



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana
Informe de pasantía de grado

Epidemiología Molecular del VIH-1 en Uruguay: una retrospectiva de 15 años

Estudiante: Agustina Añasco Podchibiakin

Orientadora: Dra. Daiana Mir

Co-orientadora: Dra. Ana María Soler

Lugar de realización: Unidad de Genómica y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República.

Contacto: a.anasco@hotmail.com



Departamento
de Ciencias Biológicas
CENUR Litoral Norte - Udelar



Ministerio
de Salud Pública

Agradecimientos

Dedicada a las grandes mujeres que me formaron en la vida y la ciencia: Patricia, Adelia, Daiana y Ana.

Al Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP-MSP) de Uruguay, por proporcionar las secuencias y los datos necesarios para este proyecto, y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica, por financiar el proyecto “Vigilancia genómica del Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) en Uruguay”, de la Dra. Mir, del cual forma parte esta pasantía. Sin su colaboración, todo esto no hubiera sido posible.

A mis orientadoras, Daiana Mir y Ana Soler, por darme la oportunidad de realizar esta pasantía, guiarme durante todo el proceso y transmitirme sus valores más allá de lo académico, gracias por recibirme, acompañarme en todo momento y confiar en mí.

A mis compañeros de la Unidad de Genómica y Bioinformática y del Departamento de Ciencias Biológicas, que me motivaron desde el primer día a seguir este camino a través de sus clases, por recibirme como un colega más y generar un ambiente que durante mucho tiempo consideré mi hogar. Gracias por todos los consejos, el apoyo y los buenos momentos compartidos.

A la Licenciatura en Biología Humana, por permitirme alcanzar mis metas estando cerca de mi hogar. Especialmente, a Ana Egaña, quien me orientó durante toda la carrera y tuvo la paciencia suficiente para guiarme en cada paso. Gracias por el tiempo dedicado.

A mis amigos, que aún estando lejos fueron el sostén y la motivación para seguir durante todo este trayecto. Y en especial a Antonella y Juan Manuel, por tenerme esa fé que muchas veces me ayudó a seguir adelante.

A Facundo, por estar ahí en todo momento. Los brindis para festejar, la paciencia y los consejos cuando más lo necesité, sin importar la hora o el lugar. Gracias por confiar en mí y ayudarme a ser mejor cada día.

Por último, quiero agradecer enormemente a mi familia: a mi madre Patricia y a mi abuela Adelia. Sus enseñanzas y su constante aliento fueron el motor que me impulsó a seguir adelante cada día, desde pequeña, pues me enseñaron a seguir mis sueños. Gracias por estar a mi lado, celebrar conmigo los mejores momentos y sostenerme en los desafíos.

A todos ellos, gracias por permitirme vivir todas estas experiencias, acompañarme durante este proceso y, en especial, todo el apoyo y el cariño que me brindaron.

Índice

Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. Descubrimiento del VIH	5
1.2. Estado actual de la pandemia del VIH	5
1.2.1. Epidemia de VIH/SIDA en Uruguay	7
1.3. Estructura y genoma del VIH	7
1.4. Mecanismos generadores de diversidad	9
1.5. Clasificación	11
1.6. Distribución geográfica de los subtipos y recombinantes de VIH-1	13
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo General	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Materiales y métodos	16
3.1. Aspectos éticos	16
3.2. Secuencias nucleotídicas y Base de datos	16
3.3. Subtipado de secuencias	17
3.3.I. Filtrado de secuencias	17
3.3.II. Subtipado y alineamiento	18
3.3.III. Primera aproximación filogenética (FastTree)	18
3.3.IV. Obtención de los árboles por IQ-TREE	19
3.3.IV.1. Árbol de secuencias de subtipos puros y sub-subtipos	19
3.3.IV.2. Árbol de secuencias asignadas a linajes recombinantes ya descritos	19
3.3.IV.3. Árboles de secuencias sin asignación de linaje	19
3.3.V. Análisis de recombinación	20
3.4. Cálculo de la frecuencia, distribución de los linajes y análisis estadísticos	20
4. Resultados	23
4.1. Filtrado, Subtipado y alineamiento de secuencias	23
4.2. Análisis filogenético	23
4.2.1. Inferencia filogenética para asignación de linajes: primera aproximación	23
4.2.2. Optimización de la inferencia filogenética	25
4.2.2.1. Árbol filogenético de secuencias puras	25
4.2.2.2. Árbol filogenético de FRCs	26
4.2.2.3. Árboles de secuencias sin asignación de linaje	27
a) Con secuencias de referencia de subtipos puros del grupo M del VIH-1	27
b) Con secuencias de referencia de linajes recombinantes	28
4.3. Análisis de recombinación de las secuencias sin linaje asignado	29
4.4. Diversidad molecular del VIH-1 en Uruguay	30
4.5. Análisis estadísticos	32
4.5.1. Distribución Geográfica	32
4.5.2. Género	33
4.5.3. Vía de transmisión	35

4.5.4. Correlación Temporal	36
5. Discusión	38
6. Conclusiones	47
7. Perspectivas	49
8. Referencias bibliográficas	49
9. Anexo	59

Resumen

La gran variabilidad genética del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y su rápida diseminación, constituye un desafío para la especificidad de las pruebas diagnósticas, aumentando el riesgo de aparición de cepas multirresistentes y complejizando el desarrollo de vacunas eficaces. En este contexto, la vigilancia genómica se ha convertido en un componente fundamental de las estrategias de prevención del VIH. Con el objetivo de caracterizar la dinámica de la epidemia del VIH-1 a nivel molecular, se analizaron 1270 secuencias virales correspondientes a un fragmento de la región *pol* del genoma de VIH-1, obtenidas entre 2007 y 2021. Los resultados indican que, al menos 17 linajes de VIH-1 circularon en el país durante ese periodo de tiempo, siendo el subtipo B el de mayor prevalencia (39,2%), aunque se constata una disminución progresiva de este subtipo a lo largo del periodo estudiado. En cambio, los recombinantes BF mostraron un aumento de su prevalencia entre 2007 y 2021. Se identificó un posible nuevo linaje recombinante BF1, al que se denominó "BF1.x". Este clado constituye el 8,3% de las secuencias analizadas, y las cepas que lo componen presentan una amplia diseminación geográfica y temporal. El resto de los linajes caracterizados (C, A1, F1, 01_AE, 12_BF, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 28/29_BF1, 31_BC, 38_BF1, 41_CD, 46_BF1 y 60_BC) comprenden, en conjunto, el 52,5% de las secuencias analizadas. El análisis conjunto de secuencias genéticas virales y datos epidemiológicos, permitió el establecimiento de relaciones entre los linajes de VIH-1 caracterizados con variables clínicas y demográficas. Este enfoque integral enriquece la comprensión de la dinámica epidemiológica viral y proporciona valiosa información que podría contribuir de manera significativa a la optimización de la vigilancia sanitaria del VIH en nuestro país.

Palabras clave: VIH, vigilancia genómica, Uruguay

1. Introducción

1.1. Descubrimiento del VIH

Entre octubre de 1980 y mayo de 1981, se reportaron al Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC, por sus siglas en inglés) cinco casos de neumonía provenientes de distintos hospitales de Los Ángeles. El patrón clínico que mostraban todos ellos, varones homosexuales jóvenes con otras infecciones como candidiasis y/o citomegalovirus, llevó a los médicos a especular acerca de una inmunodeficiencia relacionada con las células T. Debido a que esta nueva enfermedad parecía afectar particularmente a varones homosexuales, la denominaron *Gay-Related Immune Defense Disorder* (GRIDD, por sus siglas en inglés). Con el paso del tiempo, surgieron más casos en otras regiones de Estados Unidos y en Europa y las características clínicas y epidemiológicas comenzaron a conocerse mejor. La enfermedad no solo afectaba a hombres homosexuales, sino también a hombres heterosexuales, mujeres, pacientes que habían recibido transfusiones sanguíneas, usuarios de drogas intravenosas y recién nacidos. Asimismo, se descubrió que la transmisión no se limitaba únicamente a la vía sexual, sino que podía también ocurrir por vía sanguínea y/o perinatal (transmisión vertical). Como resultado, se le denominó Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Carballal & Oubiña, 2001).

