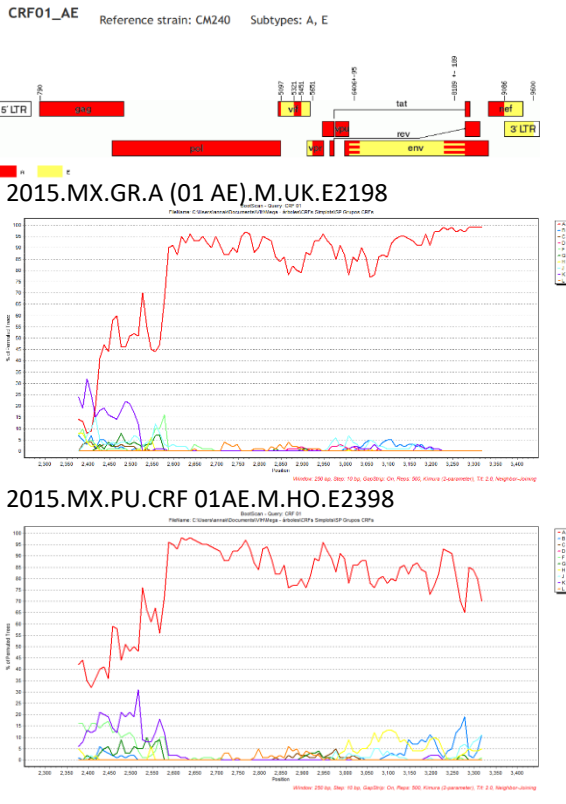


Figura 19. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF01_AE.

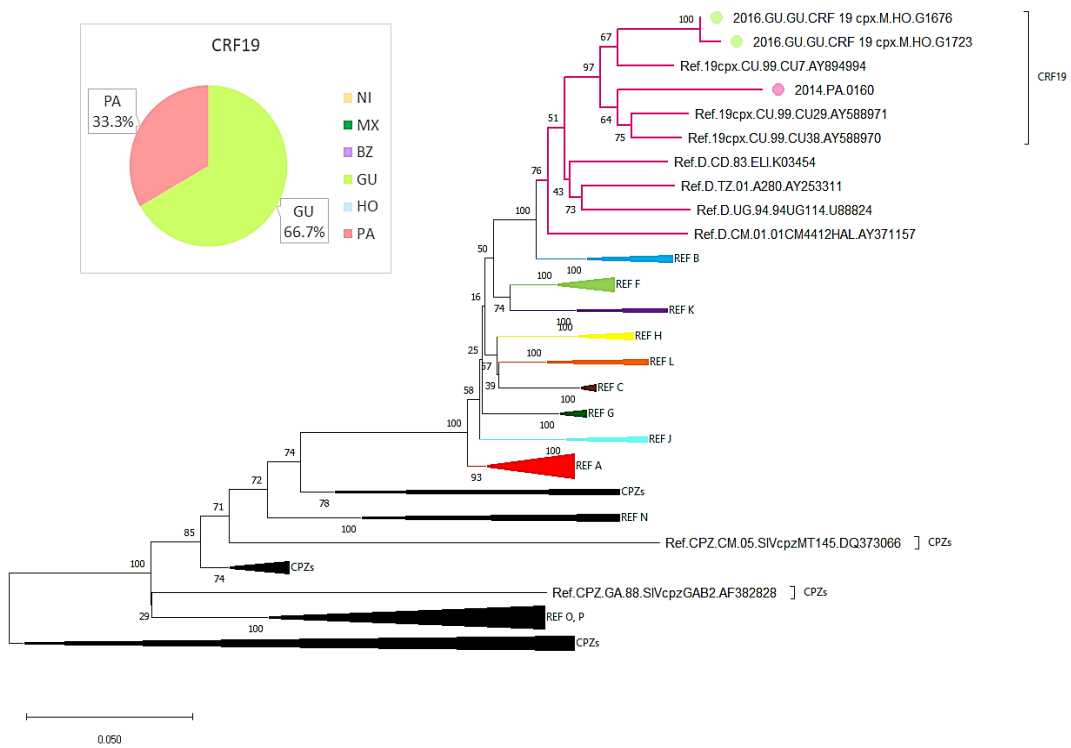


Figura 20. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF19. Países en los que se encontró muestras CRF19: Guatemala (verde claro) y Panamá (rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este recombinante (n=3).

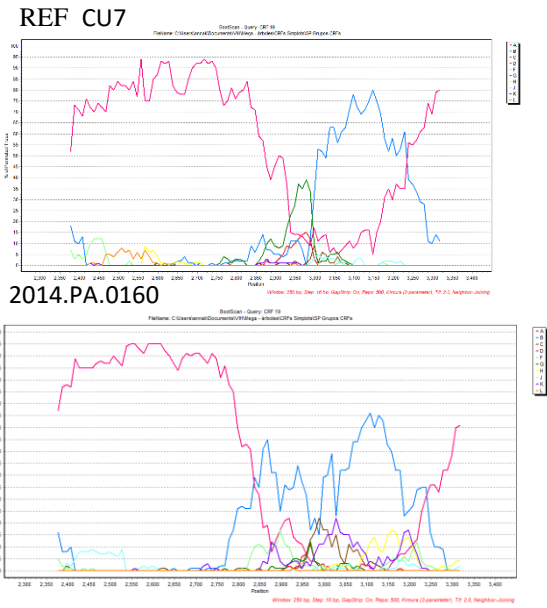
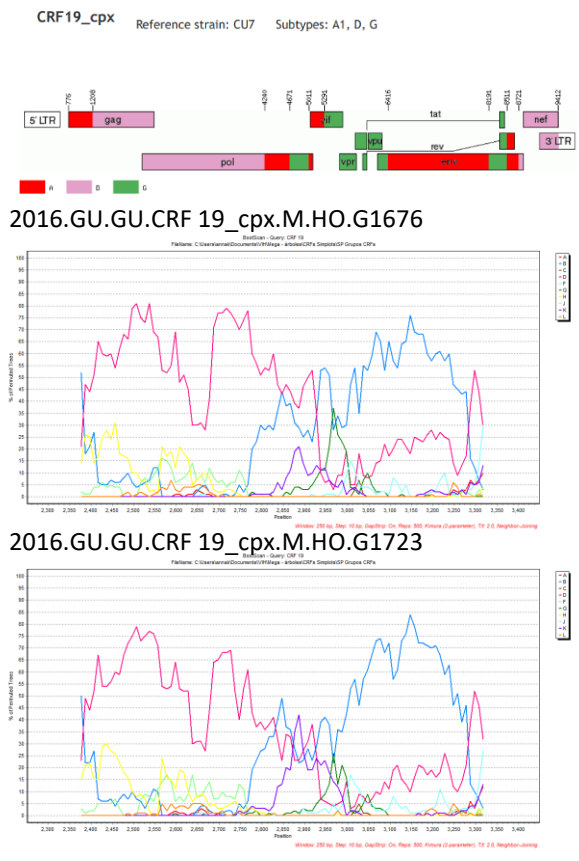


Figura 21. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF019_cpx.

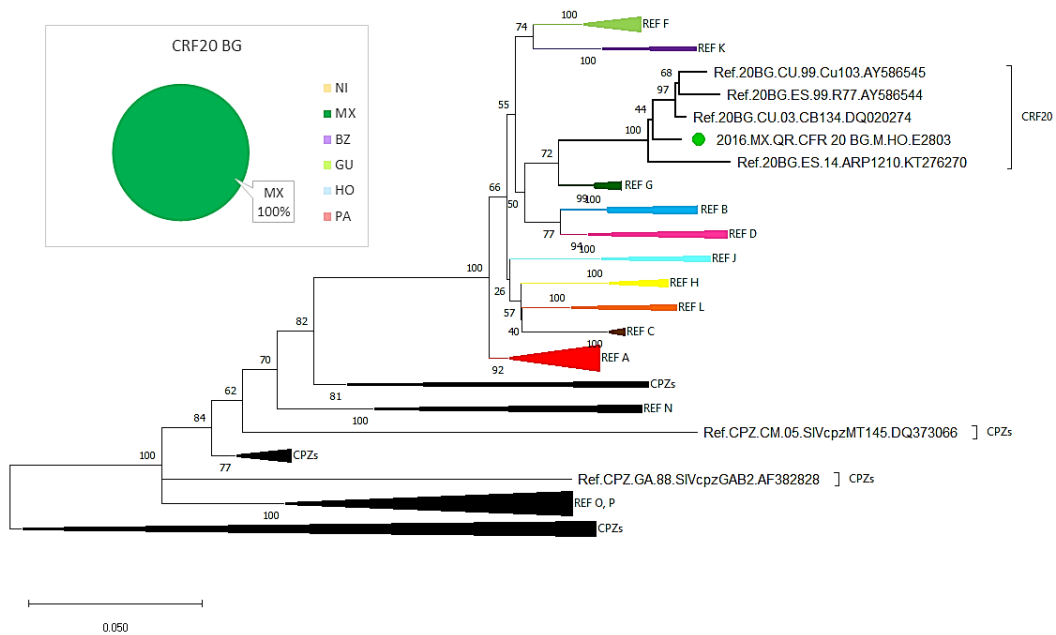


Figura 22. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF20 BG Países en los que se encontró muestras CRF20 BG: México (verde oscuro). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este recombinante (n=1).

