

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



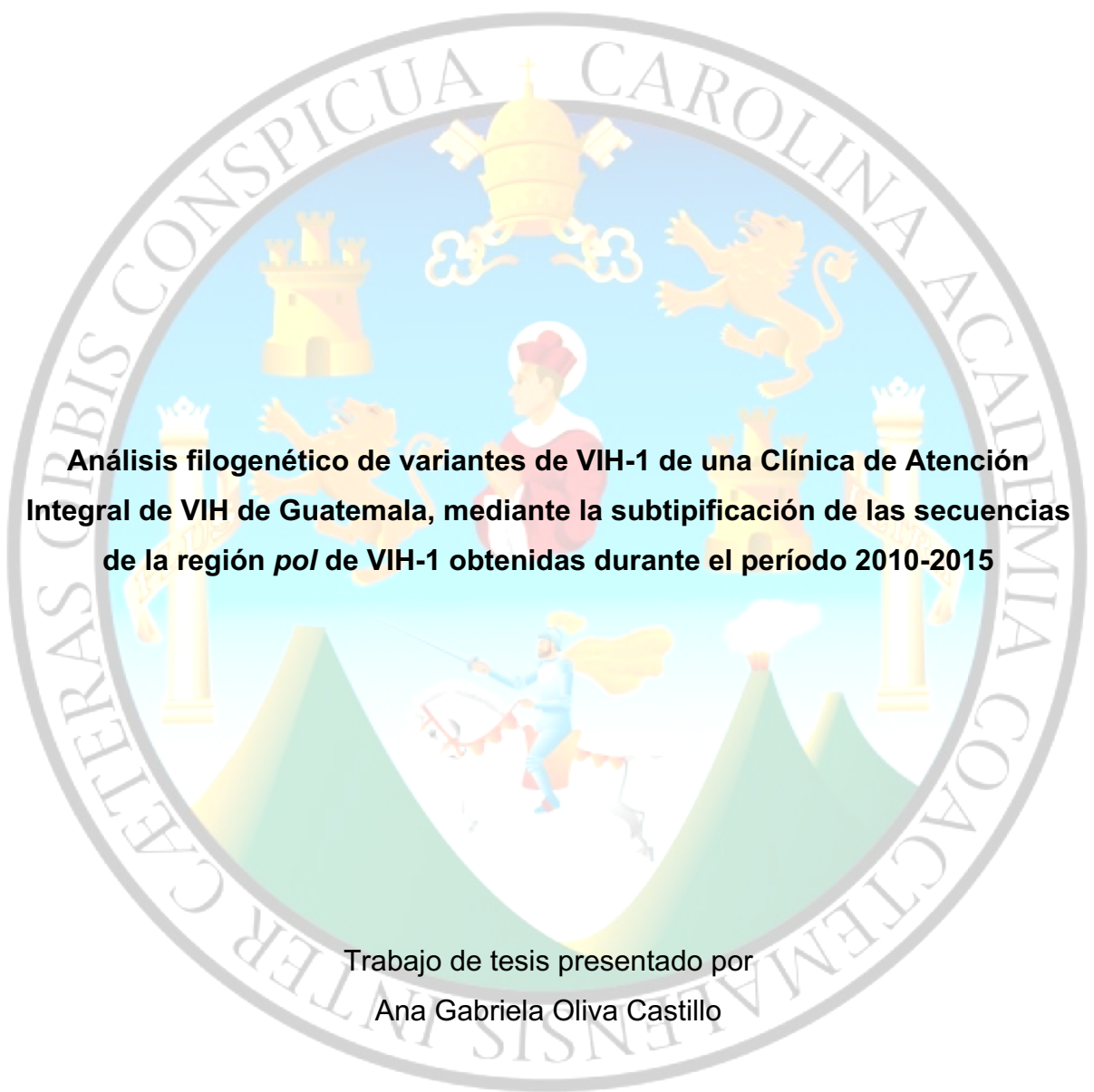
**Análisis filogenético de variantes de VIH-1 de una Clínica de Atención Integral de VIH de Guatemala, mediante la subtipificación de las secuencias de la región *pol* de VIH-1 obtenidas durante el período 2010-2015**

Ana Gabriela Oliva Castillo

Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, mayo de 2019

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a red and white robe, likely a saint or scholar, holding a book. Above him is a golden crown with a cross on top. To the left and right are golden lions rampant. Below the central figure are two golden pillars. The background is a light blue sky with a white cloud. The entire seal is surrounded by a grey border containing the Latin text "UNIVERSITAS SAN CAROLINIENSIS INTER CAETERAS OBSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEM".

**Análisis filogenético de variantes de VIH-1 de una Clínica de Atención Integral de VIH de Guatemala, mediante la subtipificación de las secuencias de la región *pol* de VIH-1 obtenidas durante el período 2010-2015**

Trabajo de tesis presentado por  
Ana Gabriela Oliva Castillo

Para optar al grado de Maestra en Ciencias  
Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, mayo de 2019

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

MA. Pablo Ernesto Oliva Soto	DECANO
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	SECRETARIA
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	VOCAL I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	VOCAL II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	VOCAL III
BR. Byron Enrique Pérez Díaz	VOCAL IV
BR. Pamela Carolina Ortega Jiménez	VOCAL V

**CONSEJO ACADÉMICO**  
**ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Pablo Ernesto Oliva Soto, MA.  
Tamara Ileana Velásquez Porta, MSc.  
Jorge Mario Gómez Castillo, MA.  
Clara Aurora García González, MA.  
Silvia Marisol Archila Jiménez, MSc.

## RESUMEN EJECUTIVO

El genoma del VIH contiene nueve genes, tres de estos genes (*gag*, *pol* y *env*) codifican para proteínas estructurales. Existen dos variantes principales del virus de inmunodeficiencia adquirida, VIH-1 y VIH-2. El primero (VIH-1) es el causante de la mayoría de las infecciones a nivel mundial, actualmente se han identificado nueve subtipos de VIH-1 (A – D, F – H, J y K) y 58 formas recombinantes circulantes (CRF). En Centroamérica, el subtipo B del VIH-1 es el causante de la mayoría de los casos de VIH positivo; en Guatemala se ha reportado la presencia de subtipo B, de formas recombinantes BF1 y del subtipo C; sin embargo, no se ha realizado ningún análisis filogenético que indique las variantes que hay de este subtipo.

Debido a lo anterior el objetivo del estudio fue llevar a cabo la subtipificación de las secuencias de la región *pol* del VIH-1 obtenidas en una clínica de atención integral durante el período del 2010 al 2015. Para determinar los distintos subtipos de VIH-1 presentes en Guatemala se realizó la subtipificación de las secuencias obtenidas por la prueba de genotipo en formato FASTA, con la herramienta REGA HIV-1 Subtyping Tool – Version 3.0. Con el fin de determinar la relación entre las variantes de VIH-1, se realizó un alineamiento de secuencias y árboles filogenéticos con el método Neighbor Joining con 100 réplicas bootstrap y el método de Máxima Verosimilitud, con el mismo número de réplicas, con el programa MEGA 7.0.21. Se determinó que el subtipo con mayor prevalencia en Guatemala es el subtipo B con 71.5%. Con relación a los análisis filogenéticos, los subtipos detectados pertenecen al mismo clado del VIH-1. Es recomendable realizar un alineamiento reducido, es decir sin tomar en cuenta las mutaciones presentes en las secuencias, con el fin de evitar valores bajos de probabilidad en los análisis filogenéticos.

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORÍCO .....	2
1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) .....	2
1.1 Morfología del VIH y ciclo de vida .....	2
1.2 Genoma del VIH .....	3
2. Heterogeneidad molecular del VIH-1.....	4
3. Tratamiento antirretroviral y resistencia.....	4
3.1 Inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos: .....	6
3.2 Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos.....	6
3.3 Inhibidores de la proteasa .....	7
3.4 Inhibidores de la entrada .....	8
3.5 Inhibidores de la integrasa.....	9
4. Variantes de VIH-1 .....	10
5. Epidemiología molecular del VIH.....	11
5.1 VIH – 1.....	11
6. Recombinantes inter-subtipos e inter-grupos del VIH-1 .....	12
7. Distribución mundial del VIH-1 .....	13
8. Epidemiología molecular del VIH en la región.....	13
8.1 VIH en Guatemala .....	14
9. Análisis filogenético .....	15
9.1 Árboles filogenéticos.....	16
9.2 Metodologías para análisis filogenéticos para VIH-1.....	16
10. REGA.....	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. OBJETIVOS .....	20
V. HIPÓTESIS .....	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
VII. RESULTADOS .....	25
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	30
IX. CONCLUSIONES.....	34
X. RECOMENDACIONES .....	35
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
XII. ANEXOS .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>1</b>	Morfología del VIH.....	2
<b>2</b>	Genoma del VIH.....	3
<b>3</b>	Porcentaje de los distintos subtipos de VIH-1 presentes en Guatemala.....	25
<b>4</b>	Árbol filogenético de los distintos subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala por el método de Neighbor Joining, realizado en MEGA 7.....	26
<b>5</b>	Árbol filogenético de los distintos subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala por el método de Máxima Verosimilitud, realizado en MEGA 7.....	27
<b>6</b>	Subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, en base al género.....	28
<b>7</b>	Subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, en base a los distintos rangos de edad de los pacientes.....	28
<b>8</b>	Subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, en base a la región procedente.....	29

## I. INTRODUCCIÓN

El genoma del VIH contiene nueve genes, con 9,800 pares de nucleótidos. Tres de estos genes (*gag*, *pol* y *env*) codifican para proteínas estructurales, dos para proteínas reguladoras (*tat* y *rev*) y cuatro para proteínas accesorias (*vpu*, *vpr*, *vif* y *nef*). Existen dos variantes principales del virus de inmunodeficiencia adquirida, VIH-1 y VIH-2. El primero (VIH-1) es el causante de la mayoría de las infecciones a nivel mundial, se divide en tres grupos: Grupo M, grupo O, y grupo N (Fauci *et al.*, 2008). Actualmente se han identificado nueve subtipos de VIH-1 (A – D, F – H, J y K) y 58 formas recombinantes circulantes (CRF). El subtipo B es predominante en América, Europa y Australia, aunque solamente causa el 10% de las infecciones a nivel mundial; el subtipo C causa casi el 50% de las infecciones globales, mientras que el subtipo A causa 12% de las infecciones globales (Pineda *et al.*, 2013).