Los primeros trabajos de investigación acerca del agente causal del SIDA fueron realizados en 1983 por el equipo de Montagnier del Instituto Pasteur de Francia, quienes aislaron por primera vez el virus. Por sus características similares al ya conocido Virus Linfotrópico T Humano, lo denominaron Virus Asociado a la Linfadenopatía (Barre-Sinoussi et al., 1983). En 1986, el *Comité Internacional de Taxonomía de Virus* lo designó como Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y fue clasificado dentro de la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus* (Coffin et al., 2021). Más de cuatro décadas después de la descripción de los primeros casos de SIDA, el VIH sigue siendo uno de los problemas sanitarios más graves que haya enfrentado la humanidad desde el siglo XX.

1.2. Estado actual de la pandemia del VIH

Hasta 2021, se habían registrado en el mundo al menos 80 millones de casos de VIH y aproximadamente 40 millones de defunciones relacionadas al SIDA. Históricamente, la región más gravemente afectada ha sido África Subsahariana. Específicamente, en la región centro-sur africana reside el 54,1% de las personas viviendo con VIH del mundo

[18,9 - 23,0 millones], siendo Sudáfrica y Mozambique los países con mayor cantidad de personas seropositivas. En términos de impacto, le siguen Asia y el Pacífico, con un 15,7% [4,9 - 7,2 millones], donde sobresale la India como el país con la mayor cantidad de personas viviendo con VIH. África Central y Occidental comprenden el 13,1% [4,5 - 5,6 millones], destacándose la República Democrática del Congo (RDC) y Camerún como los países más afectados. América del Norte y Europa Central/Occidental representan conjuntamente el 6,1% [1,9 - 2,6 millones], con Estados Unidos, Francia e Italia registrando la mayor cantidad de personas seropositivas. Respecto a América Latina y el Caribe, se estima un 5,8% [1,7 - 3,1 millones] de las personas viviendo con VIH del mundo, siendo Brasil, México, Colombia y Argentina los países más afectados. Por último, Europa del Este y Asia Central representan un 4,7% [1,7 - 2,1 millones], mientras que en la región del Norte de África y Medio Oriente se ha documentado el 0,5% [150.000 - 210.000] de todos los casos de VIH (Figura 1) (ONUSIDA, 2021. <http://aidsinfo.unaids.org/>).

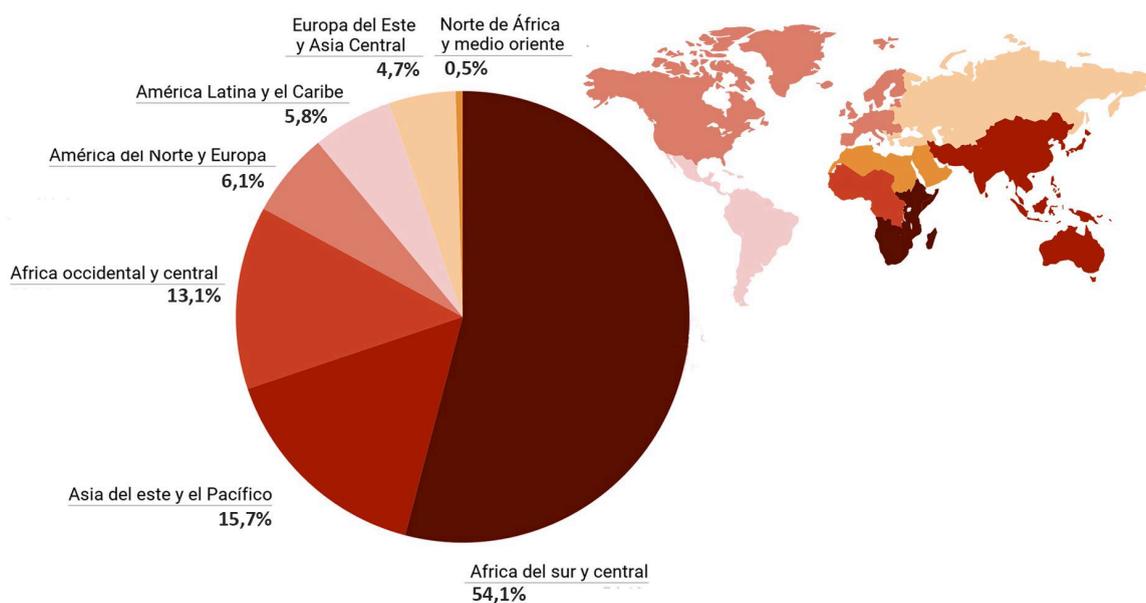


Figura 1. Distribución de las personas viviendo con VIH en las distintas regiones del mundo.

Aunque a nivel mundial los datos epidemiológicos muestran una disminución de nuevos casos de VIH, son muy pocos los países que, en los últimos años, han logrado bajar la incidencia de este virus. Factores como la desigualdad, el estigma y la discriminación hacia el VIH y/o el SIDA, dificultan su diagnóstico, así como también la vigilancia y el control de esta pandemia (Conferencia Internacional sobre el SIDA - ONU, 2016).

1.2.1. Epidemia de VIH/SIDA en Uruguay

El Ministerio de Salud Pública (MSP) estima que, actualmente, en Uruguay existen alrededor de 15.000 personas viviendo con VIH, es decir aproximadamente 0,6% del total de casos de América Latina y el Caribe en conjunto. En nuestro país, se registran en promedio 900 nuevos casos de VIH por año. Las tasas de nuevos diagnósticos en todas las franjas etarias son considerablemente más altas en el sexo masculino, con una relación de 2,3 hombres por cada mujer. Las personas de entre 25 y 44 años son el grupo etario con mayor tasa de incidencia. A su vez, la vía sexual es la principal forma de transmisión. En efecto, gracias al uso de la terapia antirretroviral (TARV) y a políticas efectivas de Salud Pública, durante el último quinquenio, la tasa de transmisión vertical ha sido inferior al 2,0% (Situación Epidemiológica de VIH/SIDA en Uruguay, 2022).

1.3. Estructura y genoma del VIH

La partícula viral madura del VIH presenta forma esférica con un diámetro de 80 a 120 nm. Está envuelta por una bicapa lipídica que se forma durante el proceso de gemación de la célula hospedera. En su superficie pueden observarse espículas formadas por glicoproteínas virales gp120, que intervienen en el reconocimiento del receptor celular, y por glicoproteínas transmembrana gp41, encargadas de la fusión de membranas (Knipe & Howley, 2013). Por debajo de la envoltura se encuentra una cápside externa formada por la proteína p17 y, hacia el interior, una cápside interna denominada *core* que presenta una estructura de cono truncado y está compuesta por la proteína p24. Esta estructura está involucrada en el empaquetamiento del genoma viral. En su interior, se encuentran dos hebras de ARN monocatenario de sentido positivo que son idénticas y no complementarias de aproximadamente 9,75 kb. Además, presenta proteínas asociadas a funciones reguladoras y tres enzimas que intervienen en el ciclo replicativo del virus: la retrotranscriptasa (RT), la integrasa (IN) y la proteasa (PR) (Figura 2) (Carballal & Oubiña, 2001; Rosas et al., 2013).