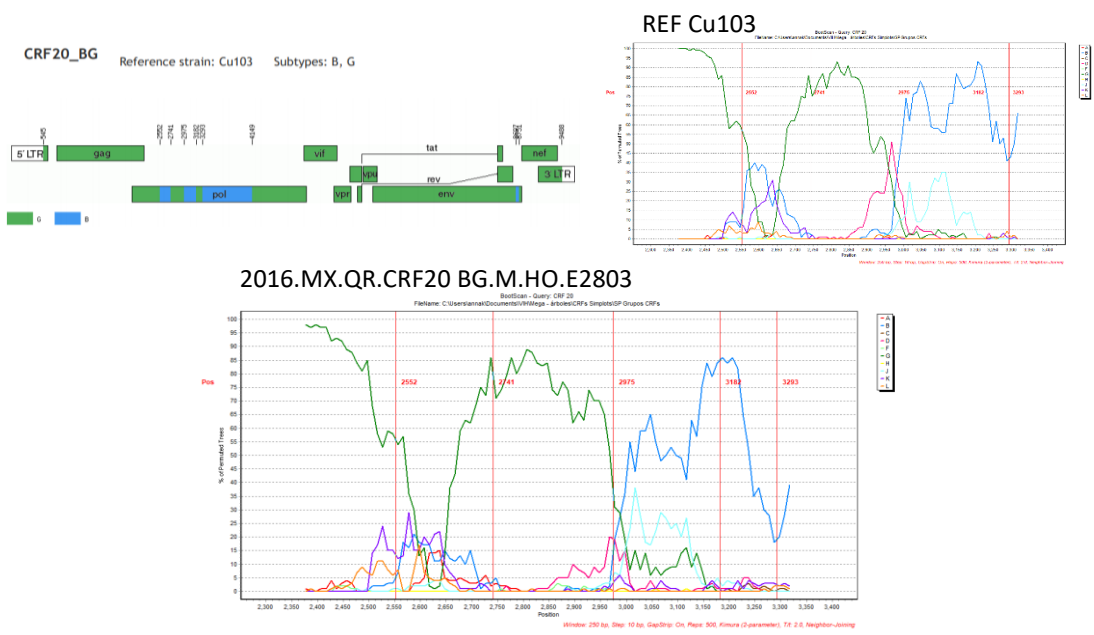


Figura 23. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF20_BG.

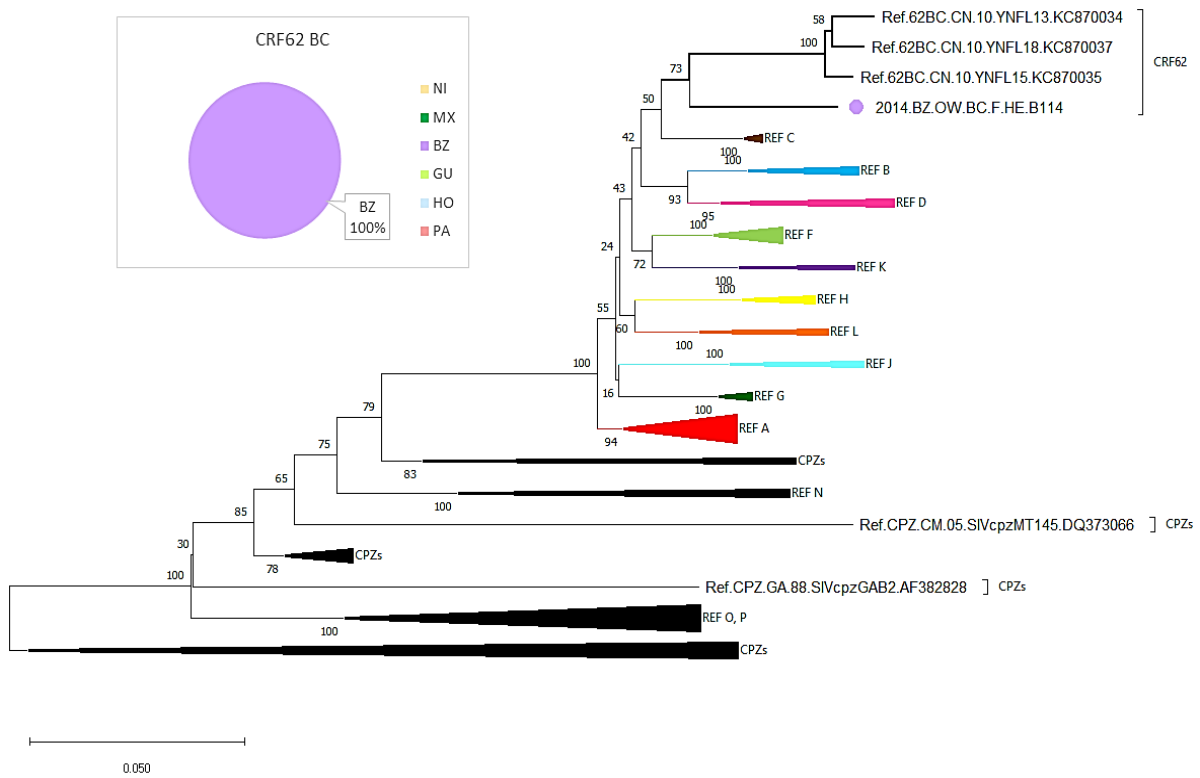


Figura 24. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como CRF62_BC. Países en los que se encontró muestras CRF62: Belice (lila). Los porcentajes están basados en el total de muestras para este recombinante (n=1).

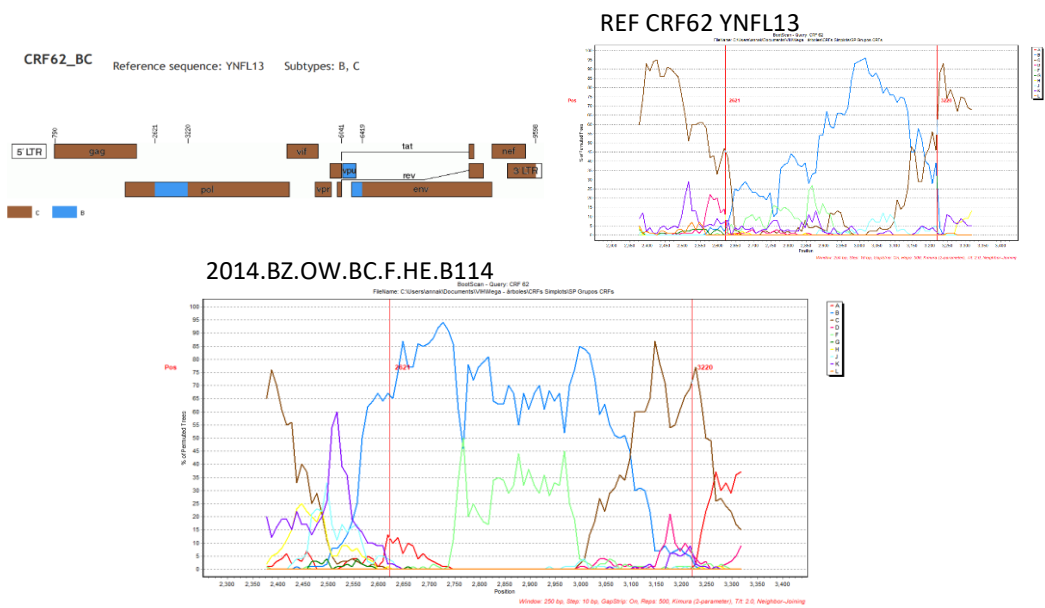


Figura 25. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como CRF62_BC.