En el año 2013 se determinó que el subtipo B del VIH-1 es el causante de la mayoría de los casos de VIH positivo en Centroamérica, esto se evidenció mediante ensayos filogenéticos en base a la secuencia *pol* del VIH-1 (Murillo *et al.*, 2013). En Guatemala se ha reportado la presencia de subtipo B (96.6%), también se ha determinado prevalencia de formas recombinantes BF1 (2.8%) y del subtipo C; sin embargo, no se ha realizado ningún análisis filogenético que indique las variantes que hay de este subtipo (Avila *et al.*, 2011).

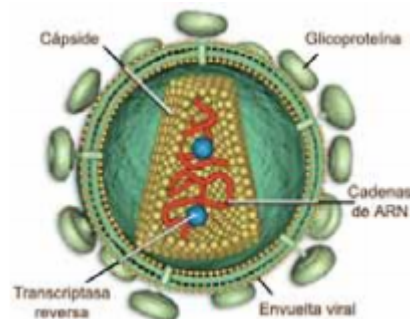
Debido a lo anterior se subtipificaron las secuencias de la región *pol* del VIH-1 obtenidas en una clínica de atención integral durante el período del 2010 al 2015, con el fin de identificar las variantes circulantes en el grupo al cual se le brinda atención.

## II. MARCO TEORÍCO

### 1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

#### 1.1 Morfología del VIH y ciclo de vida

El virus de inmunodeficiencia humana es un retrovirus compuesto por dos cadenas de ARN monocatenario rodeadas por 15 tipos de proteínas virales y algunas proteínas de la última célula hospedera que infectó, estas forman la cápside. Dentro de la cápside hay varias proteínas propias del virus, la transcriptasa reversa, integrasa y proteasa; esta cápside está cubierta por una envoltura de bicapa lipídica. Todas estas moléculas en conjunto permiten que el virus infecte a las células del sistema inmune, y promueven la replicación del mismo (Engelman y Cherepanov, 2012).



**Figura 1.** Morfología del VIH (Lahuerta, 2009).

El ciclo de vida del VIH inicia cuando se une a un receptor CD4 y a uno de los dos co-receptores de la superficie de un linfocito CD4 (CCR5 o CXCR4). El virus se fusiona y libera su material genético (ARN viral) en la célula hospedera, la transcriptasa reversa transcribe la cadena simple del ARN en una cadena doble de ADN, esta entra al núcleo de la célula. Luego la integrasa permite la integración del ADN viral dentro del ADN propio de la célula produciendo el ADN proviral; a partir



de este paso el virus es capaz de replicarse mediante la transcripción del ADN proviral, lo que permite el desarrollo de copias de ARN que se traducen para formar cadenas largas de proteínas. La proteasa divide las cadenas largas de proteínas en pequeñas proteínas individuales, conforme estas proteínas pequeñas se unen a las copias del material genético del ARN del VIH, se ensambla una nueva partícula del virus que es capaz de infectar una nueva célula (Lahuerta, 2009).

## 1.2 Genoma del VIH

El genoma del VIH contiene nueve genes, con 9,800 pares de nucleótidos (figura 2). Tres de estos genes (*gag*, *pol* y *env*) codifican para proteínas estructurales, dos para proteínas reguladoras (*tat* y *rev*) y cuatro para proteínas accesorias (*vpu*, *vpr*, *vif* y *nef*). En ambos extremos del genoma se encuentran secuencias repetitivas, LTR (long terminal repeats) (Lahuerta, 2009; Engelman y Cherepanov, 2012).



**Figura 2.** Genoma del VIH (Lahuerta, 2009).

El VIH es un virus que muta fácilmente, las cepas pueden clasificarse en distintos tipos, grupos, subtipos y recombinantes debido a las similitudes genéticas. Existen dos tipos de VIH, VIH-1 y VIH-2, el VIH-1 causa más del 99% de las infecciones. Las cepas de VIH-1 se clasifican en tres grupos: El grupo M (major), grupo O (outlier) y el grupo N (new), la mayoría de las cepas circulantes pertenecen al grupo M (Lahuerta, 2009; Fauci *et al.*, 2008).

Existen distintos subtipos y formas recombinantes circulantes de VIH-1 grupo M, estas se distribuyen de forma distinta por región y por país. Cada uno de los subtipos presenta diferentes patrones clínicos, epidemiológicos y virológicos en relación a transmisión, progresión de la enfermedad o generación de mutaciones de resistencia frente a los antiretrovirales. El subtipo más predominante alrededor del mundo es el C, es el responsable del 56% de las infecciones por VIH-1, la rápida expansión de este subtipo se debe a la menor virulencia del mismo en comparación con los demás (A, B y D). El hecho de que sea menos virulento hace que la progresión de la infección sea más lenta, es decir que existe un período asintomático más prolongado y mayor oportunidad de transmitir el virus (Geretti, 2006; Thomson y Najera, 2005).

## **2. Heterogeneidad molecular del VIH-1**

La infección por el VIH se caracteriza por la presencia de una considerable heterogeneidad genética, esta se encuentra presente en todo el genoma del virus, pero es mayor en el gen que codifica la envoltura (*env*) y se concentra en cinco regiones variables (V1 – V5). El análisis filogenético de las secuencias del gen *env* permitió la identificación de los tres grupos de VIH-1: M o principal, O o externo y el grupo N; dentro del grupo M se han identificado 8 subtipos identificados con letras de la A a la J. También se han obtenido resultados similares con análisis filogenético del gen *gag*. En cuanto al gen *pol*, el cual codifica las enzimas transcriptasa reversa, integrasa y proteasa, es más conservado desde el punto de vista genético, pero recientemente se ha demostrado que también puede tener una heterogeneidad en sus secuencias (Pérez *et al.*, 1999; Posada *et al.*, 2007).

## **3. Tratamiento antirretroviral y resistencia**

Los principales motivos para iniciar el tratamiento antirretroviral son:

- Disminuir la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por VIH-1.

- Mejorar la calidad de vida en el paciente con infección por VIH.
- Recuperar y preservar la inmunidad del paciente, entendiendo estas como la supresión completa y duradera de la replicación del VIH-1 y la prevención de la transmisión del virus. (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2013).

Según las guías internacionales, se recomienda iniciar tratamiento antirretroviral en todas las personas con VIH, independientemente del recuento de células CD4, con el fin de reducir la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por VIH. También es recomendable iniciar tratamiento para prevenir la transmisión del VIH. En ciertas afecciones, la urgencia de iniciar la terapia es mayor, tales como embarazo, enfermedades defensoras del SIDA, infecciones oportunistas agudas, recuentos de CD4 más bajos (<200 células/mm<sup>3</sup>), nefropatía asociada al VIH, infección aguda y coinfecciones con virus de hepatitis B o C (U.S. Department of Health and Human Services, 2017).

Por otro lado, se debe tomar en cuenta la cantidad de carga viral, si esta es muy elevada, mayor a un millón de copias, el tratamiento debe iniciarse (Cambiano *et al.*, 2013; Dybul *et al.*, 2002). En la terapia se utilizan combinaciones de antirretrovirales con el fin de mantener un bajo número de copias virales y prevenir las mutaciones del virus. Para el tratamiento de infección por VIH no se utiliza la monoterapia, definida como el uso de un solo medicamento; el tratamiento recomendado es la politerapia; en la cual se emplean tres o más medicamentos antirretrovirales de dos clases diferentes contra el VIH (Cambiano *et al.*, 2013; Brown y Qaqish, 2006).

Actualmente existen 30 agentes individuales o en combinación aprobados para el tratamiento de la infección por VIH, los cuales se dividen en cinco diferentes clases (Hoffman y Rockstroh, 2013).

### **3.1 Inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos:**

Su blanco de acción es la enzima transcriptasa reversa del VIH. Actúan como sustratos alternativos, compiten con los nucleósidos fisiológicos, difieren de ellos únicamente por una modificación menos en la molécula de ribosa. La unión de estos análogos produce la interrupción de la síntesis de ADN debido a que los puentes fosfodiéster no pueden ser formados para estabilizar la doble cadena. Estos son pro-drogas, que se convierten a su metabolito activo después de endocitosis por lo que son fosforilados a la forma trifosfato efectiva (Galli *et al.*, 2002). La zidovudina (AZT) fue aprobada para el tratamiento de la infección por VIH en 1987, una dosis diaria es suficiente en varios esquemas de tratamiento. La tolerabilidad a estos medicamentos es buena, sin embargo, existen efectos secundarios durante las primeras semanas de administración, tales como fatiga, cefalea y síntomas gastrointestinales que van desde malestar estomacal leve hasta náusea, vómitos y diarrea (Hoffman y Rockstroh, 2013).

La zidovudina y estavudina (d4T) son análogos de timidina, la emtricitabina (FTC) y lamivudina (3TC) son análogos de citidina. Es por esto que las combinaciones que contienen AZT y d4T o FTC y 3TC no presentan efecto contra el virus ya que compiten por el mismo sitio de unión (Piscitelli y Gallicano, 2001).

### **3.2 Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos**

Al igual que los análogos nucleósidos, el blanco de acción es la transcriptasa reversa. Se unen directamente y no competitivamente a la enzima en una posición cercana pero distinta del lugar de unión de los nucleósidos. Este complejo hace que se bloquee el sitio catalizador activado de la transcriptasa reversa, por lo tanto, se pueden unir a este sitio menor cantidad de nucleósidos reduciendo la velocidad de polimerización. Estos no requieren activación celular como los análogos de

nucleósidos (Hoffman y Rockstroh, 2013). Entre 1996 y 1998 se introdujeron tres análogos no nucleósidos: nevirapina, delavirdina y efavirenz (Conway, 2000).

La dosis diaria y tolerabilidad de este grupo de medicamentos ha permitido a nevirapina y efavirenz convertirse en componentes importantes de los regímenes de tratamiento. Hasta ahora ningún estudio ha demostrado que un análogo no nucleósido sea más potente que otro. (Hoffman y Rockstroh, 2013). Desde el 2008, etravirina, no nucleósido de segunda generación puede ser una opción para pacientes con mutaciones de resistencia a otros miembros de la familia como nevirapina y efavirenz (Hoffman y Rockstroh, 2013).

El riesgo de resistencia con estos medicamentos es alto y se desarrolla rápidamente, una vez que esto ocurre se da una resistencia cruzada de la familia entera. Esperar mucho tiempo cuando hay supresión viral insuficiente puede llevar a una mutación puntual en la posición 103 del sitio hidrofóbico de unión, lo cual puede llevar la eliminación de la clase entera de medicamentos (Conway, 2000). A pesar de los problemas con la resistencia, tanto estudios aleatorizados como de cohortes han demostrado que los no nucleósidos son extremadamente efectivos al ser combinados con análogos nucleósidos (Soriano *et al.*, 2011).