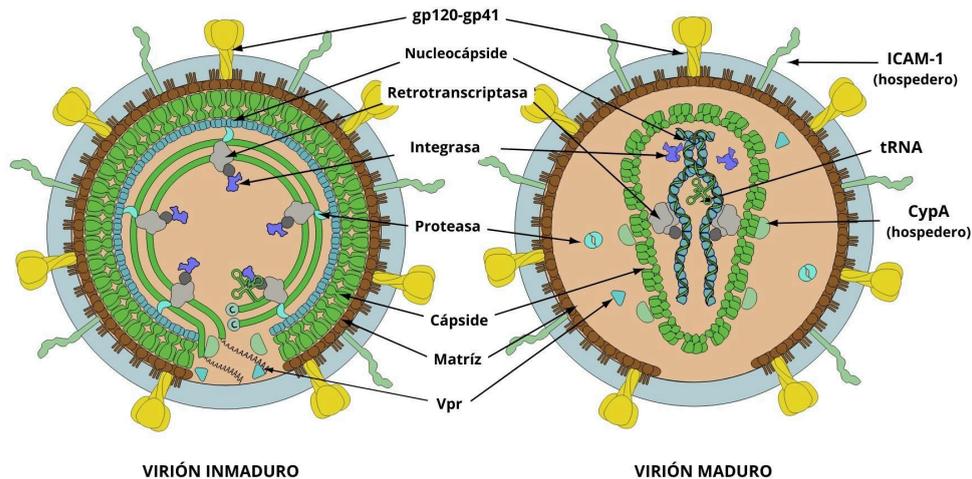


Figura 2. Estructura del virión de VIH. (Extraído y modificado de ViralZone, 2022).

El genoma del virus está compuesto por tres regiones que codifican proteínas estructurales y enzimas necesarias para la infección viral productiva (*gag*, *pol* y *env*). La región *gag* codifica proteínas de la cápside (ej: p17 y p24), la región *env* codifica las proteínas de la envoltura viral (gp120 y gp41), mientras que la región *pol* codifica para la retrotranscriptasa, la endonucleasa y proteasas virales. Adicionalmente, el virus codifica proteínas reguladoras tales como Tat (proteína transactivadora), Rev (regulador del empalme de ARN), Nef (factor regulador negativo), Vif (factor de infectividad viral), Vpr (proteína viral reguladora) y Vpu (proteína viral única) (Figura 3). En estado de provirus, el genoma está flanqueado a cada lado por secuencias largas repetidas (LTR, por sus siglas en inglés) que permiten la integración del genoma viral al de la célula hospedera y pueden activar la transcripción viral. En virtud de esta compleja regulación, el VIH puede establecer latencia a nivel celular o responder a varias señales y sintetizar altos niveles de proteínas virales para completar su ciclo de replicación (Knipe & Howley, 2013; Foley et al., 2016).

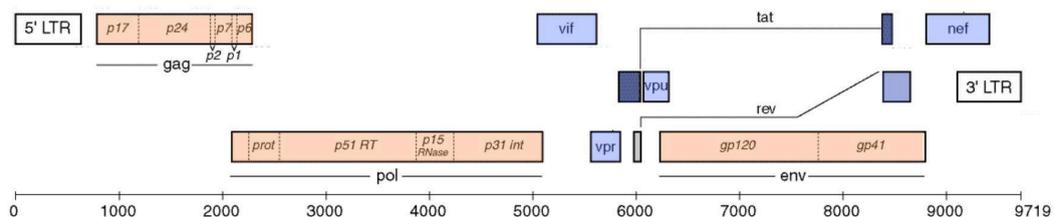
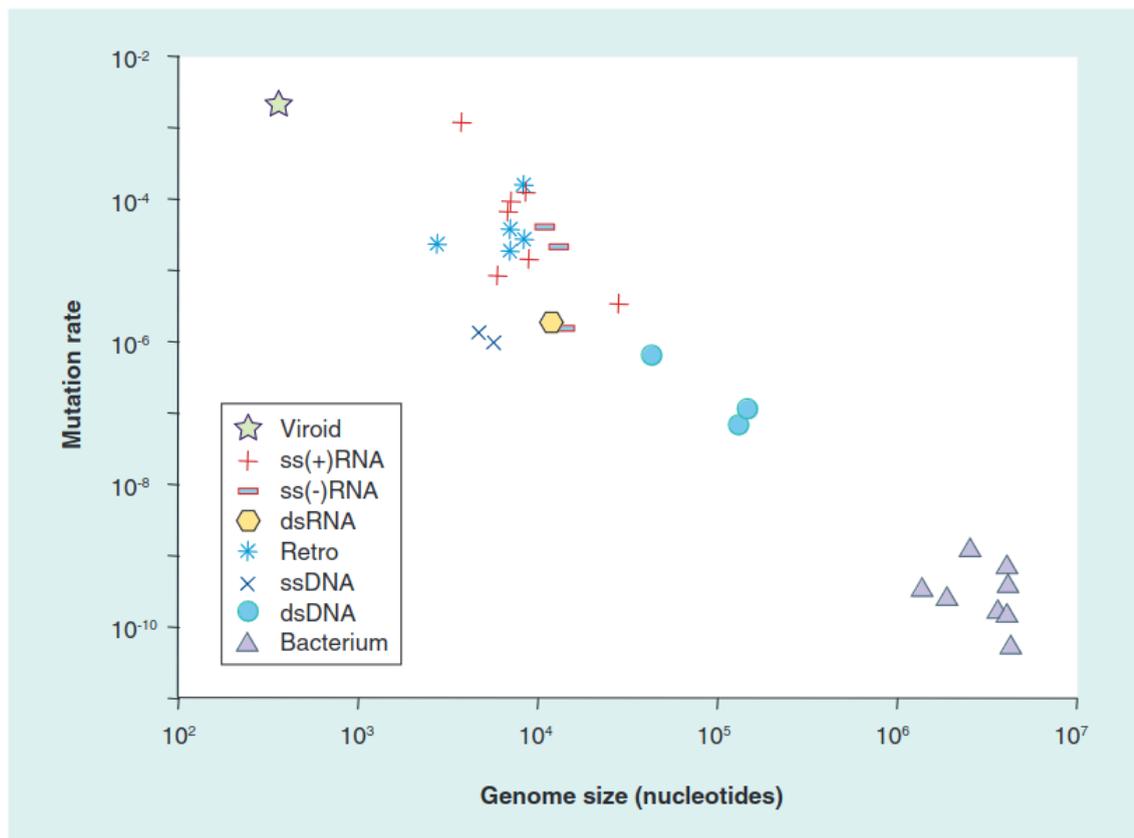


Figura 3. Mapa del genoma viral de VIH. En naranja: regiones codificantes para proteínas estructurales y enzimas. En azul: regiones que codifican proteínas reguladoras. (Extraído y Modificado de Los Alamos HIV database (<https://www.hiv.lanl.gov>)).

1.4. Mecanismos generadores de diversidad

Una de las principales causas del éxito de este virus es su variabilidad genética. Varios mecanismos generadores de diversidad hacen que el VIH sea una de las entidades de evolución más rápida estudiadas hasta el momento. Uno de ellos es su alta tasa de mutación debido a la baja fidelidad de su RT durante el proceso de replicación (Ramos et al., 2008). Los retrovirus, así como otros virus ARN, presentan tasas de mutación elevadas debido a la falta de actividad correctora de errores de sus polimerasas virales (Figura 4). Particularmente, el VIH presenta una tasa de mutación de aproximadamente $3,4 \times 10^{-5}$ mutaciones/sitio/ciclo de replicación. Dado que su genoma tiene una longitud de 9,75 kb y que se producen aproximadamente 10^{10} viriones por día, podrían obtenerse millones de viriones con mutaciones (variantes) en una persona infectada en tan solo un día (Morrondo et al., 2005; Taylor et al., 2008).