Por último, con excepción de Nicaragua, se encontró adicional a las BF una forma única circulante (URF) en cada país estudiado, conformando el 1.5% (n=7) del total de muestras (Ver patrones de recombinación en la Figura 27). En la Figura 26 se agruparon estas secuencias únicas en un mismo árbol y se observa cómo no presentan un soporte aceptable para los subtipos puros, a excepción de la secuencia 2014.BZ.BE.BC.F.HE.B092, la cual de forma individual con las secuencias de referencia de subtipos puros cambia la topología del árbol, por lo que no puede ser considerada VIH-1 Subtipo C.

La secuencia 2014.MX.BC.BD.M.HE.E1688 presenta buen soporte para el subtipo B entre los puntos 2549 a 2742 y de 2895 a 3282; mientras que del punto 2253 al 2548, del 2742 al 2894 y del 3283 hacia el final de la región estudiada, el soporte es bajo en donde probablemente se dió recombinación. La secuencia 2014.BZ.BE.BC.F.HE.B092 presenta recombinación de los subtipos B y C, del punto de inicio 2253 al 2424 existe alto soporte para el subtipo B y del punto 2913 al 3224 existe soporte para el subtipo C; sin embargo, las regiones del punto 2425 al 2912 y el punto 3225 al final de la región estudiada no presenta soporte para un subtipo definitivo, donde puede haber más recombinación. La secuencia 2014.GU.GU.A1.M.BI.G1324 presenta soporte para el subtipo A en los puntos de 2385 a 2460, de 2674 a 3049 y de 3311 hasta el final de la secuencia estudiada (3450); sin embargo, el soporte es bajo para los espacios restantes entre estos puntos, dejando espacio para recombinación con otros subtipos. La secuencia 2013.HO.SM.A1.F.HE.H0250 presenta soporte en la mayoría de su secuencia para el subtipo A del punto 2719 al 3030 y del 3098 al final de la región estudiada; sin embargo, del punto 2253 al 2718 se observa claramente que otros subtipos están involucrados, pero ninguno muestra soporte

que defina esta región y del punto 3031 al 3097 el soporte es bajo para el subtipo A, donde también puede haber recombinación. La secuencia 2016.PA.4635 es en su gran mayoría una clara recombinación de subtipos, probablemente en su mayoría de B; sin embargo, este subtipo no presenta suficiente soporte ni ningún otro hasta llegada la posición 3086 a la 3140 que podemos clasificar como perteneciente a B y brevemente otra vez en un solo punto (3260), también de soporte alto para el subtipo B.

La secuencia 2013.BZ.BE.BC.F.HE.B028 presenta recombinación BC con soporte alto para el subtipo C de la posición 2384 a la 2487 y para el subtipo B de la 2880 al final de la región estudiada (con breves pérdidas de soporte alrededor del punto 2964), lo que deja la región entre el punto 2488 al 2879 como probable área de recombinación, posiblemente entre estos mismos subtipos. Por último, la secuencia 2014.BZ.OW.BC.F.HE.B113 solo presenta una breve parte de su secuencia con soporte para el subtipo C del punto 3294 al 2498, el resto de la secuencia se interpreta como recombinante hasta el punto 3009 donde se observa soporte alto para el subtipo B hasta terminada la región estudiada.

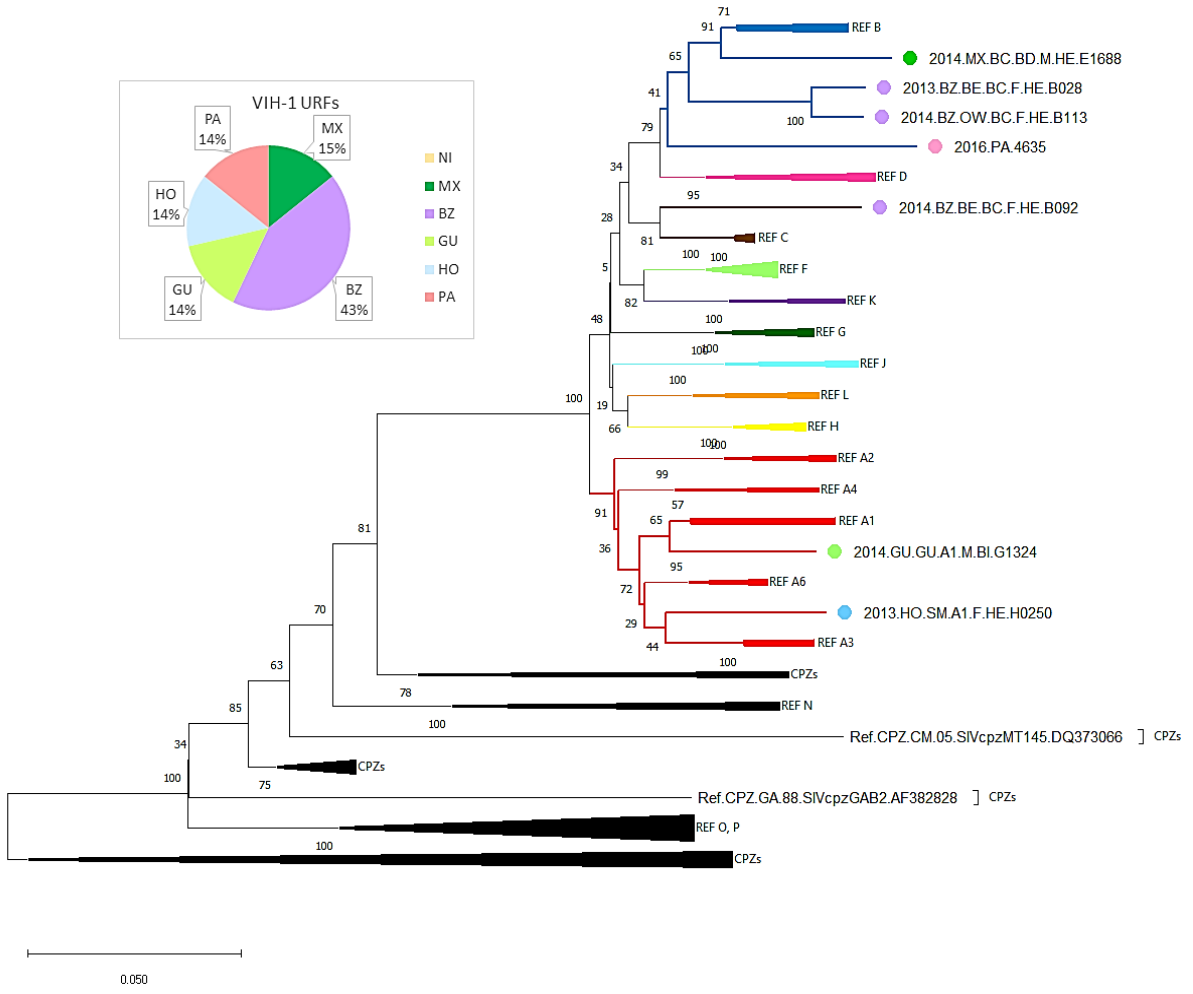
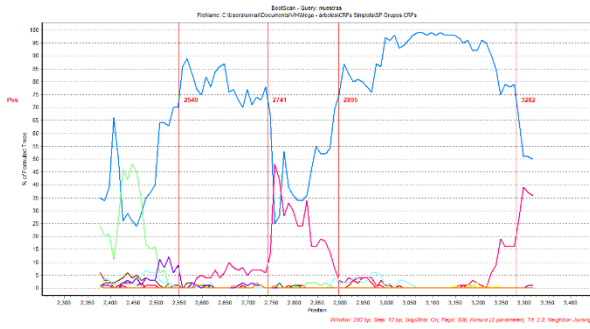
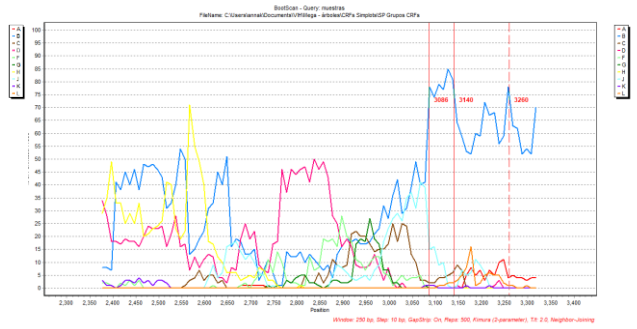


Figura 26. Árbol Filogenético Neighbor-Joining del gen *pol* de VIH-1 de secuencias identificadas como URFs. Países en los que se encontró secuencias recombinantes únicas: México (verde oscuro), Guatemala (verde claro), Belice (lila), Honduras (celeste) y, Panamá (rosado). Los porcentajes están basados en el total de muestras identificadas como URF (n=7).