### **3.3 Inhibidores de la proteasa**

La proteasa del VIH se encarga de cortar la poliproteína viral *gag-pol* en subunidades funcionales, al inhibir la proteasa se forman particular víricas no infecciosas. Estos agentes actúan exactamente en el sitio activo de la proteasa del VIH. Los pacientes que presentan carga viral elevada deben recibir IP potenciados al inicio de la terapia (Youle, 2007).

Desde 1995, este tipo de medicamentos ha revolucionado el tratamiento de la infección por VIH. Actualmente son un componente esencial de la terapia

antiretroviral, incluso se investigan tratamientos basados únicamente en inhibidores de proteasa (Youle, 2007). Se encuentran asociados, a largo plazo, con lipodistrofia y dislipidemia (Nolan, 2003). Ritonavir es un potente inhibidor de la isoenzima 3A4, una subunidad del citocromo P450 (sistema enzimático hepático). La inhibición de estas enzimas permite que los parámetros farmacocinéticos (concentración máxima y vida media) de los inhibidores de proteasa sean significativamente potenciados. La combinación de ritonavir con otros inhibidores de proteasa simplifica los regímenes diarios reduciendo la frecuencia y el número de píldoras que deben tomarse. Además, potenciar puede ser efectivo contra cepas resistentes debido a los niveles elevados de medicamento en el plasma (Hoffman y Rockstroh, 2003).

En estos fármacos casi no se observa resistencia, además la barrera genética es alta; esto ha sido demostrado para lopinavir/r, fosamprenavir/r, atazanavir/r, saquinavir/r y darunavir/r. Nelfinavir es el único IP para el que no se recomienda potenciación con ritonavir ya que los niveles plasmáticos no aumentan significativamente (Hoffman y Rockstroh, 2013).

### **3.4 Inhibidores de la entrada**

Existen tres pasos cruciales para la entrada del VIH a la célula T CD4: (1) Unión del VIH al receptor CD4 (blanco de los inhibidores de la unión). (2) Unión a los co-receptores (blanco de los antagonistas de co-receptores). (3) Fusión del virus a la célula (blanco de los inhibidores de la fusión) (Hoffman y Rockstroh, 2013; Kuritzkes, 2009).

Cada paso de la entrada del VIH puede ser inhibido. Una diferencia importante en comparación con las otras clases de medicamentos es que los inhibidores de la entrada no inhiben el VIH intracelularmente, interfieren de forma temprana en el ciclo de la replicación (Kuritzkes, 2009). En el 2003 el T-20 fue aprobado como el primer inhibidor de la entrada en Europa y Estados Unidos. Maraviroc fue el primer

antagonista de co-receptor CCR5 y el primer inhibidor de entrada por vía oral en 2007 (Hoffman y Rockstroh, 2013).

### **3.5 Inhibidores de la integrasa**

La integrasa se encarga de la integración del ADN viral al genoma del huésped. No existe integrasa en las células humanas por lo que la inhibición selectiva de esta enzima sin producir efectos adversos parece posible (Hoffman y Rockstroh, 2013). Hay cuatro pasos en la integración del ADN viral que pueden ser inhibidos por estos fármacos: (1) unión de la integrasa al ADN viral lo que produce un complejo de unión ADN-integrasa, puede ser inhibido por pirano-dipirimidas. (2) procesamiento 3', la integrasa remueve un dinucleótido a cada extremo del ADN viral produciendo nuevos extremos hidroxilos 3'. Puede inhibirse por diceto ácidos. (3) transferencia de cadena, después del transporte del PIC desde el citoplasma por un poro nuclear hacia el núcleo celular, la integrasa se une al ADN cromosomal del huésped. De esta manera la integrasa produce una unión irreversible del ADN viral y celular. Este paso puede ser inhibido por inhibidores de la transferasa como raltegravir o elvitegravir. (4) reparación gap, en donde la combinación del ADN celular y viral es un producto intermedio con brecha. La reparación gap se hace por enzimas de reparación del ADN celular del huésped. Este paso puede inhibirse por metilxantinas. En 2007 raltegravir fue el primer inhibidor de la integrasa aprobado, en 2012 la FDA aprueba elvitegravir en combinación con tenofovir y emtricitabina (Hoffman y Rockstroh, 2013).

El beneficio del uso del tratamiento antirretroviral ha quedado demostrado ampliamente, disminuyendo de manera dramática la mortalidad asociada al SIDA que se producía al inicio de la epidemia en todo el mundo (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2013).

#### 4. Variantes de VIH-1

Existen múltiples variantes del VIH-1 debido a la gran tasa de replicación de este y a la alta tasa de error de la transcriptasa reversa, estas se conocen como cuasiespecies minoritarias. La selección de las cuasiespecies del virus son un mecanismo de escape del control del sistema inmunológico y de generación de resistencia a agentes antirretrovirales. Con el tratamiento antirretroviral se reduce la carga viral plasmática del VIH y la cantidad de cuasiespecies, pero algunas variantes del VIH presentan mutaciones de resistencia adquiridas de forma espontánea que disminuyen la susceptibilidad del virus a los antirretrovirales. Los pacientes que presentan resistencias a los antirretrovirales mantienen la cuasiespecie inicial (salvaje), la cual puede volver a superar a las variantes resistentes cuando el tratamiento es interrumpido (Lahuerta, 2009).

Las mutaciones, sustituciones de nucleótidos en genes que codifican a proteínas, pueden ser sin cambio de aminoácido (ds) o con cambio de aminoácido (dn). La proporción de las mutaciones dn frente a las ds (dn/ds) informan sobre el grado de presión de selección que opera en el virus; un valor  $dn/ds = 1$  indica selección natural,  $dn/ds > 1$  indica selección positiva. Las mutaciones de aminoácido benefician al virus, ya que aumentan su buen estado (Lahuerta, 2009).

Mediante la caracterización genética de los genes de proteasa y transcriptasa reversa de subtipos diferentes al B, se ha determinado que es frecuente encontrar mutaciones menores en las variantes naturales. A pesar de esto no se conoce si la presencia de polimorfismos facilita la generación de resistencias durante el tratamiento con inhibidores de proteasa. Aún no se conoce cómo la susceptibilidad y resistencia del virus hacia los antirretrovirales puede variar según los subtipos (Lahuerta, 2009). En un estudio realizado por Eshleman *et al.*, en el 2005 se determinó que la aparición de mutaciones de resistencia frente a un antirretroviral inhibidor de la transcriptasa reversa no nucleósidos puede ser dependiente del



subtipo, ya que las mujeres embarazadas portadoras del subtipo D tratadas con nevirapina presentaron mayor incidencia de mutaciones de resistencias que las portadoras de virus del subtipo A.

## **5. Epidemiología molecular del VIH**

Mundialmente, existen 39,5 millones de personas infectadas con VIH. Los factores de riesgo y los grupos poseen distintos patrones de distribución geográfica; en Europa Occidental, Estados Unidos y Oceanía, la mayor incidencia es en hombres que tienen relaciones sexuales con hombres y drogadictos. En Asia, África del Norte y zonas del Pacífico, la mayor incidencia es en prostitutas y drogadictos; y en América Latina, el Caribe y África subsahariana, el grupo con mayor incidencia es el heterosexual (Nájera, 2011; Thomson y Nájera, 2005).

En base a análisis filogenéticos de distintas áreas geográficas, el VIH se divide en dos tipos, VIH-1 y VIH-2, grupos, subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (FRC) y formas recombinantes únicas (FRU) (Robertson *et al.*, 1995).

### **5.1 VIH – 1**

Existen tres grupos filogenéticos del VIH – 1: M (principal), O (externo) y N (no M – no O). A su vez, también existen subtipos del VIH – 1 del grupo M, los cuales son A – D, F – H, I y K; estos subtipos forman agrupaciones equidistantes en los árboles filogenéticos. De los subtipos A y F existen sub-subtipos, A1 y A2, y F1 y F2; cada par se encuentra más relacionado entre sí que con otros subtipos (McCutchan, 2000; Gao *et al.*, 2001).

Los grupos O y N son genéticamente divergentes del grupo M, han causado menos del 5% de las infecciones en el mundo y solamente han sido detectados en el centro-este de África. El grupo O ha sido detectado en personas de Camerún y algunos

países vecinos; mientras que la infección por el grupo N solamente ha sido detectada en Camerún; convirtiéndolo en el país endémico para el VIH-1 (Robertson *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2001).

## **6. Recombinantes inter-subtipos e inter-grupos del VIH-1**

Existen dos tipos de formas recombinantes, las circulantes (FRC), de las cuales se han identificado 34 y las únicas (FRU). El genoma de las FRC debe ser similar entre las cepas con puntos de ruptura parecidos, en los que se pueda observar el ancestro en común de los mismos eventos de recombinación. Las FRC son genomas recombinantes inter-subtipos complejos, algunos estables y otros se ven como “retazos” debido a la gran cantidad de puntos de entrecruzamiento que presentan (Robertson *et al.*, 2000). Estas han sido identificadas en casi todo el mundo y representan más del 10% de las infecciones por VIH-1. Por otro lado, se han reportado varias cepas de VIH-1 con estructuras de mosaico únicas, las FRU. Es probable que estas se produzcan a partir de recombinaciones secundarias de FRC (McCutchan, 2000).

Los subtipos de VIH-1 pueden ser determinados mediante la secuenciación de las regiones genómicas. La divergencia de los nucleótidos inter-subtipo puede llegar a ser de 20, 15 y 25% para los genes *gag*, *pol* y *env*, respectivamente. La detección de un subtipo debe realizarse cuidadosamente, ya que se pueden perder cepas recombinantes. Para poder definir un nuevo subtipo, sub-subtipo o FRC, es importante identificar cepas representativas en individuos sin vínculo epidemiológico, la estructura de mosaico debe coincidir y el agrupamiento filogenético debe caracterizarse. El genoma puede ser secuenciado casi por completo, al menos en dos de las cepas (Turner y Summers, 1999; Nájera *et al.*, 2002).

La recombinación entre las cepas de linajes distantes genera nuevas variantes de VIH-1. En Camerún han reportado recombinación entre los grupos M y O del VIH-1. Se ha identificado un evento de recombinación entre un virus similar al VIScpz y una similar al VIH-1, mediante análisis de dos virus del grupo N (Corbet *et al.*, 2000; Takehisa *et al.*, 1999).