Otro mecanismo que contribuye significativamente a la amplia diversidad genética del VIH, es la recombinación. En este proceso se generan cepas recombinantes ya sea a partir de una infección secuencial (reinfeción) o por una infección simultánea (coinfeción) de dos linajes virales distintos en una misma célula. Una vez producida la reinfeción o coinfección, se obtendrá una progenie viral que habrá encapsidado tanto dos hebras de ARN correspondientes al mismo linaje (homodímeros) como viriones donde cada hebra de ARN proviene de un linaje distinto (heterodímeros). Estos últimos, tendrán la capacidad de infectar nuevas células y darán origen a una progenie de homodímeros recombinantes como producto de los saltos alternativos que realiza la RT entre ambos genomas encapsidados (Figura 5). El mecanismo de recombinación genética media la reparación de genomas retrovirales defectivos, incrementa la diversidad viral y acelera la propagación de mutaciones ventajosas (Carballal & Oubiña, 2001; Onafuwa-Nuga & Telesnitsky, 2009).

Las altas tasas de mutación, la recombinación y los tiempos de replicación cortos, llevan a la producción de poblaciones altamente diversas. A ese conjunto de variantes virales dentro de un mismo hospedero se los denomina *cuasiespecie viral*, genomas mutantes y recombinantes cercanamente relacionados pero no idénticos (Domingo et al., 1998; Schneider & Roossinck, 2001; Gartner et al., 2020). Esta alta diversidad le confiere al VIH la habilidad de adaptarse a la respuesta inmune del hospedero, adquiriendo resistencia a la TARV (Gräf et al., 2021).

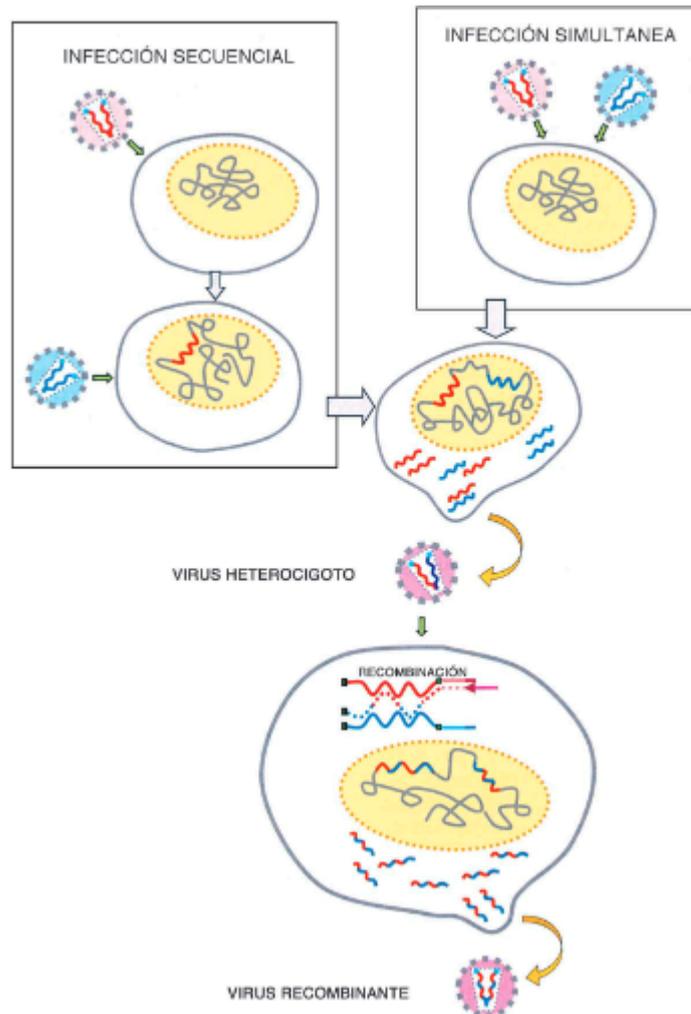


Figura 5. Generación de retrovirus recombinantes (Morrondo et al., 2005).

1.5. Clasificación

La gran variabilidad que presenta este virus permite clasificarlo en dos tipos, VIH-1 y VIH-2.

El VIH-1 se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial. Se subdivide en cuatro grupos: M, N, O y P, cada uno de ellos originado a partir de eventos independientes de transmisión interespecie entre primates no humanos y humanos (zoonosis). Análisis filogenéticos indican que los grupos M y N surgieron a partir de una cepa del *Virus de la Inmunodeficiencia Simia* (VIS) identificada en chimpancés (*Pan troglodytes troglodytes*) que habitan el sureste y centro de Camerún, denominada *VIScpz-Ptt* (Gao et al., 1996). Por otra parte, los grupos O y P resultaron ser más cercanos a la cepa de *VISgor*, cuyos reservorios son los gorilas (*Gorilla gorilla*), principalmente de las regiones centro y sur de Camerún (Plantier et al., 2009; D'arc et al., 2015). Mientras que los grupos N, O y P se restringieron al

continente africano, el grupo M fue capaz de propagarse con éxito en la población humana, siendo el responsable de la actual pandemia y de más del 99% de todas las infecciones de VIH del mundo. Hasta el momento, el grupo M se subdivide en diez subtipos (A–D, F–H y J–L). A su vez, dentro de los subtipos A y F se caracterizan 7 y 2 sub-subtipos (A1–A4, A6–A8, F1–F2), respectivamente (Figura 6) (Knipe & Howley, 2013; Gartner et al., 2020). La divergencia genética dentro de un subtipo es de 15 a 20%, mientras que entre subtipos suele ser de 25 a 35% dependiendo del subtipo y la región del genoma analizada (Taylor et al., 2008).

Las formas recombinantes representan nuevos linajes con genoma en mosaico que surgen a partir de la recombinación de dos o más linajes parentales previamente identificados. Cuando se identifica un recombinante con el mismo patrón en al menos tres personas epidemiológicamente no vinculadas entre sí, se le denomina Formas Recombinantes Circulantes (FRCs o CRFs, por sus siglas en inglés). A medida que se van descubriendo nuevas FRCs, se les asigna un número consecutivo seguido de los linajes parentales que la conforman (Ej. 02_AG, 12_BF, 31_BC) (Seitz, 2016). La nomenclatura puede encontrarse en la página web del banco de datos mundial Los Alamos: <https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/crfdb/crfs.com>, donde se encuentran listadas todas las FRCs identificadas hasta la fecha. Por otro lado, los recombinantes entre subtipos o FRCs que se han encontrado en menos de tres individuos o en grupos de personas infectadas relacionadas epidemiológicamente, se denominan formas recombinantes únicas (FRUs o URFs, por sus siglas en inglés). Finalmente, cuando se trata de un recombinante con más de dos linajes parentales, se lo denomina “cpx” (*complex*, en inglés) (Taylor et al., 2008; Hemelaar et al., 2021). Hasta el momento, se han identificado 140 FRCs.

El VIH-2 fue descubierto en 1985 y se considera endémico de la región de África Occidental. Hasta el momento, se han identificado nueve grupos de este tipo (A–I), cada uno asociado a la transmisión de una cepa de VIS (*VISsmm*) proveniente de los monos mangabey (*Cercocebus atys*) a humanos (Figura 6) (Reeves & Doms, 2002; Ayoub et al., 2013). El grupo A es el más frecuente, seguido por el grupo B. Debido a su naturaleza esporádica, los grupos C a H representan transmisiones aisladas, siendo común que quienes portan estos grupos informan haber tenido contacto con monos mangabey (Visseaux et al., 2019; de Mendoza et al., 2021).