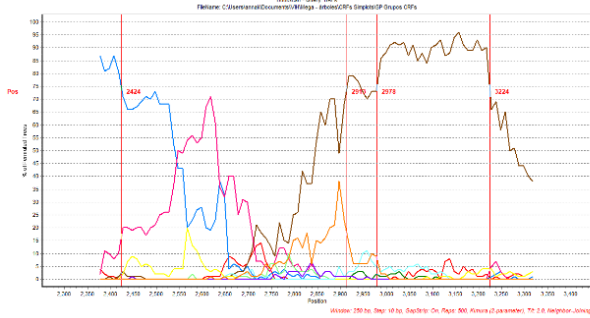
2014.MX.BC.BD.M.HE.E1688



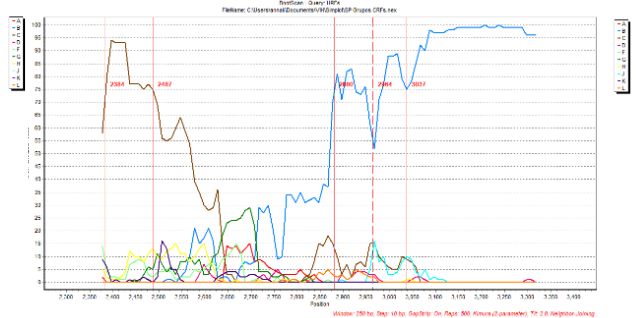
2016.PA.4635



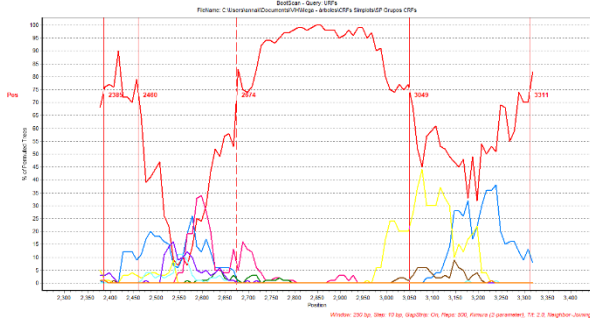
2014.BZ.BE.BC.F.HE.B092



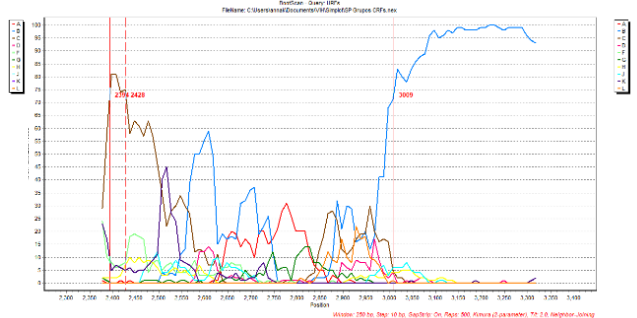
2013.BZ.BE.BC.F.HE.B028



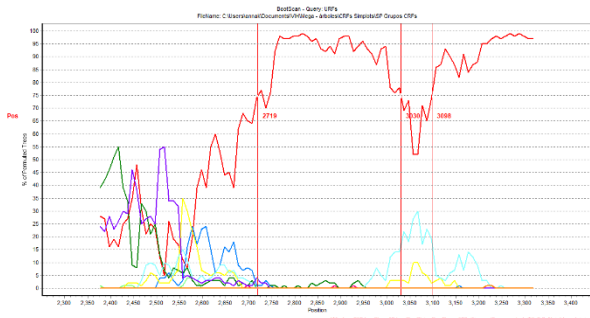
2014.GU.GU.A1.M.BI.G1324



2014.BZ.OW.BC.F.HE.B113



2013.HO.SM.A1.F.HE.H0250



2013.NI.M.HO.BF1.N183

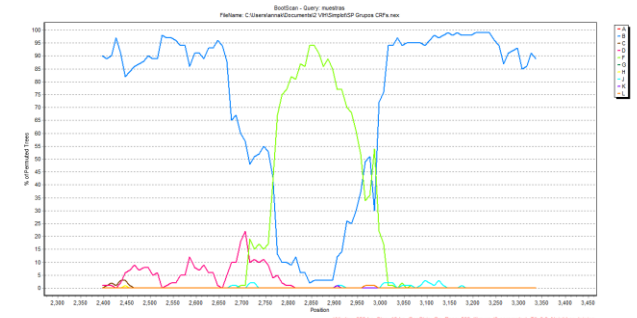


Figura 27.1. Análisis por Bootscon del programa Simplot de las secuencias identificadas como URFs.

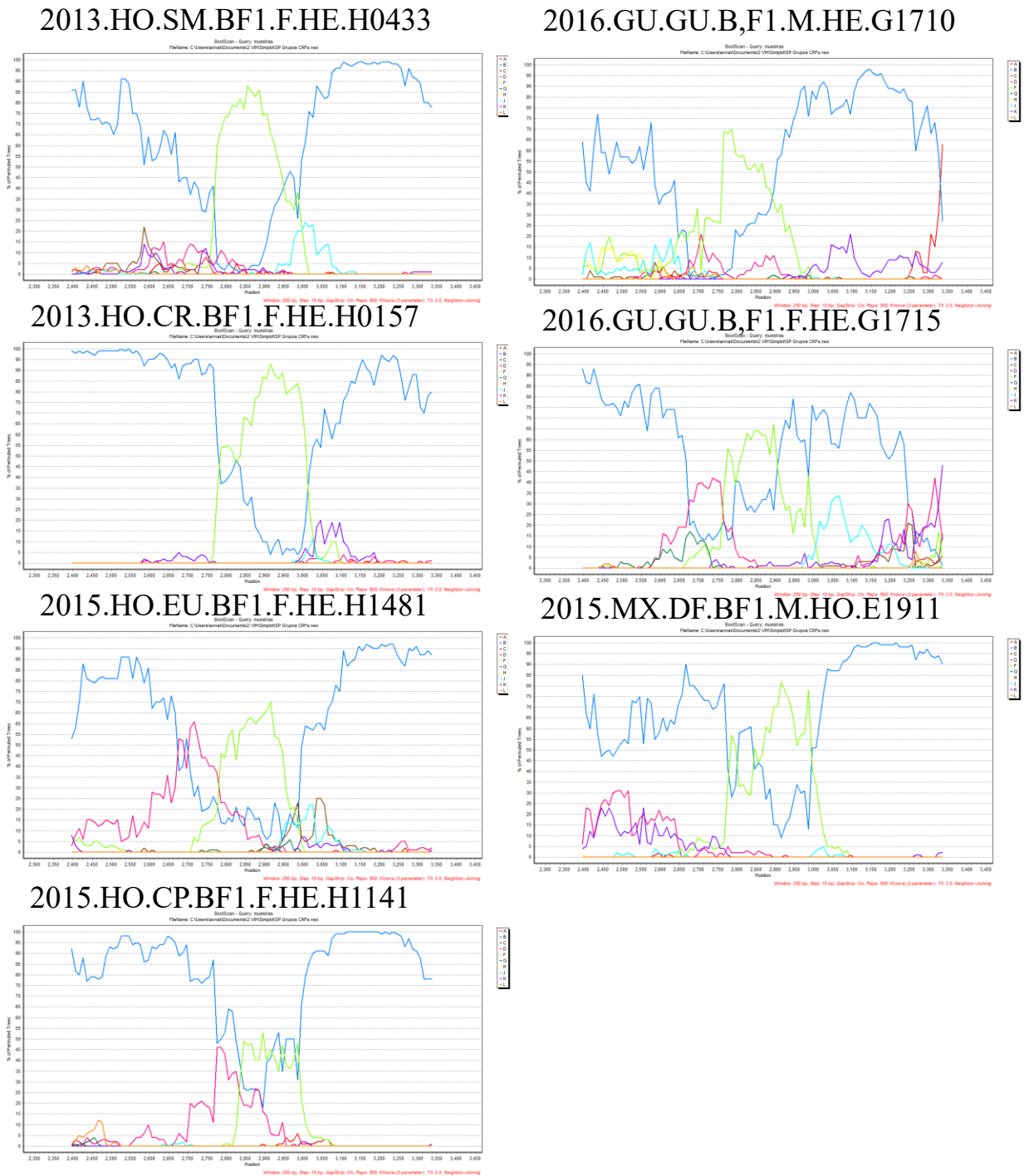


Figura 27.2. Análisis por Bootscan del programa Simplot de las secuencias identificadas como URFs_{BF}.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1. Subtipos “Puros”

El objetivo principal de este trabajo de tesis es identificar 470 secuencias del gen *pol* de VIH-1 provenientes de seis países de Mesoamérica (Nicaragua, México, Belice, Guatemala, Honduras y Panamá) obtenidas entre 2011 a 2016, mediante el uso de herramientas bioinformáticas como lo son los análisis filogenéticos y el análisis de patrones de recombinación en el caso de las variantes recombinantes.