## **7. Distribución mundial del VIH-1**

Los subtipos más frecuentes del VIH-1, mundialmente, son el C (47%), A (27.2%), B (12.3%), D (5.3%) y la DRC CRF01\_AE (3.2%). África central y subsahariana es en donde se presenta mayor diversidad del VIH-1, ya que se han identificado todos los subtipos y FCR en esa región. Debido a esto, África es la fuente de la pandemia de VIH (Resik, 2008).

## **8. Epidemiología molecular del VIH en la región**

La mayor diversidad genética del VIH-1 se encuentra en África central occidental, donde se originó la pandemia. En esta área circulan los 4 grupos del VIH-1, todos los subtipos y sub-subtipos, a excepción del B. En la mayoría de los demás países predomina un número limitado de formas genéticas del VIH-1, generalmente tres, que representan recombinantes generados localmente. La propagación de limitadas formas genéticas en países fuera de África central se debe a un “efecto fundador”, en el cual la primera forma genética es introducida en una población y se mantiene después como predominante, esto debido a eficiencias de transmisión similares entre subtipos y al grado de resistencia a la superinfección por una segunda forma genética (Nájera, 2011; Thomson y Nájera, 2005).

En el continente americano, el subtipo B es la forma genética más predominante, es el subtipo que se propagó más rápido fuera de África, y el de mayor dispersión geográfica a escala global; predominante en Europa occidental y central en

América, el Caribe, África del norte, Australia, Nueva Zelanda, Japón, Corea, Mongolia y Yemen. De este subtipo se han descrito variantes de origen monofilético en varias regiones de América, como Brasil, Cuba y Panamá (Nájera, 2011).

### 8.1 VIH en Guatemala

El primer caso de VIH/SIDA detectado en Guatemala fue en el año 1984, desde entonces hasta 2009 el Centro Nacional de Epidemiología reportó 20,488 casos. La epidemia se concentra en jóvenes de 15 a 24 años. Los departamentos más afectados son Guatemala, Retalhuleu, Izabal, Suchitepéquez, Quetzaltenango, Sacatepéquez y Escuintla; estos concentran más del 80% de los casos reportados (Silvestre, 2010). En 2016, se presentaron 2900 nuevos casos de infecciones por VIH y 1600 muertes relacionadas con SIDA. Ese mismo año 46000 personas vivían con VIH, de las cuales 36% tenían acceso a la terapia antirretroviral. Entre las mujeres embarazadas que viven con VIH, solamente 19% tenían acceso al tratamiento o profilaxis para prevenir la transmisión del virus al recién nacido. Entre las personas que viven con VIH, aproximadamente 25% había suprimido la carga viral (ONUSIDA, 2018).

En los años 2010 – 2011 se evaluó la diversidad del VIH. Incluyeron 145 pacientes no tratados anteriormente con antirretrovirales del Hospital Roosevelt en la Ciudad de Guatemala. Se obtuvieron las secuencias *pol* a través del VIH plasmático. El subtipo más prevalente fue el B, con 96.6% y se encontró una prevalencia de formas recombinantes BF1 (2.8%) y del subtipo C (0.7%). Este estudio es uno de los primeros intentos de describir la diversidad del VIH. Sin embargo, no se ha realizado ningún análisis filogenético que indique las variantes que hay de este subtipo (Ávila *et al.*, 2011).

Los diferentes subtipos del VIH-1 muestran diferencias en patogénesis y presentan diferentes vías de resistencia, lo que conduce a diferentes resultados clínicos. El

subtipo D es más transmisible y está asociado a una progresión más rápida de la enfermedad. Los subtipos A, C, F y G presentan polimorfismos naturales en la proteasa y la transcriptasa reversa lo que contribuye a la resistencia en el subtipo B (Pineda *et al.*, 2013).

## 9. Análisis filogenético

La infección por VIH fue una pandemia controlada en países en vías de desarrollo, pero actualmente ha incrementado el número de casos en países con nivel económico y sanitario adecuado, principalmente en hombres que tienen sexo con hombres. La principal causa del incremento de la propagación del VIH es la terapia antiviral eficiente. También se ha relacionado con características sociales y el comportamiento de los pacientes (Abecasis *et al.*, 2013).

La filogenia molecular es la ciencia que estudia la estimación de la evolución y se basa en la comparación de secuencias genéticas. Por lo tanto, el análisis filogenético permite relacionar evolutivamente diferentes secuencias moleculares; se ha podido determinar el origen de la epidemia de VIH-1, análisis de clados o cluster de transmisión de VIH, determinar la relación entre los eventos migratorios y la diseminación de VIH y entender el aumento o disminución de determinados subtipos de VIH, esto se conoce como filodinámica (Abecasis *et al.*, 2013; Yebra *et al.*, 2013).

Esta ciencia consta de tres partes importantes para poder realizar el análisis filogenético:

- Alineamiento múltiple de secuencias.
- Selección de un modelo de evolución relacionado con las secuencias.
- Construcción del árbol filogenético, en base al algoritmo evolutivo de interés. (Pérez, 2016).

## 9.1 Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos son estimaciones de la historia evolutiva de varias secuencias, esta es representada como una ramificación dentro del árbol. Además, permiten inferir relación evolutiva entre las secuencias, mediante las relaciones entre genes o fragmentos de un individuo. Para que la estimación de la relación filogenética sea real, las secuencias deben ser homólogas y las muestras deben estar en un mismo marco evolutivo (Hall y Barlow, 2006).

Los grupos de taxones que pueden ser estudiados son especies, géneros u otra categoría taxonómica, estas se conocen como unidades taxonómicas operacionales (UTO). Los grupos de taxones que comparten un mismo nodo con un mismo origen filogenético son clados o cluster. Para analizar la topología de estos árboles filogenéticos se utilizan métodos estadísticos, el más utilizado es el análisis de bootstrap, el cual asigna un valor en forma de porcentaje a cada nodo. Un valor bootstrap de 70% o mayor, significa que las agrupaciones del árbol filogenético son fiables. Por otro lado, para analizar de manera estadística cada uno de los nodos, se utilizan valores de probabilidad a posteriori (pp). Estos son similares a los valores bootstrap, un valor pp mayor a 0.8 es fiable (Hall y Barlow, 2006; Pérez, 2016).

## 9.2 Metodologías para análisis filogenéticos para VIH-1

Los métodos de análisis filogenéticos más utilizados, para el análisis de los distintos clados de transmisión de VIH-1 son el Método de Neighbor-Joining y el método de Máxima Verosimilitud. Ambos métodos son clásicos y utilizan el análisis de bootstrap (0 – 100%) para determinar la fiabilidad de las distintas agrupaciones filogenéticas. También existen métodos avanzados, en los cuales se utiliza métodos probabilísticos para determinar la fiabilidad, estos se expresan en valores de probabilidad a posteriori de 0 a 1. Estos son utilizados con menor frecuencia, ya que son más complejos (Pérez, 2016).

Es difícil comparar estudios de impacto epidemiológico y clínico ya que se utilizan diferentes métodos de subtipificación y la clasificación de los subtipos o clados de VIH-1 puede diferir según el método empleado. El estándar de oro para la clasificación del VIH-1 se basa en el análisis filogenético de secuencias del genoma de longitud completa, pero este método no es ampliamente utilizado en situaciones clínicas. La mayoría de los datos disponibles en relación a esto, se derivan de ensayos genotípicos para la resistencia a los inhibidores de proteasa y de la transcriptasa reversa; el análisis filogenético manual (MPhy) sobre la región *pol* se puede utilizar para la identificación de los subtipos. Sin embargo, con un conjunto grande de datos es necesario la utilización de herramientas automatizadas, ya que el subtipificado manual es complicado (Pineda *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2007).

Existen tres tipos principales de herramientas automatizadas que se basan en el método utilizado para asignar un clado de VIH-1 a una secuencia de interés. (1) las herramientas basadas en similitud incluyen la herramienta de subtipificación NCBI, Stanford, Geno2pheno y EuResist. (2) herramientas basadas en estadísticas, estas utilizan algoritmos de comprensión como modelos como Context-based Modeling for Expeditious Typing (COMET), algoritmos basados en la especificación de posición como STAR o modelos de perfil de salto de Hidden Markov, como jpHMM. (3) herramientas filogenéticas tales como REGA y SCUEAL (Pineda *et al.*, 2013).

## **10. REGA**

Esta herramienta está diseñada para utilizar métodos filogenéticos con el fin de identificar los subtipos de una secuencia específica, la secuencia es analizada por métodos de recombinación utilizando “Bootscreening” (Stanford University, 2014).

Con esta herramienta de subtipificación se utiliza el análisis filogenético para tomar en cuenta las relaciones epidemiológicas y evolutivas entre subtipos, es decir que

se aproxima al estándar de oro para clasificar los subtipos. La herramienta de subtipado REGA versión 2 (REGAv2) contaba con un alto número de secuencias no asignadas, debido al número limitado de CRFs incluidos en los datos de referencia y por el fin de lograr una alta especificidad al costo de la sensibilidad. Para superar estas limitaciones la nueva versión, REGAv3, utiliza un algoritmo de árbol mejorado, orientado a aumentar el reconocimiento de subtipos puros y recombinantes. Además, también se ha mejorado el conjunto de datos de referencia para incluir cepas más divergentes por subtipo y así poder clasificarlas de forma más específica (Pineda *et al.*, 2013).



### III. JUSTIFICACIÓN

El virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) se clasifica en dos variantes principales, VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 causante de la mayoría de las infecciones a nivel mundial, se divide en tres grupos: Grupo M, responsable de la mayor parte de las infecciones del mundo; grupo O, forma vírica rara detectada únicamente en Camerún, Gabón y Francia; y grupo N, detectado sólo en algunas mujeres de Camerún (Fauci *et al.*, 2008). Actualmente se han identificado nueve subtipos de VIH-1 (A – D, F – H, J y K) y 58 formas recombinantes circulantes (CRF). El subtipo B es predominante en América, Europa y Australia, aunque solamente causa el 10% de las infecciones a nivel mundial; el subtipo C causa casi el 50% de las infecciones globales, mientras que el subtipo A causa 12% de las infecciones globales (Pineda *et al.*, 2013).