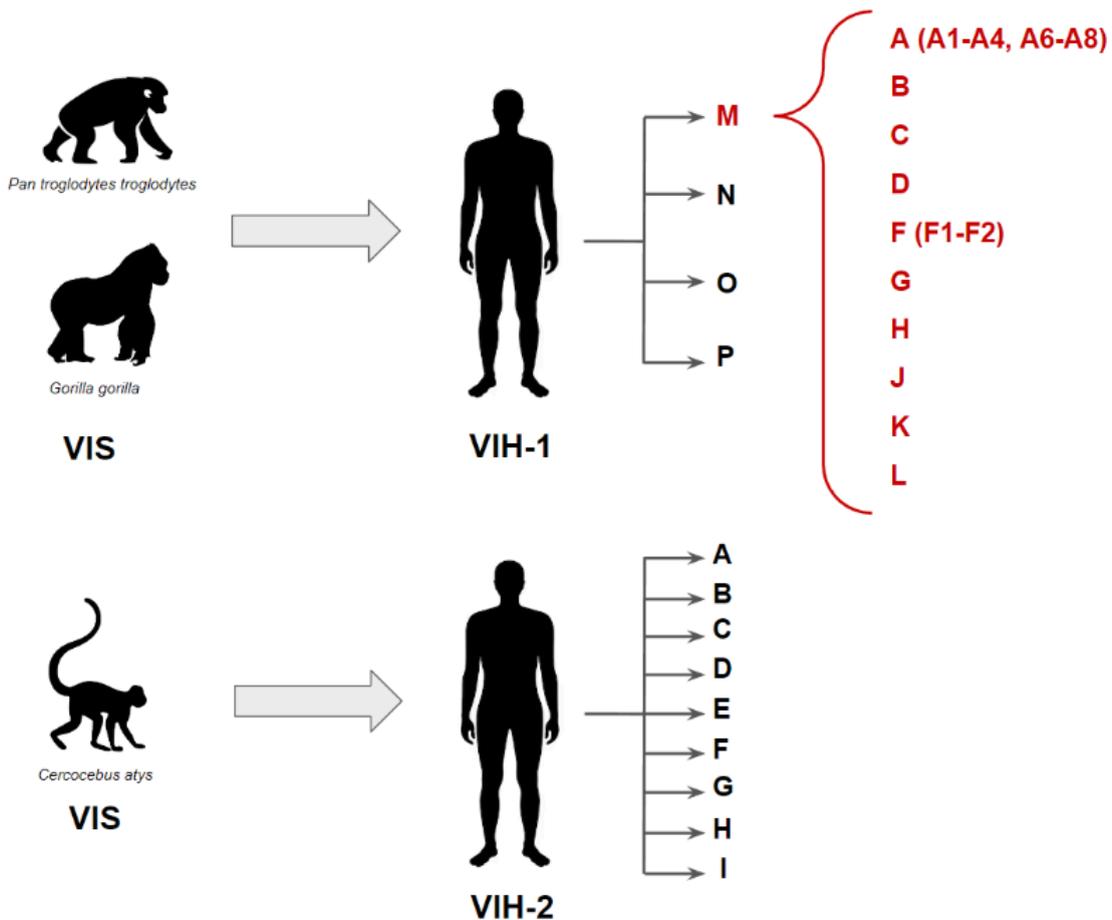


Figura 6. Origen y clasificación del VIH. Los distintos grupos de VIH-1 y VIH-2 son el resultado de al menos 13 eventos de transmisión interespecie de cepas de VIS de primates no humanos a humanos (marcados con flechas). Se resalta en rojo el grupo M de VIH-1 y los distintos subtipos y sub-subtipos que lo componen.

1.6. Distribución geográfica de los subtipos y recombinantes del VIH-1

La distribución geográfica de los subtipos y formas recombinantes del VIH-1 identificadas hasta el momento varía notablemente alrededor del mundo (Figura 7). El subtipo C es el predominante y responsable de casi la mitad de las infecciones en el mundo (48%). Este subtipo presenta una marcada prevalencia en países del sur de África, India y Etiopía. El subtipo A ocupa el segundo lugar en términos de prevalencia (12%) y predomina en los países de África oriental, Europa oriental y Asia. Por otro lado, el subtipo B es responsable del 11% de las infecciones y es prevalente en América, Europa central y occidental, Medio Oriente, Australia y el norte africano. A su vez, los subtipos G (5%) y D (2%), son prevalentes principalmente en África central y occidental. La suma de los subtipos F, H, J, K

y L representa menos del 1% de las infecciones y se concentran principalmente en el continente africano. Por último, aproximadamente el 4% de las infecciones son causadas por linajes recombinantes (Kijak & McCutchan, 2005; Hemelaar et al., 2011; Yamaguchi et al., 2019).

A nivel mundial, las FRCs de mayor prevalencia son la 02_AG y la 01_AE, que predominan en África Central y Asia, respectivamente (Hemelaar et al., 2021). En el cono sur de América Latina, debido a la co-circulación principalmente de los subtipos B y C, y del sub-subtipo F1, han surgido numerosas FRCs (Abecasis & Vandamme, 2015). Entre las de mayor relevancia epidemiológica se destacan la 31_BC, la 28_BF1 y la 29_BF1, originadas en Brasil, así como la 12_BF descrita en Argentina (Bello et al., 2010; Gräf et al., 2021). Además, en esta región se han descrito otras FRCs, tales como la 39_BF1 y la 40_BF1 en Brasil, la 38_BF1 en Uruguay, la 44_BF1 en Chile y la 17_BF1 en Argentina, entre otras (Carr et al., 2001; De Sá Filho et al., 2006; Santos et al., 2006; Ríos et al., 2005; Guimarães et al., 2008; Ruchansky et al., 2009; Aulicino et al., 2012).

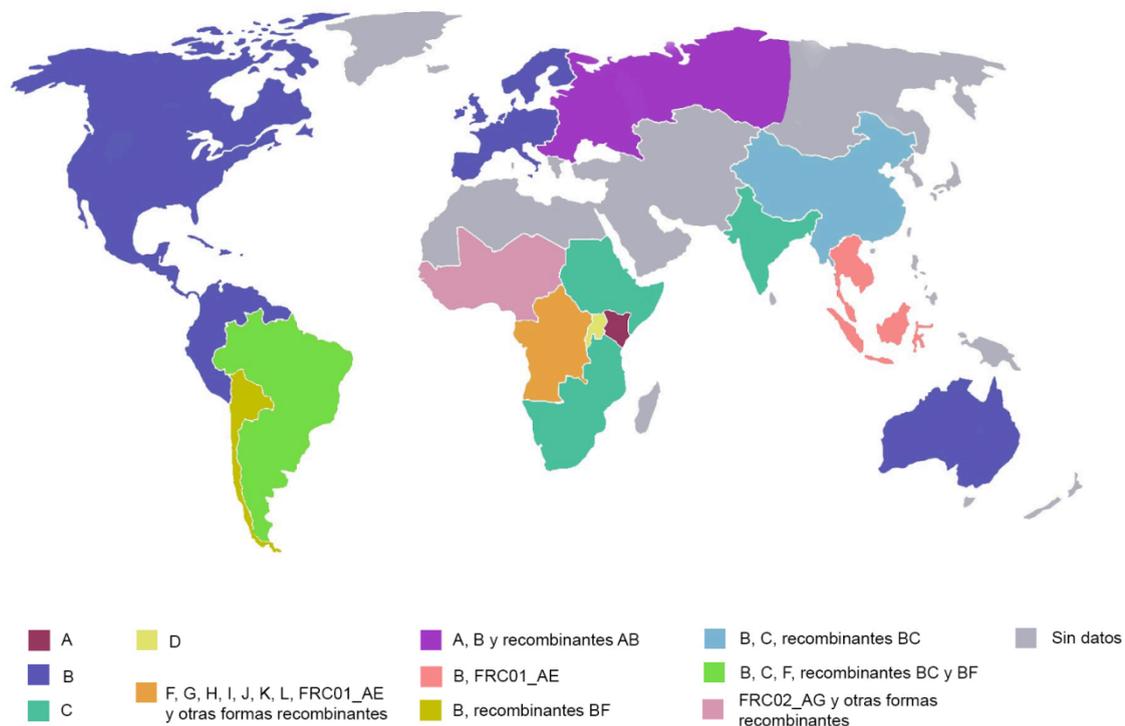


Figura 7. Distribución de los distintos subtipos y FRCs de VIH-1 prevalentes en el mundo (Abecasis & Vadamme, 2015; Bbosa et al., 2019; Hemelaar et al., 2019).