Se identificó al 69% (n=324) del total de las muestras analizadas (n=470) como VIH-1 Subtipo B. Este subtipo se constituye en la forma más predominante de la cohorte, en concordancia con los datos epidemiológicos reportados para la región Mesoamericana (Ahumada-Ruiz *et al.*, 2009; Candal *et al.*, 1997; Elangovan *et al.*, 2021; Hemelaar *et al.*, 2019; Mendoza *et al.*, 2018; Mendoza, Martínez, *et al.*, 2014; Murillo *et al.*, 2013). Cabe destacar que, en este trabajo de tesis, en Belice (n=38) el subtipo B no fue el más predominante ya que solo dos de sus secuencias son de este subtipo (Murillo *et al.*, 2013).

Por otra parte, aunque el VIH-1 Subtipo C fue el segundo subtipo puro más prevalente. Su prevalencia fue mucho menor (9.8%, n=46/470) a la del VIH-1 Subtipo B, ya que en la mayoría de los países de este estudio se identificó en muy bajas proporciones, de forma similar a estudios anteriores donde este subtipo solo se reportó en una secuencia dentro de cada cohorte (Lloyd *et al.*, 2008; Mendoza, Bello, *et al.*, 2014). Sin embargo, Belice nuevamente contrasta porque la mayoría de sus secuencias (90%, n=27/30) fueron identificadas como VIH-1 Subtipo C, proporcionando un 58.7% de las secuencias identificadas como este subtipo. Cabe destacar que en

el árbol filogenético del VIH-1 Subtipo C observamos un agrupamiento de secuencias según el territorio del cual provenían, de forma que la mitad de las secuencias provenientes de Belice formaron un clado propio separado de las demás secuencias. Considerando que los resultados de Belice demostraron una dinámica opuesta a la de los demás países de la región y dada la escasez de estudios filogenéticos de este país, sería de interés que se realizara un estudio enfocado a este país con un mayor número de muestras para comprender mejor la situación epidemiológica del virus.

Los VIH-1 Subtipo B y VIH-1 Subtipo C no solo fueron los más prevalentes, sino que, además, fueron registrados en este trabajo como los más dispersos, ambos identificados con al menos una secuencia en cada uno de los seis países estudiados. Sin embargo, la prevalencia disminuye considerablemente, con el tercer subtipo puro más observado, ya que el VIH-1 Subtipo G (n=4) solo fue identificado en el 0.85% del total de secuencias (n=470). Estas secuencias además solo provenían de México, lo que concuerda con la ausencia de reportes para este subtipo en otros estudios de la región mesoamericana. Así mismo, el VIH-1 Subtipo F1 (n=3) solo es el 0.64% del total de secuencias y es el tercer subtipo puro más disperso de este trabajo al reportar una secuencia en tres países: Belice, México y Panamá. El VIH-1 Subtipo F1 solo se ha reportado previamente para Panamá, posiblemente proveniente de Brasil (Mendoza, Bello, *et al.*, 2014). Dentro del árbol del VIH-1 Subtipo F1 se observa además que las secuencias de Panamá y Belice presentan una muy alta afinidad, lo que podría inferir una relación estrecha entre estas secuencias, aunque un estudio filogenético con secuencias provenientes de Sur América sería necesario para corroborar esta observación. Para mejorar nuestra comprensión sobre los factores que influyen en la evolución del virus, sería de interés mantener un seguimiento del VIH-1 Subtipo F1 el cual está disminuyendo

su prevalencia, siendo reemplazado por posibles nuevas recombinantes BF que surgen al interactuar con el VIH-1 Subtipo B (Souza *et al.*, 2019a).

El VIH-1 Subtipo D (n=3) también demuestra una baja prevalencia con solo un 0.64% al total de secuencias, con una menor distribución al identificarse en secuencias provenientes solo de Guatemala. Esto demuestra un aumento en la diversidad del virus en Guatemala ya que para este país no se encontraron reportes anteriores de este subtipo. Además, podría inferir un aumento en el intercambio de secuencias con su país vecino México, de donde sí existe reporte del subtipo (Guerra-Palomares *et al.*, 2016).

Por último, los análisis filogenéticos lograron evidenciar la existencia de una secuencia identificada como sub-subtipo A6, proveniente de Panamá. Si bien existen reportes del VIH-1 Subtipo A en Mesoamérica, este resultado fue inesperado al ser el primer reporte de la variante A6 en la región mesoamericana, hasta el momento prevalece en el territorio ruso (Kirichenko *et al.*, 2020; Lara *et al.*, 1997). De estos resultados se puede concluir que a excepción del VIH-1 Subtipo B, la prevalencia de secuencias no recombinantes es baja.

4.2. Recombinantes

Una porción considerable de 42 secuencias fue identificada como VIH-1 BF, también conocido como el recombinante dual más frecuente del VIH-1, producto del subtipo VIH-1 Subtipo B y el VIH-1 Subtipo F1, identificado en varios países de Sudamérica, principalmente Brasil donde se le reconoce como el tipo de recombinante más común (Delgado *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2019a).

Así mismo, también se le han reportado recombinantes VIH-1 BF en estudios de Mesoamérica (Ahumada-Ruiz *et al.*, 2009; Mendoza, Bello, *et al.*, 2014; Vázquez-Valls *et al.*, 2010). El recombinante VIH-1 BF representó en este estudio el 8.9% (n=42/470) del total de secuencias y el 47% del grupo de secuencias recombinantes (n=42/89), lo que le convierte en el recombinante más prevalente del estudio, además su alta dispersión al identificarse en secuencias provenientes de cinco de los países estudiados (Nicaragua, México, Guatemala, Honduras y Panamá). Sin embargo, se debe notar que en este estudio esta variante fue identificada mayormente en secuencias provenientes de Honduras (n=17) y México (n=15), mientras que en los demás países no fue tan prevalente presentando solo 5 secuencias provenientes de Guatemala y 4 de Panamá, una de Nicaragua y ninguna de Belice. La falta de esta recombinante en Belice puede interpretarse como una consecuencia de la baja circulación de los subtipos parentales de este recombinante que hemos observado en los resultados de este análisis, considerando que solo se identificaron dos secuencias del VIH-1 Subtipo B y una del VIH-1 Subtipo F1. Aun así, las secuencias VIH-1 BF resultaron ser el recombinante más distribuido al encontrarse en cinco de los seis países estudiados.

Dentro de las formas recombinantes circulantes registradas en la base de datos Los Alamos (denominadas como CRFs), se observa que en este estudio el CRF12_BF fue el más prevalente, en adición a ser el CRF más disperso al identificarse en secuencias provenientes de cinco de los países estudiados (Nicaragua, México, Guatemala Honduras y Panamá). Este CRF cuenta con reportes anteriores en Panamá, sin embargo no se encontró reportes de los demás países del estudio (Ahumada-Ruiz *et al.*, 2009; Mendoza, Bello, *et al.*, 2014). Además, en el árbol filogenético del CRF12_BF se denota una agrupación clara de todas las secuencias de Panamá formando un clado individual del país con excepción de la secuencia 2014.PA.3967 que resultó aislada, lo que nos

sugiere que estas secuencias posiblemente desciendan de una misma introducción en común. Dado que el análisis solo fue de la región *pol* en vez del genoma completo, se dificultó la determinación certera de secuencias recombinantes que demostraron alta afinidad a las REF del VIH-1 CRF12_BF; sin embargo, se contó con la suficiente información para identificar a la mayoría de las secuencias en el estudio con precisión.