Las variables de VIH-1 presentan una separación geográfica en todo el mundo. La información proveniente de Centroamérica es limitada. En el 2013 se realizaron ensayos filogenéticos en base a la secuencia *pol* del VIH-1, en seis países centroamericanos; evidenciando que la introducción de VIH-1 subtipo B en Centroamérica causa la mayoría de los casos actuales (Murillo *et al.*, 2013). En Guatemala se ha reportado la presencia de subtipo B (96.6%), también se ha determinado prevalencia de formas recombinantes BF1 (2.8%) y del subtipo C; sin embargo, no se ha realizado ningún análisis filogenético que indique las variantes que hay de este subtipo (Avila *et al.*, 2011). Debido a esto se subtipificó las secuencias de la región *pol* del VIH-1 obtenidas durante el período del 2010 al 2015, con el fin de identificar las variantes circulantes del país.

Este constituye el primer estudio filogenético que se realiza en secuencias virales del gen *pol* obtenidas durante cinco años en una clínica de atención integral de VIH del país.

## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Determinar las variantes circulantes del VIH-1 en muestras obtenidas en una clínica de atención integral de VIH de Guatemala los años 2010 a 2015, por medio el análisis de la subtipificación de las secuencias del gen viral *pol*.

### B. Objetivos específicos

- Caracterizar las variantes de VIH-1 que circulan en muestras obtenidas en una clínica de atención integral de VIH de Guatemala mediante un análisis filogenético.
- Evaluar las relaciones de las secuencias de los distintos subtipos presentes en muestras obtenidas en una clínica de atención integral de VIH de Guatemala en un período de cinco años.
- Describir las características demográficas comunes en las secuencias de muestras obtenidas en una clínica de atención integral de VIH de Guatemala.

## **V. HIPÓTESIS**

El estudio fue descriptivo, por lo que la formulación de hipótesis no aplicaba.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

**1. Diseño de la investigación:** El diseño del estudio es retrospectivo, transversal y descriptivo.

**2. Definición de la población:** Muestras positivas para VIH-1 de pacientes con fallo virológico, obtenidas en una clínica de atención integral de VIH de la ciudad de Guatemala durante los años 2010 – 2015.

**3. Período de estudio:** 5 años, de 2010 a 2015.

**4. Marco muestral:** Secuencias genéticas de la región *pol* del VIH-1 de los virus infectantes de muestras obtenidas en una Clínica de Atención Integral de VIH de la ciudad de Guatemala durante los años 2010 – 2015.

**5. Tamaño y selección de la muestra:** No aplica, se analizaron todas las 400 secuencias genéticas del período indicado.

**6. Tipo de muestreo:** No aplica, se analizaron todas las secuencias genéticas del período indicado.

### 7. Criterios de inclusión y exclusión

**7.1 Criterios de inclusión:** Secuencias genéticas de la región *pol* de VIH-1 de muestras a las que se haya realizado genotipo.

**7.2 Criterios de exclusión:** Secuencias repetidas que correspondan a muestras de un mismo paciente.

### 8. Procedimientos

**8.1 Recolección de datos:** Las secuencias de la región *pol* del VIH-1 se obtuvieron de muestras a las cuales se les realizó la prueba de genotipo en la Clínica de Atención Integral de VIH, en los años 2010 – 2015. Se utilizó una hoja de captura de datos en el programa Microsoft Excel 2016.

**8.3 Análisis filogenético:** Para la determinación de los distintos subtipos de HIV-1 presentes en Guatemala durante los años 2010 – 2015 se utilizó la herramienta REGA HIV-1 Subtyping Tool – Version 3.0 y las secuencias obtenidas por la prueba de genotipo en formato FASTA.

## **9. Plan de análisis**

Se realizó un análisis univariado determinando las frecuencias e intervalos de confianza al 95% para la variable de género. Para la variable de edad se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión. Para el análisis filogenético se utilizaron árboles filogenéticos para determinar la relación entre las variantes de HIV-1, mediante el software REGA HIV-1 Subtyping Tool – Versión 3.0.

## **10. Control de sesgos**

No se realizó una selección de los participantes, se trabajó con todas las muestras de la población VIH-positivo de la Clínica de Atención Integral durante los años 2010 – 2015.

## **11. Recursos**

### **11.1 Recursos humanos**

- Investigador: Licda. Ana Oliva
- Asesora: Dalia Lau-Bonilla, Ph.D.

### **11.2 Recursos físicos**

- Instalaciones de la Clínica de Atención Integral de VIH.
- Boletas de recolección de datos
- Computadora con servicio de internet para acceder a REGA HIV-1 Subtyping Tool – Version 3.0.

### **11.3 Recursos financieros**

- Materiales de oficina (hojas y tinta para impresión)

## **12. Limitaciones del estudio**

Limitación de información, en algunos casos no se obtuvo toda la información de los pacientes a los cuales se les realizó la prueba de genotipo.

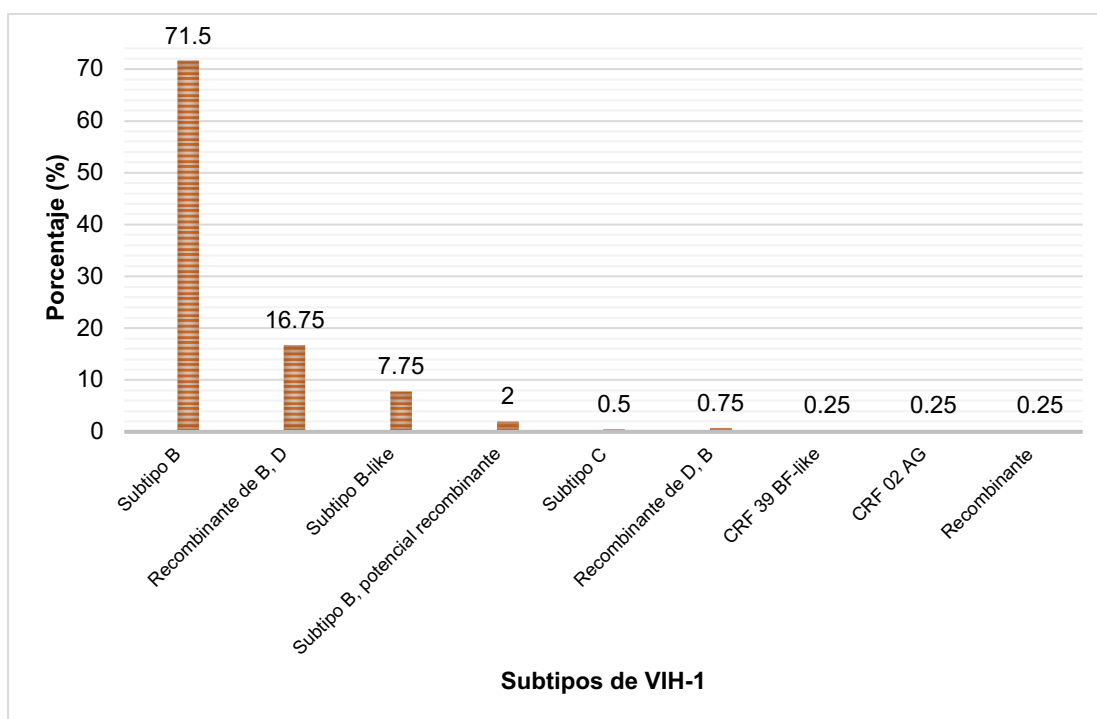
## **13. Consideraciones éticas**

No se realizó un consentimiento informado ya que es un estudio secundario, por lo que no se trabajó directamente con los pacientes. Cabe mencionar que durante toda la investigación se mantuvo la confidencialidad de cada uno de los pacientes de los cuales se analizó las secuencias; cada paciente se identificó con un número correlativo.

## VII. RESULTADOS

Se analizaron 400 secuencias genéticas de la región *pol* del VIH-1, las muestras fueron obtenidas en una clínica de atención integral de VIH de la Ciudad de Guatemala, en un período de cinco años (2010 – 2015).

En la siguiente figura (figura 3) se muestran los porcentajes de los distintos subtipos de VIH-1 presentes en las muestras estudiadas de Guatemala, durante los años 2010 – 2015. Se puede observar que el subtipo con mayor prevalencia es el subtipo B (71.5%) y el de menor prevalencia son las formas recombinantes (0.25%).



**Figura 3.** Porcentaje de los distintos subtipos de VIH-1 presentes en Guatemala.

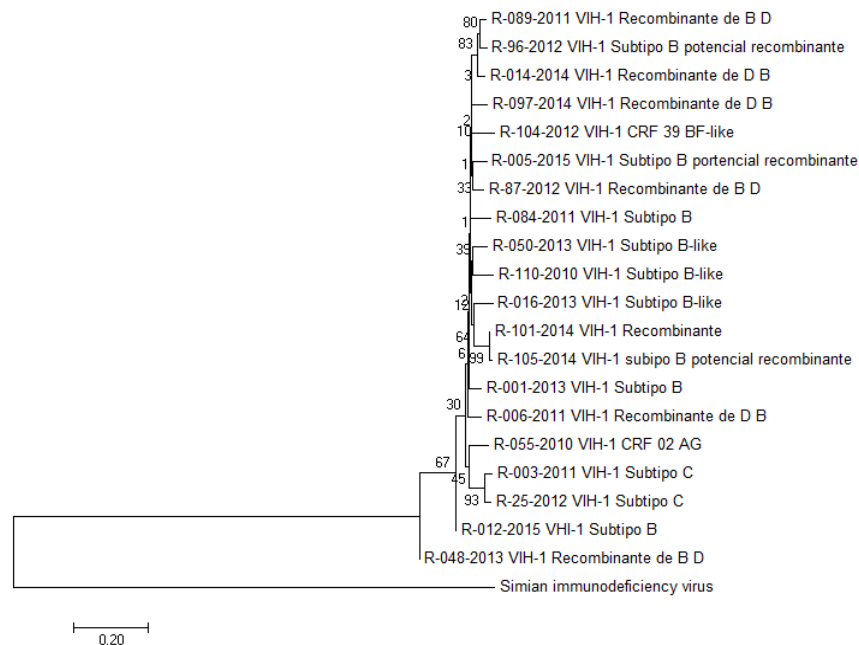
En base a los análisis filogenéticos realizados, el modelo de evolución de VIH-1 fue “General time-reversible model”, con distribución gamma (GTR+G); obtenido

mediante el criterio de información Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC), como se muestra en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Modelo de evolución de VIH-1 obtenido mediante ambos criterios de información con el programa jModelTest.