En Uruguay, según un informe del MSP publicado en el año 2011 basado en el análisis de secuencias provenientes del genotipado de resistencia obtenidas entre 2007 y 2010, predominaban las formas recombinantes BF1 (50,9%), entre las que se destacaban la 12_BF y la 38_BF1. Según este mismo informe, le seguían en prevalencia los subtipos B (45,6%), F (1,16%), C (1,16%), D (0,58%) y el sub-subtipo A1 (0,58%) (Informe de la situación nacional de VIH/SIDA, 2011). Debido a los movimientos de las poblaciones humanas (viajes, migraciones, misiones de paz, entre otros) y a la evolución del virus, los linajes del VIH-1 prevalentes en cada región o país pueden cambiar con el tiempo. No obstante, no se han realizado análisis centrados en la caracterización molecular del virus en Uruguay. El monitoreo de la diversidad genética de este virus es de suma importancia, ya que permite la identificación de nuevas cepas, contribuye al desarrollo de pruebas de diagnóstico y tratamientos, es útil para identificar la resistencia a antirretrovirales y las poblaciones y prácticas de riesgo que contribuyen a la transmisión viral.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Caracterizar la dinámica de la epidemia del VIH-1 en Uruguay a nivel molecular.

2.2. Objetivos Específicos

1. Identificar los linajes circulantes del VIH-1 en Uruguay a partir de secuencias genéticas virales.
2. Describir las tendencias temporales en la prevalencia de los linajes del VIH-1 en Uruguay.
3. Analizar la relación entre los diferentes linajes del VIH-1 y el género, la vía de transmisión y la región geográfica de adquisición del VIH.

3. Materiales y métodos

3.1. Aspectos éticos

Este trabajo forma parte del proyecto “*Vigilancia genómica del Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) en Uruguay*”, cuya responsable es la Dra. Daiana Mir. Este proyecto fue financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y aprobado por el Comité de Ética del CENUR Litoral Norte (Exp. N° 311170-500476-21). Los datos se recopilaron en 2022 y se analizaron entre 2022 y 2023. Todos los métodos se realizaron de acuerdo con las pautas y regulaciones pertinentes.

3.2. Secuencias nucleotídicas y Base de datos

Se trata de un estudio observacional retrospectivo que emplea un muestreo de conveniencia de individuos a los que se les ha indicado el test de resistencia a los antirretrovirales (ARVs) del VIH, realizado por el Departamento de Laboratorios de Salud Pública, perteneciente al Ministerio de Salud Pública de Uruguay (DLSP-MSP). En nuestro país, el test de resistencia está indicado para niños infectados perinatalmente, mujeres embarazadas, individuos con falla virológica, seroconversión reciente (menor a un año) y primoinfección sintomática (Flieller & Cabrera, 2019).

Para llevar a cabo los análisis correspondientes, se utilizaron secuencias genéticas virales obtenidas a partir de los estudios de resistencia previamente mencionados. Estas secuencias pertenecen a un fragmento de la región *pol* que comprende parte de los genes *pr* y *rt*. Fueron obtenidas en los laboratorios del DLSP mediante un proceso de extracción de ARN realizada por método comercial automatizado por sílica magnética o en columnas (según disponibilidad en DLSP), seguida de una amplificación por RT-PCR/Nested. La secuenciación fue realizada en ambas direcciones por el método Sanger utilizando cebadores y protocolos previamente descritos que permiten la obtención de un fragmento de aproximadamente 1100 pares de bases (pb) que codifica los 99 aminoácidos de la PR y los primeros 246 aminoácidos de la RT (Aleman et al., 2015). El DLSP proporcionó un total de 1622 secuencias del período comprendido entre 2007 y mediados de 2022.

A su vez, estas secuencias fueron vinculadas con los formularios correspondientes a cada paciente, de los que se extrajeron 13 variables: Año_test, Institución, género,

Fecha_nacimiento, Año_Diagnóstico, Lugar_adquisición, Vía_transmisión, Infecciones_opportunistas, Año_inicio_TARV, Num_composición_planes_TARV, Carga_viral, CD4, y Adherencia. Estas variables junto con las secuencias, fueron utilizadas para crear la base de datos GENOUY-VIH.

3.3. Subtipado de secuencias

La Figura 8 representa, de manera general, el flujo de análisis aplicado para el subtipado de secuencias.

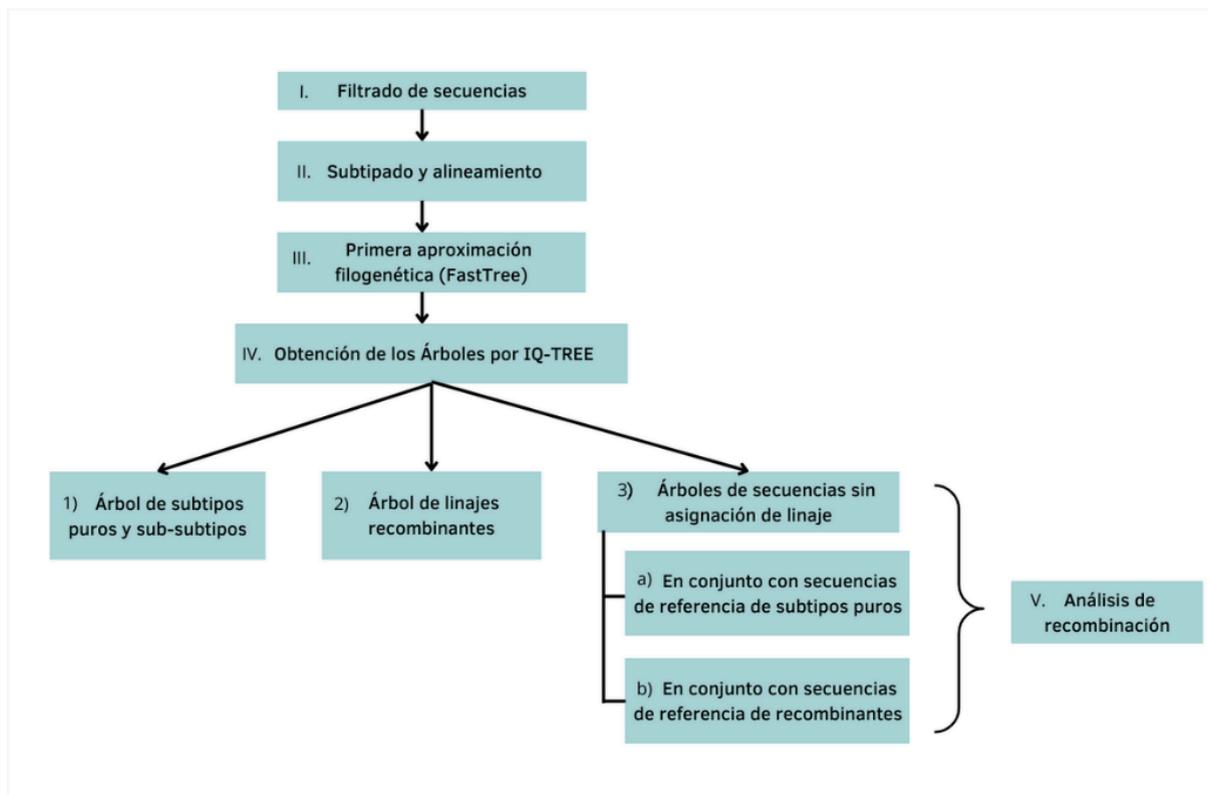


Figura 8. Flujo de análisis para el subtipado de secuencias.