La dispersión de cada variante depende de diversos y complejos factores que pueden ser tanto socioeconómicos (migración, nivel económico, capacidad para viajar, entre otros) como biológicos, refiriéndonos con este último a diferencias entre las características del huésped, su ambiente y entre los subtipos y sus capacidades de transmisión y patogenicidad (Hemelaar, 2012; Sharp & Hahn, 2011). Tomando en cuenta el impacto de estos factores se entiende por qué el CRF18_cpx, tercer recombinante más prevalente, fue observado en tres países que resultan ser vecinos directos entre sí: Guatemala, Belice y México, este último con reportes del mismo en estudios previos (Guerra-Palomares *et al.*, 2016; Hernandez-Sanchez *et al.*, 2018). Dadas estas circunstancias donde las poblaciones se relacionan física y socialmente, con barreras menores se incrementa la probabilidad de transmisión entre ellas. Por otro lado, los países Guatemala y Honduras exhibieron un comportamiento repetido de agrupamiento en cada árbol construido donde se incluyeran muestras de ambos países, donde el mejor ejemplo se observa en la figura del árbol del CRF02_AG, demostrando lo que se puede interpretar como un intercambio continuo de variantes entre los dos territorios; lo que es de esperarse considerando la cercanía entre ambos países. Sin embargo, se requeriría de un estudio más detallado con un tamaño de muestra mayor para definir con certeza la validez de esta posible relación. Entre los CRFs menos prevalentes se observa que el CRF01_AE solo representó 0.64% del total de muestras, dos en México y uno en

Panamá, así como el CRF19_cpx con dos en Guatemala y uno en Panamá. Sin embargo, los recombinantes CRF20_BG y CRF62_BC demostraron la menor prevalencia aportando tan solo el 0.21% (n=1/470) del total de las secuencias.

El estudio filodinámico del virus nos proveerá de la información necesaria para entender cómo la epidemia ha evolucionado con el tiempo y determinar su efecto sobre los esquemas de tratamientos antirretrovirales recomendados por cada país y la efectividad de las estrategias de prevención (Hemelaar *et al.*, 2019; Volz *et al.*, 2013). La clasificación de las secuencias analizadas demostró una distribución y diversidad de los subtipos de VIH-1 y sus variantes con dinámicas distintas entre los países involucrados. Los países México, Guatemala y Panamá presentaron mayor diversidad de CRFs, siendo identificados al menos cuatro CRFs distintos dentro de sus secuencias, a diferencia de los otros países Nicaragua, Belice y Honduras donde se encontraron tres o menos CRFs distintos en cada país. Así mismo, los países México, Guatemala, Panamá también lideraron en cuanto a la prevalencia de secuencias identificados como CRF al aportar cada uno 25, 20 y 18 muestras de tipo recombinantes, respectivamente; mientras que Nicaragua, Honduras y Belice presentaron la menor cantidad de secuencias recombinantes, con solo 2, 2 y 6, respectivamente. Considerando lo anterior, aún cuando Belice se encuentra entre los países con menor prevalencia y diversidad de formas recombinantes, fue el único país que aportó más de una forma única circulante (URF) al estudio (n=3/7), mientras los países México, Guatemala, Honduras y Panamá solo presentaron una secuencia cada uno y Nicaragua ninguno. Nuestro estudio contribuye a una mejor comprensión de la diversidad genética de las variantes que circulan en la región mesoamericana.

Existen diversas diferencias entre subtipos, de forma que cada uno presenta sus propias implicaciones a la hora de su diagnóstico y tratamiento (Gaschen *et al.*, 2002; Parczewski *et al.*, 2021; Santoro & Perno, 2013). Por ejemplo, el VIH-1 Subtipo D está asociado a un mayor índice de mortalidad (en comparación a los VIH-1 Subtipo A y VIH-1 Subtipo C) debido a que los individuos infectados con este subtipo presentan una mayor rapidez en la disminución de células CD4 (Bousheri *et al.*, 2009; Parczewski *et al.*, 2021). Además, las mutaciones de resistencia a los antirretrovirales varían en número y frecuencia entre los distintos subtipos (Donald S. Burke, 1997). El VIH-1 Subtipo C, además de ser otro de los subtipos más agresivos durante la progresión de la enfermedad en comparación a los demás subtipos, presenta polimorfismos con mayor prevalencia de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos, una de las clases de antirretrovirales más comúnmente utilizadas, especialmente en países de bajos recursos, de forma que un aumento en la transmisión de estas mutaciones representa un riesgo para el efectivo manejo de la enfermedad (Flys *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2005; Sebastião *et al.*, 2020). Por consiguiente, la identificación y monitoreo constante de las variantes que circulan es de suma importancia para la correcta administración de terapias y mejorar así las estrategias a utilizar según sea el caso de la variante (Ross *et al.*, 2001; Sebastião *et al.*, 2020). Actualmente se está observando un aumento de diversidad a nivel global con la introducción de nuevas variantes en territorios que solían presentar una circulación más homogénea, por lo que es necesario mejorar nuestra comprensión sobre cómo esto influye en el diseño y desarrollo de vacunas, y en las estrategias de terapia antirretroviral (Parczewski *et al.*, 2021; Santoro & Perno, 2013).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES & RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

La mayoría de las secuencias analizadas fueron clasificadas como VIH-1 Subtipo B. Belice destacó entre los demás países por presentar una dinámica distinta a los demás países de la región estudiada en cuanto a los subtipos y recombinantes predominantes y los menos predominantes, así como en un mayor aporte de URFs. Los recombinantes URF_BF1 y CRF12_BF fueron los más prevalentes, encontrados en casi todos los países con excepción de Belice.

Aunque la mayoría de las secuencias fueron identificadas como VIH-1 Subtipo B, el incremento en diversidad a través de la introducción de secuencias no B debe tomarse con precaución para efectos de la salud pública; por esta razón, sigue siendo de alta importancia mantener un monitoreo epidemiológico constante y de esta manera seguir la evolución del VIH en el territorio.

RECOMENDACIONES

- En cada país circulan subtipos puros y formas recombinantes distintas con tendencias propias de cada territorio. La probabilidad de un incremento de la introducción de variantes es alta y una amenaza constante a la salud pública, es necesario continuar el monitoreo de la diversidad presente en cada país, especialmente a medida que aumenta el ingreso de extranjeros y, por tanto, posibles nuevas variantes previamente no registradas. Con esto se busca evitar que la situación epidemiológica tome mayor complejidad debido a una mayor diversidad.
- Realizar un estudio enfocado al territorio de Belice, un país del que se tiene poca información debido a la escasez de estudios filogenéticos sobre el VIH-1 y el cual ha demostrado en este trabajo una dinámica epidemiológica distinta a la que comparten los demás países en este estudio, aun siendo parte de la misma región.
- Considerar utilizar el genoma completo para los análisis filogenéticos siempre que sea posible para así contar con la mayor cantidad de información genética y obtener una identificación de la variante más precisa.
- Aumentar la educación respecto a las prácticas sexuales seguras para evitar la propagación, así como instaurar la normalización de exámenes rutinarios en beneficio de la detección temprana y el monitoreo actualizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada-Ruiz, S., Casado, C., Toala-González, I., Flores-Figueroa, D., Rodríguez-French, A., & López-Galíndez, C. (2008). High divergence within the major HIV type 1 subtype B epidemic in Panama. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *24*(11), 1461–1466. <https://doi.org/10.1089/aid.2008.0153>
- Ahumada-Ruiz, S., Flores-Figueroa, D., Toala-González, I., & Thomson, M. M. (2009). Analysis of HIV-1 pol sequences from Panama: Identification of phylogenetic clusters within subtype B and detection of antiretroviral drug resistance mutations. *Infection, Genetics and Evolution*, *9*(5), 933–940. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.013>
- Avila-Ríos, S., García-Morales, C., Garrido-Rodríguez, D., Tapia-Trejo, D., Girón-Callejas, A. C., Mendizábal-Burastero, R., Escobar-Urias, I. Y., García-González, B. L., Navas-Castillo, S., Pinzón-Meza, R., Mejía-Villatoro, C. R., & Reyes-Terán, G. (2015). HIV-1 drug resistance surveillance in antiretroviral treatment-naive individuals from a reference hospital in Guatemala, 2010-2013. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *31*(4), 401–421. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0057>
- Avila-Ríos, S., García-Morales, C., Matías-Florentino, M., Tapia-Trejo, D., Hernández-Álvarez, B. F., Moreira-López, S. E., Quant-Durán, C. J., Porras-Cortés, G., & Reyes-Terán, G. (2016). HIV drug resistance in antiretroviral treatment-naïve individuals in the largest public hospital in Nicaragua, 2011-2015. *PLoS ONE*, *11*(10), 2011–2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164256>
- Avila-Ríos, S., García-Morales, C., Tapia-Trejo, D., Meza, R. I., Nuñez, S. M., Parham, L., Flores, N. A., Valladares, D., Pineda, L. M., Flores, D., Motiño, R., Umazor, V., Carbajal, C., Murillo, W., Lorenzana, I., Palou, E. Y., & Reyes-Terán, G. (2015). HIV drug resistance