Criterio de Información	Modelo	Valor delta ( $\Delta$ )
Akaike (AIC)	GTR+G	0.000000
Bayesiano (BIC)	GTR+G	0.000000

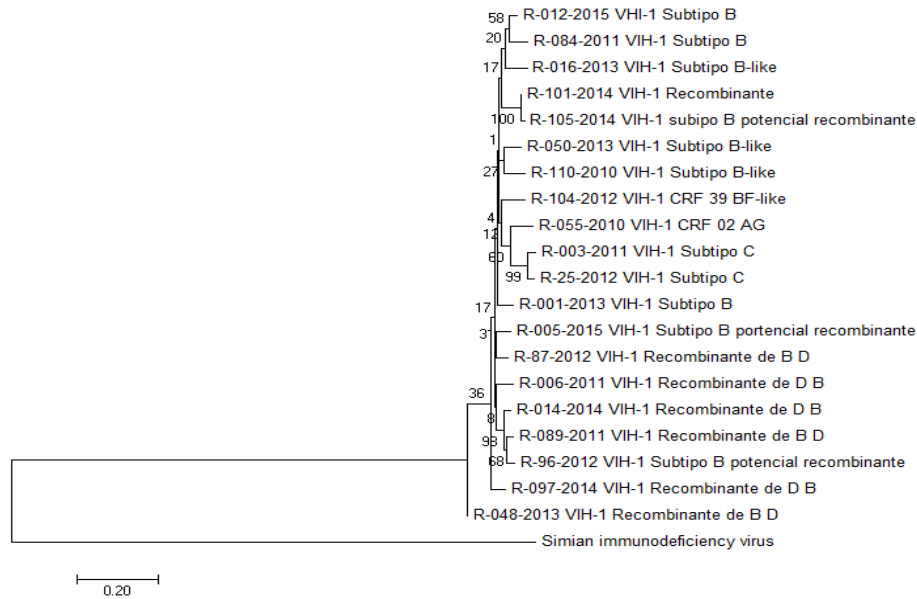
En la figura 4, se muestra el árbol filogenético de los distintos subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, realizado mediante el método de Neighbor Joining, con 100 réplicas bootstrap.



**Figura 4.** Árbol filogenético de los distintos subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala por el método de Neighbor Joining, realizado en MEGA 7.



En la figura 5, se observa el árbol filogenético de los subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, estimado mediante el método de máxima verosimilitud, con 100 réplicas bootstrap.



**Figura 5.** Árbol filogenético de los distintos subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala por el método de Máxima Verosimilitud, realizado en MEGA 7.

Con relación a los datos demográficos analizados, se puede observar que el subtipo que predomina en ambos géneros, en las distintas edades y en las distintas regiones es el VIH-1 subtipo B. Los datos analizados fueron el género (figura 6), rango de edad (figura 7) y la procedencia de cada una de las secuencias estudiadas (figura 8).

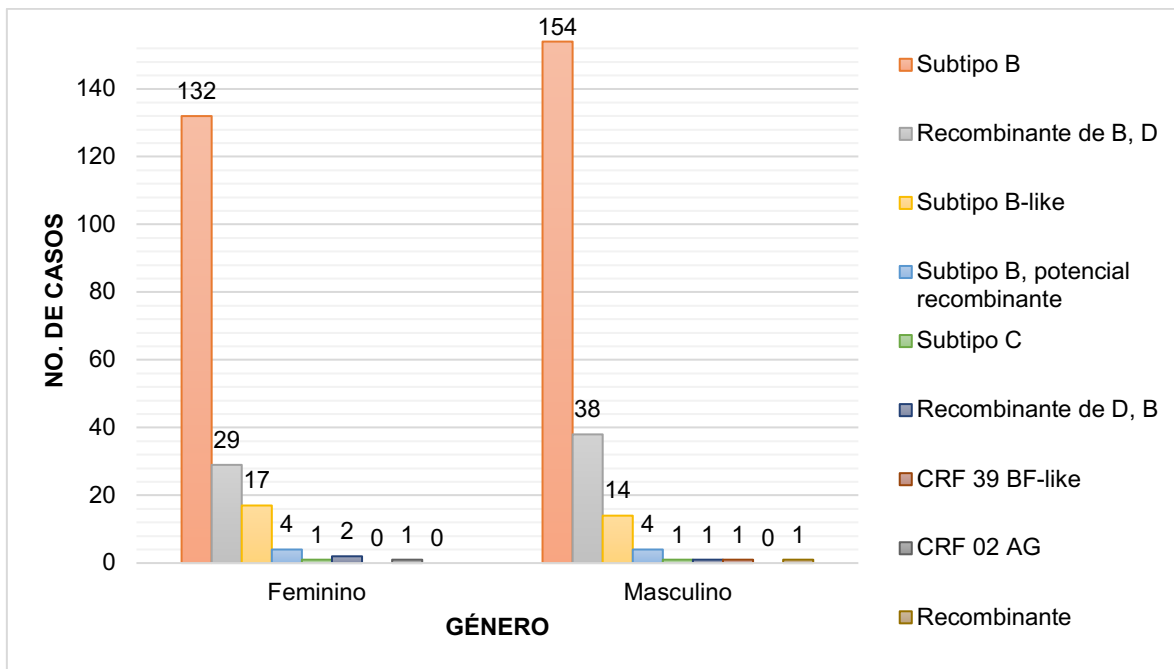


Figura 6. Subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, en base al género.

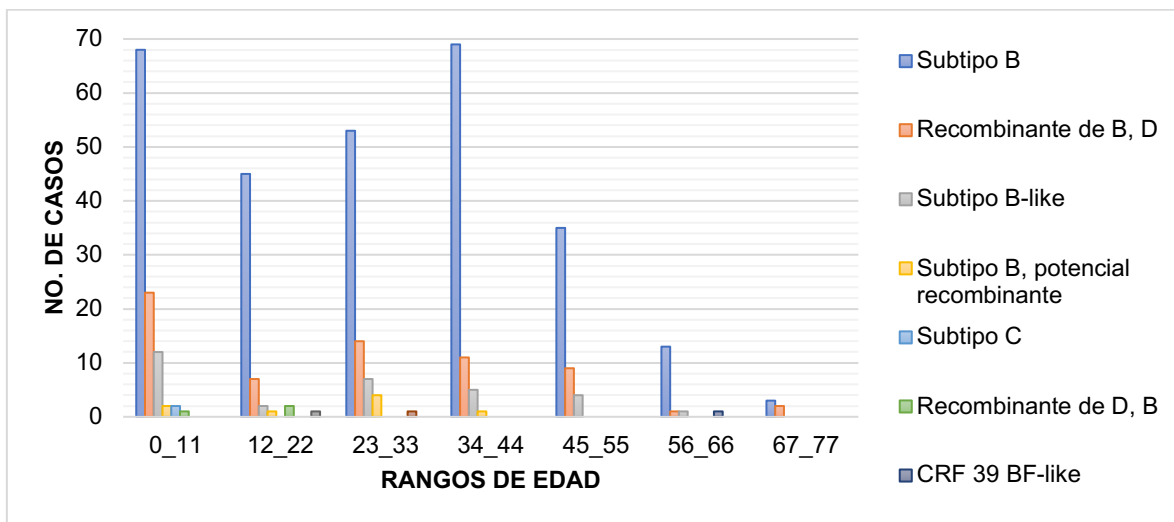
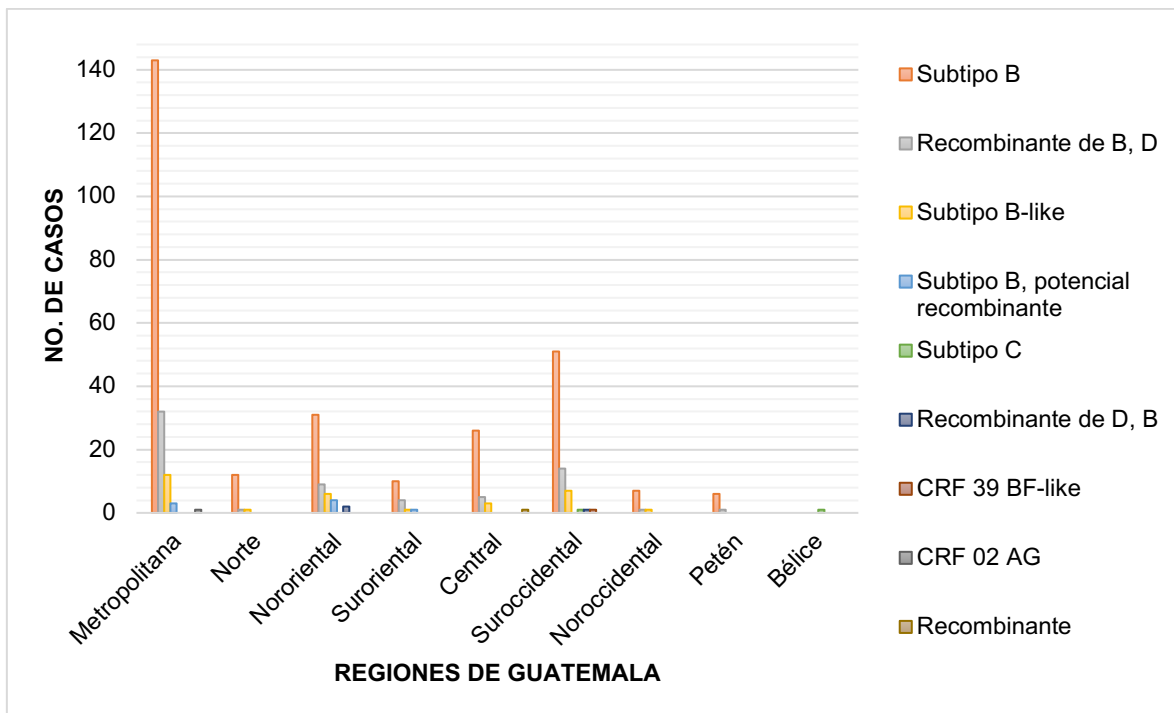


Figura 7. Subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, en base a los distintos rangos de edad de los pacientes.



**Figura 8.** Subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, en base a la región procedente.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal de la investigación fue determinar las variantes circulantes del VIH-1 en muestras obtenidas en una clínica de atención integral de VIH de Guatemala los años 2010 a 2015, por medio el análisis de la subtipificación de las secuencias del gen viral *pol*.