3.3.I. Filtrado de secuencias

Es importante destacar que, debido a varios factores, no todas las secuencias proporcionadas por el DLSP ($n = 1622$) fueron incluidas en los análisis. En primer lugar, para evitar redundancias, se descartaron las múltiples secuencias de algunos pacientes que experimentaron falla virológica en más de una ocasión. Específicamente, se consideró únicamente la secuencia más antigua de cada paciente. Adicionalmente, se retiraron dos secuencias debido a que no abarcaban la región de estudio. En tercer lugar, se excluyeron las secuencias de aquellos pacientes menores a 14 años, con el fin de evitar sesgos relacionados con la transmisión vertical. En total, se utilizaron 1288 secuencias de la base

de datos GENOUY-VIH. Además, se incorporaron 20 secuencias generadas en trabajos previos para Uruguay, obtenidas de la base de datos Los Alamos (www.hiv.lanl.gov). Estas secuencias eran consistentes con la región de análisis y no correspondían a pacientes con transmisión vertical (Genbank: JN566138, JN235965, JN235960, JN235953, JN235958, JN235952, JN235956, JN235964, JN235959, JN235963, JN235962, AY781128, AY781127, AY781126, AY781129, AF385934, AF385935, JN235957, AY563169, AY037272). Finalmente, se realizó un análisis de las secuencias utilizando la herramienta RIP (Los Alamos Recombinant Identification Program, disponible en <http://hivweb.lanl.gov/RIP/RIPsubmit.html>) para identificar codones de parada y secuencias hipermutadas. A las secuencias que pasaron el filtrado, se les asignó un patrón específico en los encabezados de su archivo FASTA, que incluye el número de test o número de acceso de GenBank, el género del paciente, el año del test o año de aislamiento de la muestra, la vía de transmisión y el lugar de adquisición.

3.3.II. Subtipado y alineamiento

Las secuencias que pasaron el proceso de filtrado fueron analizadas mediante tres herramientas de subtipado online: Genome Detective (REGA HIV Subtyping Tool, Vilsker et al., 2019), RIP (NCBI HIV Subtyping tool, Siepel et al., 1995) y COMET (COntext-based Modeling for Expeditious Typing, Struck et al., 2014). Se estableció el linaje correspondiente únicamente a aquellas secuencias en las que las tres herramientas de subtipado coincidieron en la asignación del subtipo o FRC.

Para realizar el alineamiento, visualizarlo y editarlo se utilizaron las herramientas MAFFT (alineamientos) (Kato et al., 2019) y AliView (visualización y edición de secuencias y alineamientos múltiples) (Larrson, 2014). Cabe destacar que, durante el proceso de alineamiento se eliminaron los sitios de resistencia a fármacos, ya que la región *pol* es el principal blanco de la TARV. Por tanto, la presión selectiva ejercida por los fármacos, podría conducir a eventos de convergencia hacia caracteres específicos, que no son resultado de los eventos de la evolución natural del virus, y que podrían alterar los resultados sobre las relaciones evolutivas entre las cepas analizadas.

3.3.III. Primera aproximación filogenética (FastTree)

Como primer abordaje, se infirió un árbol filogenético por máxima verosimilitud mediante el programa FastTree (disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, Price et al., 2009), empleando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR-CAT (modelo por defecto de este programa). Se analizaron un total de 1730 secuencias. De estas, 1288 pertenecían a la

base de datos GENOUY-VIH, 20 fueron extraídas del banco de datos Los Alamos (de Uruguay) y 422 eran secuencias de referencia de todos los subtipos puros y FRCs del grupo M de HIV-1 presentes en la base de datos Los Álamos.

3.3.IV. Obtención de los árboles por IQ-TREE

A partir del primer árbol filogenético inferido mediante FastTree, se realizó un ciclo de inferencias por máxima verosimilitud utilizando el IQ-TREE (Nguyen et al., 2015).

Teniendo en cuenta que en la región analizada algunas FRCs presentan segmentos de secuencia que pertenecen a subtipos puros y que, por ende, se ubicaron en el primer árbol filogenético dentro de agrupamientos de subtipos puros, se llevaron a cabo cuatro inferencias filogenéticas con el objetivo de mejorar la resolución de las relaciones evolutivas obtenidas. Las cuatro inferencias filogenéticas comprenden: 1) Árbol de secuencias de subtipos y sub-subtipos puros, 2) Árbol de secuencias asignadas a linajes recombinantes ya descritos y 3) Árboles de secuencias sin asignación de linaje.

3.3.IV.1. Árbol de secuencias de subtipos puros y sub-subtipos

Alineamiento de 619 secuencias, 556 secuencias de la base de datos GENOUY-VIH, 7 del banco de datos Los Alamos (de Uruguay) y 56 secuencias de referencia pertenecientes a los subtipos puros y sub-subtipos del grupo M (A-D, F-H, J, K y L) extraídas también del banco de datos Los Alamos. El alineamiento contiene todas las secuencias que en la primera inferencia agruparon dentro de los linajes B, C y F1, y una secuencia que se encontraba dentro del clado del subtipo A pero sin identificación de sub-subtipo.

3.3.IV.2. Árbol de secuencias asignadas a linajes recombinantes ya descritos

Alineamiento de 1077 secuencias, 710 pertenecientes a la base de datos GENOUY-VIH, 11 del banco de datos Los Alamos (de Uruguay) y 356 secuencias de referencia de todas las FRCs descritas en la base de datos Los Alamos. El alineamiento contiene todas las secuencias que previamente agruparon dentro de clados pertenecientes a las siguientes formas recombinantes: 01_AE, 12_BF, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 28/29_BF1, 31_BC, 38_BF1, 41_CD, 46_BF1 y 60_BC.

3.3.IV.3. Árboles de secuencias sin asignación de linaje

Estos análisis abarcan todas aquellas secuencias que no agruparon filogenéticamente con ningún subtipo, sub-subtipo o FRC identificado en las inferencias anteriores.

a) con secuencias de referencia de subtipos puros

Alineamiento de 166 secuencias, 109 pertenecientes a GENOUY-VIH, 2 extraídas del banco de datos Los Alamos (de Uruguay) y 55 secuencias de referencia de subtipos puros y sub-subtipos extraídas del banco de datos Los Alamos.

b) con secuencias de referencia de recombinantes

Alineamiento de 467 secuencias, 109 de la base de datos GENOUY-VIH, 2 uruguayas extraídas del banco de datos Los Alamos (de Uruguay) y 356 secuencias de referencia de linajes recombinantes extraídas del banco de datos Los Alamos.

3.3.V. Análisis de recombinación

A las secuencias que no agruparon con ningún subtipo o FRC conocida se les realizó un análisis de recombinación. Para esto se utilizó, en primer lugar, la herramienta Bootscan del paquete SimPlot (Lole et al., 1999), con los siguientes parámetros: ventana de 300 pb y *step size* de 10 pb. Se utilizaron como referencias secuencias de los subtipos puros B (HXB2, Sequence ID: K03455), F1 y D. En segundo lugar, fueron analizadas a través de la herramienta online jpHMM-HIV (disponible en <http://jphmm.gobics.de/>, Zhang et al., 2006).