- surveillance in Honduras after a decade of widespread antiretroviral therapy. *PLoS ONE*, *10*(11), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142604>
- Bartholomeusz, A., & Locarnini, S. (2014). Local and Global Spatio-Temporal Dynamics of HIV-1 Subtype F1. *Journal of Medical Virology*, *86*, 186–192. <https://doi.org/10.1002/jmv>
- Bbosa, N., Kaleebu, P., & Ssemwanga, D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *14*(3), 153–160. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000534>
- Bousheri, S., Burke, C., Ssewanyana, I., Harrigan, R., Martin, J., Hunt, P., Bangsberg, D. R., & Cao, H. (2009). Infection with different HIV subtypes is associated with CD4 activation-associated dysfunction and apoptosis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *52*(5), 548–552. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181c1d456>
- Candal, D. H., Pau, C. P., Luo, C. C., Granade, T., Stetler, H., Amador, L., Meza, R., Nunez, C., Schochetman, G., & George, J. R. (1997). Genetic variability of HIV type 1 in Honduras. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *13*(15), 1349–1350. <https://doi.org/10.1089/aid.1997.13.1349>
- CDC, C. for D. C. and P. (1982). Epidemiologic Notes and Reports Possible Transfusion-Associated Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, *31*(44), 2–5.
- Chaillon, A., Avila-Ríos, S., Wertheim, J. O., Dennis, A., García-Morales, C., Tapia-Trejo, D., Mejía-Villatoro, C., Pascale, J. M., Porrás-Cortés, G., Quant-Durán, C. J., Lorenzana, I., Meza, R. I., Palou, E. Y., Manzanero, M., Cedillos, R. A., Reyes-Terán, G., & Mehta, S. R. (2017). Identification of major routes of HIV transmission throughout Mesoamerica. *Infection, Genetics and Evolution*, *54*, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.021>
- Chavan, L. (2011). History of Hiv & Aids. *Infect Dis*, *11*(12), 1928–1930.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0863.PMC>

Dalglish, A. G., Beverley, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., & Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, *312*(5996), 763–767. <https://doi.org/10.1038/312763a0>

Delgado, E., Ríos, M., Fernández, J., Pérez-Álvarez, L., Nájera, R., & Thomson, M. M. (2010). Identification of a new HIV type 1 BF intersubtype circulating recombinant form (CRF44-BF) in Chile. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *26*(7), 821–826. <https://doi.org/10.1089/aid.2010.0006>

Donald S. Burke. (1997). Recombination in HIV: An Important Viral Evolutionary Strategy. *Emerging Infectious Diseases*, *3*(SEPTEMBER), 7. <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/3/3/pdfs/97-0301.pdf>

Elangovan, R., Jenks, M., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Kirtley, S., & Hemelaar, J. (2021). Global and Regional Estimates for Subtype-Specific Therapeutic and Prophylactic HIV-1 Vaccines: A Modeling Study. *Frontiers in Microbiology*, *12*(July 2021), Article 690647. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.690647>

Flys, T. S., Chen, S., Jones, D. C., Hoover, D. R., Church, J. D., Fiscus, S. A., Mwatha, A., Guay, L. A., Mmiro, F., Musoke, P., Kumwenda, N., Taha, T. E., Jackson, J. B., & Eshleman, S. H. (2006). Quantitative analysis of HIV-1 variants with the K103N resistance mutation after single-dose nevirapine in women with HIV-1 subtypes A, C, and D. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *42*(5), 610–613. <https://doi.org/10.1097/01.qai.0000221686.67810.20>

Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(8), 484–496. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>

- Friedman-Kien, A. E. (1981). Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 5(4), 468–471. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(81\)80010-2](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(81)80010-2)
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., & Markham, P. D. (1984). Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. *Science*, 224(4648), 500–503. <https://doi.org/10.1126/science.6200936>
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436–442. <https://doi.org/10.1038/17130>
- García-Morales, C., Tapia-Trejo, D., Quiroz-Morales, V. S., Navarro-Álvarez, S., Barrera-Arellano, C. A., Casillas-Rodríguez, J., Romero-Mora, K. A., Gómez-Palacio-Schjetnan, M., Murakami-Ogasawara, A., Ávila-Ríos, S., & Reyes-Terán, G. (2017). HIV pretreatment drug resistance trends in three geographic areas of Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(11), 3149–3158. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx281>
- Gaschen, B., Taylor, J., Yusim, K., Foley, B., Gao, F., Lang, D., Novitsky, V., Haynes, B., Hahn, B. H., Bhattacharya, T., & Korber, B. (2002). Diversity Considerations in HIV-1 Vaccine Selection. *Science*, 296(5577), 2354–2360. <https://doi.org/10.1126/science.1070442>
- Gottlieb, M. S. (2006). Pneumocystis Pneumonia—Los Angeles. *American Journal of Public Health*, 96(6), 980–981. <https://doi.org/10.2105/AJPH.96.6.980>
- Greene, W. C. (2007). A history of AIDS: Looking back to see ahead. *European Journal of*

Immunology, 37(S1), S94–S102. <https://doi.org/10.1002/eji.200737442>

Guerra-Palomares, S. E., Hernandez-Sanchez, P. G., Esparza-Perez, M. A., Arguello, J. R., Noyola, D. E., & Garcia-Sepulveda, C. A. (2016). Molecular characterization of Mexican HIV-1 Vif sequences. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 32(3), 290–295. <https://doi.org/10.1089/aid.2015.0290>

Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.001>

Hemelaar, J., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Fleminger, I., Kirtley, S., Williams, B., Gouws-Williams, E., & Ghys, P. D. (2019). Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(2), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30647-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30647-9)

Hernandez-Sanchez, P. G., Guerra-Palomares, S. E., Ramirez-Garcialuna, J. L., Arguello, J. R., Noyola, D. E., & Garcia-Sepulveda, C. A. (2018). Prevalence of drug resistance mutations in protease, reverse transcriptase, and integrase genes of north central Mexico HIV isolates. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 34(6), 498–506. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0257>

Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., & Carlo, M. (2010). HIV-2 CRF01 _ AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 54(3), 242–247. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181dc98c1>.

Johnson, J. A., Li, J. F., Morris, L., Martinson, N., Gray, G., McIntyre, J., & Heneine, W. (2005). Emergence of drug-resistant HIV-1 after intrapartum administration of single-dose nevirapine is substantially underestimated. *Journal of Infectious Diseases*, 192(1), 16–23. <https://doi.org/10.1086/430742>

- Jordan, A. (2001). The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *The EMBO Journal*, 20(7), 1726–1738. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1726>
- Junqueira, D. M., de Medeiros, R. M., Matte, M. C. C., Araújo, L. A. L., Chies, J. A. B., Ashton-Prolla, P., & de Matos Almeida, S. E. (2011). Reviewing the history of HIV-1: Spread of subtype B in the Americas. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027489>
- Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F. Y., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M., & Hahn, B. H. (2006). Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Science*, 313(5786), 523–526. <https://doi.org/10.1126/science.1126531>
- Kirichenko, A., Lapovok, I., Baryshev, P., van de Vijver, D. A. M. C., van Kampen, J. J. A., Boucher, C. A. B., Paraskevis, D., & Kireev, D. (2020). Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to INSTIs. *Viruses*, 12(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/v12080838>
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., & Bhattacharya, T. (2000). Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. *Science*, 288(5472), 1789–1796. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1789>
- Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C., & Detours, V. (2001). Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British Medical Bulletin*, 58(1), 19–42. <https://doi.org/10.1093/bmb/58.1.19>
- Lara, C., Sallberg, M., Johansson, B., De Rivera, I. L., & Sonnerborg, A. (1997). The Honduran human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) epidemic is dominated by HIV-1 subtype B