Como se observa en la figura 3, el subtipo de VIH-1 con mayor prevalencia en Guatemala en pacientes VIH positivo es el VIH-1 subtipo B (71.5%), lo cual concuerda con el estudio realizado en 2011 en el Hospital Roosevelt en la Ciudad de Guatemala. El segundo subtipo más prevalente fue la forma recombinante BD (16.75%), esta no había sido notificada anteriormente. Se determinaron otras formas recombinantes, las cuales se forman por recombinación de fragmentos genómicos de distintos subtipos, como CRF39\_BF y CRF02\_AG. Este último es una variante no-B procedente de África y Asia; en los lugares donde predomina el subtipo B, como España, el resto de Europa y América, se ha visto una circulación creciente de subtipos no-B, como CRF02\_AG, que ha sido encontrado en pacientes procedentes de África occidental (Delgado, 2010). Esto sugiere que el subtipo CRF02\_AG proviene de un paciente que viajó a África o que tuvo contacto con alguna persona que estuvo en África. Por otro lado, se determinaron dos casos de subtipo C, equivalente al 0.5%. Este subtipo está asociado a transmisión sexual en distintos lugares del mundo (López *et al*, 2016). La variabilidad de los subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, se debe a posibles eventos de recombinación, falta de adhesión al tratamiento antirretroviral, relaciones sexuales sin protección y numerosas parejas sexuales (Taylor *et al.*, 2010).

Para la evaluación de las relaciones de las secuencias de los distintos subtipos de VIH-1 circulantes en Guatemala, se seleccionaron secuencias significativas de todos los subtipos identificados por REGA. Para el alineamiento se utilizó un Gap Opening Penalty de 100, con el fin de disminuir la cantidad de gaps dentro del

alineamiento y un Gap Extension Penalty de 0.1 para que los gaps fueran más pequeños. Además, se utilizó un grupo externo (outgroup) para poder identificar la raíz del árbol filogenético. Este grupo debe estar relacionado de forma distante con las secuencias de interés, por esto se utilizó el *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV), el cual al igual que el VIH es un retrovirus, causante de infecciones en 45 especies de primates no humanos. Como se observa en los resultados, el outgroup se presenta como una rama con mayor longitud que el resto y con un nodo más cercano a la raíz, es decir que está separado por una mayor distancia genética de los subtipos de VIH-1.

El modelo de evolución del alineamiento que más se ajusta a las secuencias analizadas fue el “general time-reversible model” (GTR), el cual incorpora distintas tasas para cada cambio y diferentes frecuencias de nucleótidos y presenta seis tipos de sustituciones. Además, el alineamiento presentó una distribución Gamma en la tasa de variación entre sitios (+G) (cuadro 1). Este modelo indica que el proceso evolutivo del VIH es completo (Arenas, 2015). Para obtener el modelo de evolución de las secuencias de interés, se seleccionaron tres tipos de sustituciones para evaluar el grado de ajuste de 24 modelos diferentes y estimar la filogenia mediante el método de inferencia bayesiana. Además, se incluyeron los modelos que asumen misma frecuencia de bases, así como los que asumen distinta frecuencia, los modelos que asumen la proporción de sitios que varían como los que no y los modelos que asumen diferente tasa de variación entre sitios como los que no. Por otro lado, en el cuadro 1 se puede observar el valor delta, el cual indica la diferencia entre el valor del criterio de información del mejor modelo con el especificado, si este valor es inferior a 3, significa que ese es el mejor modelo que se ajusta a las secuencias. En ambos criterios de información (AIC y BIC) fue GTR+G.

En base al modelo de evolución se realizaron dos análisis filogenéticos para determinar la evolución de los subtipos de VIH-1. Estos análisis se realizaron con el programa MEGA7: (1) Neighbor-joining, el cual es un método basado en distancias

y en el criterio de mínima evolución y (2) Máxima verosimilitud, método basado en caracteres para realizar inferencias filogenéticas; además utiliza técnicas estadísticas para inferir la distribución de probabilidad (Instituto de Ecología, 2009). Como podemos observar en la figura 4 y 5 del apartado de resultados, en ambos árboles filogenéticos los distintos subtipos de VIH-1 se encuentran relacionados evolutivamente entre sí, ya que todos pertenecen al tipo de VIH-1, es por eso que se encuentran en un mismo clado del árbol. La principal diferencia entre ambos árboles son los valores bootstrap en cada clado, esto se debe a que con el segundo método se basa en probabilidades y la dispersión se mide en función del ajuste entre los datos observados y las predicciones calculadas por un árbol particular y el modelo de evolución. Es decir que este método es más óptimo. No todos los valores fueron mayores a 50% en las ramas del árbol con ambos métodos, lo que indica que no todas las ramas son fiables. La razón de esto es que no se tomaron en cuenta las mutaciones por resistencia a antirretrovirales de las distintas secuencias analizadas, por lo tanto, es recomendable realizar el análisis con un alineamiento reducido para obtener valores de probabilidad más confiables.

En relación con los datos demográficos, se puede observar que el subtipo que predomina en ambos géneros, en las distintas edades y en las distintas regiones es el VIH-1 subtipo B. Con relación al subtipo C, este se detectó en un niño y una niña con un rango de edad entre 0 – 11 años, y son provenientes de la región suroccidente (San Marcos) y Belice. Este subtipo de VIH-1 no es muy prevalente en América, sin embargo, en el año 2011 se determinó una prevalencia de 0.7% de este subtipo en Guatemala y es el causante de casi el 50% de las infecciones globales (Pineda *et al.*, 2013).

Las secuencias utilizadas son de pacientes que presentan fallo virológico, es decir que el tratamiento antirretroviral deja de reducir y mantener la carga viral de un paciente en menos de 200 copias/ml. Debido a esto, no se realizó un análisis en base al tiempo ya que no se determinaría el subtipo de VIH-1 con el cual fueron

infectado, además, el genoma de los pacientes presenta distintas mutaciones, lo que genera distintas formas recombinantes del virus. Sin embargo, se determinó menor cantidad de casos en el año 2015 en comparación al 2010, lo que significa que los pacientes son tratados adecuadamente con los distintos antirretrovirales que necesitan en base a la farmacorresistencia y farmacotoxicidad que presentan.

La variabilidad genética del VIH hace que los distintos subtipos presenten diferentes características biológicas que les confieran distinta capacidad replicativa, tropismo celular y susceptibilidad a fármacos; estos cambios genéticos pueden alterar la respuesta al tratamiento. Por lo tanto, la importancia de este estudio es a nivel biológico y epidemiológico; ya que al conocer los distintos subtipos de VIH-1 presentes en Guatemala, permite conocer el comportamiento epidemiológico a nivel molecular de la pandemia, permite la monitorización de las conexiones entre diferentes poblaciones, ayuda al entendimiento de la transmisión viral y la patogenia del SIDA, y principalmente al desarrollo de vacunas y terapias antirretrovirales eficaces (Ríos *et al.*, 2003).

La principal limitación del estudio fue la falta de información sobre el momento en que los pacientes fueron infectados, debido a esto no se pudo analizar la prevalencia de los distintos subtipos de VIH-1 en distintos años en Guatemala. Por lo tanto, es recomendable tomar en cuenta el año de infección y no el año de toma de muestra.

Los resultados obtenidos pueden ser considerados para el diseño de estudios epidemiológicos de mayor escala en el país, para conocer las variantes del VIH-1 que circulan actualmente en Guatemala. Además, en base a los resultados se pueden realizar estudios futuros para determinar la relación de las variantes circulantes de VIH-1 con la respuesta al tratamiento antirretroviral que se les brinda a los pacientes.

## IX. CONCLUSIONES

- Las variantes circulantes de VIH-1 con mayor prevalencia en Guatemala son el VIH-1 subtipo B, con un 71.5%, y la forma recombinante BD, con un 16.75%.
- Se determinó dos casos de VIH-1 subtipo C, lo que equivale a un 0.5%.
- Se determinó la prevalencia de distintas formas recombinantes, como CRF39\_BF y CRF02\_AG, las cuales pudieron llegar a Guatemala mediante personas que han estado en África o que han tenido contacto con otras personas que han estado en este continente.
- Los distintos subtipos de VIH-1 se encuentran relacionados evolutivamente entre sí, ya que todos pertenecen al mismo tipo de VIH (VIH-1). Por lo que se encuentran en un mismo clado del árbol filogenético.
- El subtipo de VIH-1 más predominante en Guatemala, en distintas regiones, a distintas edades y en ambos géneros analizados es el subtipo B.



## X. RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar un alineamiento reducido, es decir sin tomar en cuenta las mutaciones presentes en las secuencias, con el fin de evitar valores bajos de probabilidad en los análisis filogenéticos.
- Para realizar un análisis en base al tiempo, es recomendable tomar en cuenta el tiempo (año) en que los pacientes fueron infectados y no el año en que se tomó la muestra. Así, se puede conocer la prevalencia de los distintos subtipos de VIH-1 en distintos años.
- Para subtipificar conjuntos de datos *pol* grandes, como los que son utilizados en entornos clínicos y de vigilancia, es recomendable utilizar herramientas automatizadas.
- Con relación a estudios que requieran mayor precisión, como análisis epidemiológicos, se recomienda utilizar dos herramientas de subtipaje con rendimiento alto en la región genética de interés, tales como COMET y REGAv3.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecasis, A., Wensing, A., Paraskevis, D., Vercauteren, J., Theys, K. y D. Van de Vijver. (2013). HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*. 10: 7.
- Arenas, M. (2015). Trends in substitution models of molecular evolution. *Frontiers in Genetics*. 6(319). doi: 10.3389/fgene.2015.00319
- Avila, S. *et al.* (2011). Prevalence and patterns of VIH transmitted drug resistance in Guatemala. *Rev. Panam. Salud Pública*. 30(6): 641-648.
- Brown, T. y R. Qaqish. (2006). Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS*. 20: 2165-2174.
- Cambiano, V., O'Connor, J., Phillips, A., Rodger, A., Lodwick, R., Pharris, A., Lampe, F., Nakagawa, F., Smith, C. y M. van der Laar. (2013). Antiretroviral Therapy for Prevention of HIV Transmission: Implications for Europe. *Eurosurveillance*. 18(48): 1-23.
- Conway B. (2000). Initial therapy with protease inhibitor-sparing regimens: evaluation of nevirapine and delavirdine. *Clin Infect Dis*. 2: S130-4.
- Corbet, S., Muller, M., Versmisse, P., Delarue, S., Ayoub, A. y J. Lewis. (2000). *Env* sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol*. 74: 529-534.
- Delgado, R. (2010). Características virológicas del VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 29(1): 58 – 65.
- Dybul, M., Fauci, A., Bartlett, J., Kaplan, J. y A. Pau. (2002). Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. *Ann Intern Med*. 3: 381-433.
- Engelman, A. y P. Cherepanov. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Microbiol*. 10(4): 279-290.
- Eshleman, S., Hoover, D., Chen, S., Hudelson, S., Guay, L. y A. Mwatha. (2005).