- as determined by V3 domain sero- and genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3), 783–784. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.3.783-784.1997>
- Lloyd, B., O’Connell, R. J., Michael, N. L., Aviles, R., Palou, E., Hernandez, R., Cooley, J., & Jagodzinski, L. L. (2008). Prevalence of resistance mutations in HIV-1-infected Hondurans at the beginning of the national antiretroviral therapy program. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 24(4), 529–535. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0172>
- Marzetta, C. A., Lee, S. S., Wrobel, S. J., Singh, K. J., Russell, N., & Esparza, J. (2010). The potential global market size and public health value of an HIV-1 vaccine in a complex global market. *Vaccine*, 28(30), 4786–4797. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.098>
- Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Vande Stouwe, R. A., Holzman, R. S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H. W., & Cunningham-Rundles, S. (1981). An Outbreak of Community-Acquired *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 305(24), 1431–1438. <https://doi.org/10.1056/NEJM198112103052402>
- Mendoza, Y., Bello, G., Castillo Mewa, J., Martínez, A. A., González, C., García-Morales, C., Avila-Ríos, S., Reyes-Terán, G., & Pascale, J. M. (2014). Molecular epidemiology of HIV-1 in Panama: Origin of non-B subtypes in samples collected from 2007 to 2013. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085153>
- Mendoza, Y., García-Morales, C., Bello, G., Garrido-Rodríguez, D., Tapia-Trejo, D., Pascale, J. M., Girón-Callejas, A. C., Mendizábal-Burastero, R., Escobar-Urias, I. Y., García-González, B. L., Navas-Castillo, J. S., Quintana-Galindo, M. C., Pinzón-Meza, R., Mejía-Villatoro, C. R., Avila-Ríos, S., & Reyes-Terán, G. (2018). Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the HIV-1 subtype B epidemic in Guatemala. *PLoS ONE*, 13(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203916>

- Mendoza, Y., Martínez, A. A., Mewa, J. C., González, C., García-Morales, C., Avila-Ríos, S., Reyes-Terán, G., Armién, B., Pascale, J. M., & Bello, G. (2014). Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) subtype B epidemic in Panama is mainly driven by dissemination of country-specific clades. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095360>
- Murillo, W., Veras, N., Prospero, M., de Rivera, I. L., Paz-Bailey, G., Morales-Miranda, S., Juarez, S. I., Yang, C., DeVos, J., Marín, J. P., Mild, M., Albert, J., & Salemi, M. (2013). A Single Early Introduction of HIV-1 Subtype B into Central America Accounts for Most Current Cases. *Journal of Virology*, 87(13), 7463–7470. <https://doi.org/10.1128/jvi.01602-12>
- Pagán, I., & Holguín, Á. (2013). Reconstructing the Timing and Dispersion Routes of HIV-1 Subtype B Epidemics in The Caribbean and Central America: A Phylogenetic Story. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069218>
- Parczewski, M., Scheibe, K., Witak-Jędra, M., Pynka, M., Aksak-Wąs, B., & Urbańska, A. (2021). Infection with HIV-1 subtype D adversely affects the life expectancy independently of antiretroviral drug use. *Infection, Genetics and Evolution*, 90(January), 104754. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104754>
- Peeters, M., Liegeois, F., Torimiro, N., Bourgeois, A., Mpoudi, E., Vergne, L., Saman, E., Delaporte, E., & Saragosti, S. (1999). Characterization of a Highly Replicative Intergroup M/O Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombinant Isolated from a Cameroonian Patient. *Journal of Virology*, 73(9), 7368–7375. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7368-7375.1999>
- Roberts, J. D., Bebenek, K., & Kunkel, T. A. (1988). The Accuracy of Reverse Transcriptase from HIV-1. *Science*, 242(4882), 1171–1173. <https://doi.org/10.1126/science.2460925>
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F.,

- Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S., & Korber, B. (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science*, 288(5463), 55–55. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.55d>
- Ross, L., Liao, Q., Gao, H., Pham, S., Tolson, J., Hertogs, K., Larder, B., & Saag, M. S. (2001). Impact of HIV type 1 drug resistance mutations and phenotypic resistance profile on virologic response to salvage therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17(15), 1379–1385. <https://doi.org/10.1089/088922201753197042>
- Santoro, M. M., & Perno, C. F. (2013). HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiology*, 2013, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2013/481314>
- Sebastião, C. S., Morais, J., & Brito, M. (2020). Clinical and public health implications of hiv-1 genetic diversity and drug resistance mutations in angola: A systematic review. *AIDS Reviews*, 22(4), 1–9. <https://doi.org/10.24875/AIDSRev.20000057>
- Seitz, R. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>
- Sharp, P. M., Bailes, E., Chaudhuri, R. R., Rodenburg, C. M., Santiago, M. O., & Hahn, B. H. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1420), 867–876. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0863>
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006842>
- Sierra, S., Kupfer, B., & Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*, 34(4), 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.09.004>

- Song, H., Giorgi, E. E., Gantsov, V. V., Cai, F., Athreya, G., Yoon, H., Carja, O., Hora, B., Hraber, P., Romero-Severson, E., Jiang, C., Li, X., Wang, S., Li, H., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Goonetilleke, N., Keele, B. F., Montefiori, D. C., ... Gao, F. (2018). Tracking HIV-1 recombination to resolve its contribution to HIV-1 evolution in natural infection. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s42467-018-04217-5>
- Souza, J. S. M., Silva Júnior, J. J., Brites, C., & Monteiro-Cunha, J. P. (2019a). Molecular and geographic characterization of hiv-1 bf recombinant viruses. *Virus Research*, 270(July), 197650. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197650>
- Souza, J. S. M., Silva Júnior, J. J., Brites, C., & Monteiro-Cunha, J. P. (2019b). Molecular and geographic characterization of hiv-1 bf recombinant viruses. *Virus Research*, 270(April), 197650. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197650>
- Sundquist, W. I., & Krausslich, H.-G. (2012). HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), a006924–a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>
- Tang, H., Kuhen, K. L., & Wong-Staal, F. (1999). Lentivirus Replication and Regulation. *Annual Review of Genetics*, 33(1), 133–170. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.133>
- Taylor, B. S., Sobieszcyk, M. E., McCutchan, F. E., & Hammer, S. M. (2008). The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *New England Journal of Medicine*, 358(15), 1590–1602. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0706737>
- Teva, I., Bermúdez, M. P., Ramiro, M. T., & Buéla-Casal, G. (2012). Situación epidemiológica actual del VIH/SIDA en Latinoamérica en la primera década del siglo XXI: Análisis de las diferencias entre países. *Revista Médica de Chile*, 140(1), 50–58. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872012000100007>

- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J. M., Olson, W. C., Allaway, G. P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P. J., & Moore, J. P. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature*, *384*(6605), 184–187. <https://doi.org/10.1038/384284a0>
- UNAIDS. (2019). Global HIV and AIDS statistics 2019 Fact sheet. *Global HIV and AIDS Statistics, World AIDS Day 2019 Fact Sheet*, *1*(June), 1–6.
- Vahlne, A. (2009). A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology*, *6*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-40>
- Vázquez-Valls, E., Escoto-Delgado, M., López-Márquez, F. C., Castellero-Manzano, M., Echegaray-Guerrero, E., Bitzer-Quintero, O. K., Kobayashi-Gutiérrez, A., & Torres-Mendoza, B. M. (2010). Molecular epidemiology of HIV type 1 in Mexico: Emergence of BG and BF intersubtype recombinants. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *26*(7), 777–781. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0195>
- Volz, E. M., Koelle, K., & Bedford, T. (2013). Viral Phylodynamics. *PLoS Computational Biology*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002947>
- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J.-J., Kabongo, J.-M. M., Kalengayi, R. M., Van Marck, E., Gilbert, M. T. P., & Wolinsky, S. M. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, *455*(7213), 661–664. <https://doi.org/10.1038/nature07390>
- Yamaguchi, J., Vallari, A., McArthur, C., Sthreshley, L., Cloherty, G. A., Berg, M. G., & Rodgers, M. A. (2020). Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *83*(3), 319–322. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000002246>