- Necirapine (NVP) resistance in women with HIV-1 subtype C, compared with subtypes A and D, after the administration of single-dose NVP. *J. Infect. Dis.* 192: 30-36.
- Fauci, A. *et al.* (2008). Harrison Principios de Medicina Interna Vol. I. Décimo séptima edición. Editorial Mc GrawHill. México. 736 pp.
- Galli, M., Ridolfo, A., Adorni, F., Gervasoni, C., Ravasio, L., Gianelli, E., Piazza, M., Vaccarezza, M., d'Arminio, A. y M. Moroni. (2002). Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1-infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *JAIDS.* 29(1): 21-31.
- Gao, F., Vidal, N., Li, Y., Trask, S., Chen, Y. y L. Kostrikis. (2001). Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 17:675-688.
- Geretti, A. (2006). HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:1-7.
- Hall, B, y M. Barlow. (2006). Phylogenetic Analysis as a Tool in Molecular Epidemiology of Infectious Disease. *Ann Epidemiol.* 16(3): 44-63.
- Hoffman, C. y J. Rockstroh. (2013). HIV book 2012/2013. Medizin Fokus Verlag. Hamburg. 761 pp.
- Instituto de Ecología. (2009). Teoría y Métodos Cladístico. Recuperado de: <http://www.filogenetica.org/cursos/deluna/metodos%20cladisticos/introduccion.htm>
- Kuritzkes, D. (2009). HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr Opin HIV AIDS.* 4(2): 82-7.
- Lahuerta, M. (2009). Epidemiología Molecular y Control de la Transmisión Vertical del VIH-1: En un área endémica de malaria del sur de Mozambique. (Tesis doctoral). Universitat de Barcelona, España.
- López, P., Rivera, V., Rodríguez, N., Vargas, F. y Y. Yamamura. (2016). The Genetic

- Diversity and Evolution of HIV-1 Subtype B Epidemic in Puerto Rico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15, 55. doi:10.3390/ijerph13010055
- McCutchan, F. (2000). Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS*. 14: S31-S44.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (2013). Programa Nacional de Prevención y Control de ITS, VIH y SIDA. Guía de tratamiento antirretroviral y de infecciones oportunistas. Guatemala. Recuperado de: <http://infecciosashr.org/download/64/>
- Murillo, W., Veras, N., Prospero, M., Lorenzana, I., Paz, G., Morales, S., Juarez, S., Yang, C., DeVos, J., Marín, J., Mild, M., Albert, J. y M. Salemi. (2013). A Single Early Introduction of VIH-1 Subtype B into Central America Accounts for Most Current Cases. *JVI*. 87(13): 7463-7470.
- Nájera, R., Delgado, E., Pérez, L. y M. Thomson. (2002). Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS*. 16: S3-S16.
- Nájera, R. (2011). Erradicación y control de las enfermedades producidas por virus. Fundación Ramón Areces. Recuperado de: [http://sgfm.elcorteingles.es/SGFM/FRA/recursos/doc/Libros/1967436976\\_197201211116.pdf](http://sgfm.elcorteingles.es/SGFM/FRA/recursos/doc/Libros/1967436976_197201211116.pdf)
- Nolan, D. (2003). Metabolic complications associated with HIV protease inhibitor therapy. *Drugs*. 63(23): 2555-74.
- ONUSIDA. (2018). HIV and AIDS Estimates. Guatemala. Recuperado de: <http://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/guatemala>
- Pasquier, C., Millor, N., Njouom, R., Sandres, K., Cazabat, M., Puel, J. y J. Izopet. (2001). VIH-1 subtyping using phylogenetic analysis of *pol* gene sequences. *Journal of Virological Methods*. 94: 45-54.
- Pérez, C., Vial, P., Dorman, K., Wang, G., Wang, G., Abarca, K., Sinsheimer, J. y A. Kaplan. (1999). Molecular epidemiology of the human immunodeficiency virus tipe 1 in Santiago, Chile. *Rev. méd. Chile*. 127(11): 1294-1304.
- Pérez, S. (2016). Informe de tesis doctoral: Las herramientas de análisis

- filogenético para el estudio de la propagación de la epidemia de VIH-1 en Andalucía Oriental. *Universidad de Granada*. Recuperado de: <https://hera.ugr.es/tesisugr/26128287.pdf>
- Pineda, A., Rodrigues, N., Imbrechts, S., Libin, P., Barroso, A., Deforche, K., Gómez, A., Camacho, R., de Oliveira, T. y A. Vandamme. (2013). Automated subtyping of VIH-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: Performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infection, Genetics and Evolution*. 19: 337-348.
- Piscitelli, S. y K. Gallicano. (2001). Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections. *N Engl J Med*. 344(13): 984-96.
- Posada, D., Crandall, K. y D. Hillis. (2007). Phylogenetics of HIV. *Computational and Evolutionary Analysis of HIV Molecular Sequences*. 121-160 pp.
- Resik, S. (2008). Informe final de tesis: Evaluación de la consistencia del patrón epidemiológico de transmisión en dos cadenas cubanas de seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 mediante análisis filogenético. *Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"*. Recuperado de: [http://tesis.repo.sld.cu/36/1/sonia\\_resik.pdf](http://tesis.repo.sld.cu/36/1/sonia_resik.pdf)
- Ríos, M., Villanueva, C., San Martín, C. y E. Ramírez. (2003). Identificación de subtipos B y F de VIH-1 en pacientes chilenos. *Revista médica de Chile*. 131(7): 711-718.
- Robertson, D., Sharp, P., McCutchan, F. y B. Hahn. (1995). Recombination in HIV-1. *Nature*. 374:124-126.
- Robertson, D., Anderson, J., Bradac, J., Carr, J., Foley, B. y R. Funkhouser. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science*. 288: 55-56.
- Silvestre, L. (2010). Informe final de tesis: Infecciones de transmisión sexual en personas viviendo con VIH/SIDA con o sin tratamiento antirretroviral. *Universidad de San Carlos de Guatemala*. Recuperado de: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/05/05\\_8736.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/05/05_8736.pdf)
- Soriano, V., Arastéh, K., Migrone, H., Lutz, T., Opravil, M., Andrade, J., Antunes,

- F., Di Perri, G., Podzamczar, D., Taylor, S., Domingo, P., Gellermann, H. y L. de Rossi. (2011). Nevirapine versus atazanavir/ritonavir, each combined with tenofovir disoproxilfumarate/emtricitabine, in antiretroviral-naive HIV-1 patients: the ARTEN Trial. *Antivir Ther.* 16(3): 339-48.
- Stanford University. (2014). REGA HIV-1 Subtyping Tool – Version 3.0. Recuperado de: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>
- Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Yamaguchi, Y., Mboudjeka, I. y Y. Harada. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in Cameroon. *J Virol.* 73: 6810-6820.
- Taylor, L., León, M., Solano, A., Herrera, G., Boza, R., León, B., Lufting, R. y K. Visoná. (2010). Variability in HIV-1 partial genomic sequences in Costa Rican patients: analysis with different bioinformatics tools. *Rev Panam Salud Pública.* 27(1): 23-31.
- Thomson, M. y R. Nájera. (2005). Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev.* 7:210-224.
- Turner, B. y M. Summers. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol.* 285: 1-32.
- U.S. Department of Health and Human Services. (2017). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV. AIDS info. Recuperado de: [https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/glchunk/glchunk\\_10.pdf](https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/glchunk/glchunk_10.pdf)
- Yebra, G., Holguín, A., Pillay, D. y S. Hué. (2013). Phylogenetic and demographic characterization of HIV-1 transmission in Madrid, Spain. *Infect Genet Evol.* 14: 232 – 239.
- Youle, M. (2007). Overview of boosted protease inhibitors in treatment-experienced HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother.* 60(6): 1195-205.

## XII. ANEXOS

### Anexo I: Glosario de conceptos filogenéticos

**Bootstrap:** Método estadístico más utilizado para analizar la topología los árboles filogenéticos.

**Criterio de información Akaike (AIC):** Medida de la bondad de ajuste de un modelo estadístico, describe la relación entre la exactitud y complejidad del modelo. Este es utilizado cuando el tamaño de la muestra es pequeño en comparación con el número de parámetros de los modelos.

**Criterio de información Bayesiano (BIC):** Medida de bondad de ajuste de un modelo estadístico, es utilizado como criterio para la selección de modelos entre un conjunto finito de modelos. Está estrechamente relacionado con AIC.

**Cladograma:** Es un diagrama ramificado en el cual se indican las relaciones filogenéticas de un grupo biológico. Este contiene taxones terminales, los cuales forman el grupo de estudio; un grupo externo (outgroup) el cual sirve para enraizar el árbol.

**Clado:** Cada una de las ramificaciones que se obtienen al realizar un corte en un árbol filogenético.

**Gap:** Se refiere a los espacios que deben ser introducidos en el alineamiento para compensar las deleciones o inserciones que ocurren a lo largo de la evolución.

**Gap extension penalty:** Penalización por extender un gap por un residuo. Mientras mayor es este valor, menores serán los gaps.

**Gap opening penalty:** Penalización por cada gap que se abre en el alineamiento, al aumentar este valor los gaps son menos frecuentes.

**Gap penalty:** Método de puntuación de alineamientos de dos o más secuencias.

**Grupo externo (outgroup):** Grupo de organismos que no pertenecen al grupo que está siendo analizado. Estos grupos proporcionan información sobre los estados ancestrales de los caracteres, por lo tanto, deben estar emparentados con el grupo de interés.

**Anexo II: Formato de captura de datos en el programa Microsoft Excel 2016**

Correlativo	Código		Datos demográficos				
	#ASI	Reporte	Año	Género	Edad	Departamento	Municipio
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							



Ana Gabriela Oliva Castillo  
**AUTORA**

PhD. Dalia Lau-Bonilla  
**ASESORA**

MSc. Tamara Ileana Velásquez Porta  
**DIRECTORA**

MA. Pablo Ernesto Oliva Soto  
**DECANO**