En base a estos análisis se estimaron los puntos de recombinación de cada secuencia y se calculó el promedio de la posición del punto de recombinación. Los puntos de recombinación fueron representados usando la herramienta Recombinant HIV-1 Drawing Tool, perteneciente a la base de datos Los Alamos (disponible en https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/DRAW_CRF/recom_mapper.html).

3.4. Cálculo de la frecuencia, distribución de los linajes y análisis estadísticos

Una vez finalizada la asignación de linajes, se calcularon las frecuencias de cada linaje mediante conteo manual, se determinaron los linajes de mayor prevalencia y se analizó la variación de la diversidad del VIH-1 a lo largo del tiempo en Uruguay. Para estos análisis, se utilizaron únicamente las 1270 secuencias pertenecientes a la base de datos GENOUY-VIH que abarcan el periodo 2007-2021. De esta manera fue posible analizar la dinámica de la epidemia en nuestro país en un periodo continuo de 15 años. Es importante destacar que las 18 secuencias pertenecientes el año 2022 no se incluyeron en los análisis debido a que no representan un muestreo completo de ese año, sino que abarcan un periodo de solo 4 meses. A su vez, con el objetivo de realizar comparaciones con los trabajos previamente publicados por el MSP para Uruguay, se realizó el cálculo de la frecuencia de los linajes en dos periodos temporales: de 2007 a 2010 y de 2011 a 2021.

Por otro lado, se llevaron a cabo análisis estadísticos para aquellos linajes con más de 40 secuencias caracterizadas, con el fin de investigar la posible relación entre estos linajes y variables como el género, la vía de transmisión y la región geográfica de adquisición del virus. Para ello, todas las variables relevadas fueron previamente categorizadas y codificadas. Específicamente, la variable "género" se dividió en 3 categorías: Masculino (1), Femenino (2) y Trans (3, sin discriminar el tipo de transgénero). Por su parte, la variable "vía de transmisión" fue categorizada en 6 grupos: Sexual/Bisexual (1), Heterosexual (HTX, 2), Hombre que tienen sexo con Hombres (HSH, 3), Usuarios de drogas intravenosas (UDIV, 4), Transfusiones (5) y Accidentes (6). Cabe mencionar que para los análisis realizados con esta variable, no se tuvieron en cuenta ni la categoría Sexual/Bisexual, ya que no discriminaba específicamente la vía de transmisión, ni las categorías transfusiones y accidentes por presentar un $n < 3$. Finalmente, la variable "Lugar de adquisición" fue categorizada y codificada tal y como se muestra en la Figura 9, mediante la definición de 5 regiones: Noreste, Oeste, Centro, Este y Zona Metropolitana (Figura 9).

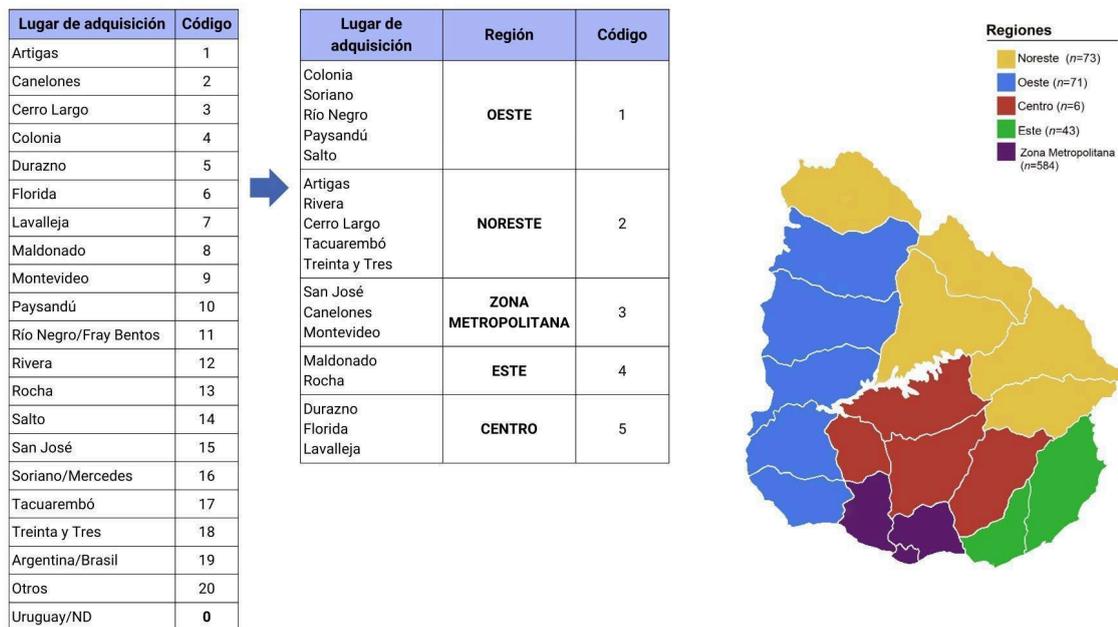


Figura 9. Categorización y codificación del lugar de adquisición del virus. En el mapa se distinguen las cinco regiones geográficas definidas: Noreste (Artigas, Cerro Largo, Rivera, Tacuarembó y Treinta y Tres); Oeste (Colonia, Río Negro, Salto, Soriano y Paysandú); Centro (Durazno, Flores, Florida y Lavalleja); Este (Maldonado y Rocha) y la Zona Metropolitana (Canelones, Montevideo y San José). ND: sin dato. Otros: Países que no poseen frontera con Uruguay.

Una vez categorizadas y codificadas las variables, el análisis de la relación entre los linajes y: el género (A), la vía de transmisión (B) y el lugar de adquisición (C), se realizaron de la siguiente manera:

A) Género: Mediante los tests de Fischer y de proporciones (pruebas Z) se estudió la posible asociación entre cada linaje y el género. En primer lugar, se analizó la cantidad de secuencias por género (y su proporción) de cada uno de los linaje *versus* la cantidad de secuencias por género de todos los linajes juntos (“linaje X vs Total”, datos no mostrados). Luego, cada linaje *versus* el resto de los linajes en conjunto (“linaje X vs Resto”) y, por último, cada linaje vs cada uno de los linajes restantes de manera individual (“linaje X vs linaje Y”). Estos análisis fueron realizados considerando tanto las tres categorías de “género” como teniendo en cuenta únicamente los géneros Masculino y Femenino. Para aquellos casos en los que el test de Fisher fue significativo, se realizaron análisis de riesgo (OR).

B) Vía de transmisión: La posible asociación entre cada linaje y la vía de transmisión fue analizada utilizando el mismo procedimiento que el descrito para la variable género (parte A).

C) Lugar de adquisición: La comparación de la presencia de los linajes más frecuentes entre las distintas regiones definidas se realizó mediante los tests de Fischer y de proporciones (pruebas Z).

Por último, para los linajes prevalentes, se analizó si existía una correlación temporal. Para ello, se calculó la proporción de secuencias de cada linaje por año y por trienio, se graficaron mediante excel y se analizaron mediante correlación de Pearson.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software IBM SPSS Statistic 22 (disponible en: <https://www.ibm.com/support/pages/downloading-ibm-spss-statistics-22>), utilizando un intervalo de confianza del 95%.

4. Resultados

4.1. Filtrado, Subtipado y alineamiento de secuencias

De las 1622 secuencias genéticas inicialmente proporcionadas por el DLSP, 1288 pasaron el proceso de filtrado.

Respecto a la asignación de subtipos o FRC realizada mediante las tres herramientas de subtipado online, se pudo asignar el linaje a 496 (37,9%) de las 1308 secuencias analizadas, la mayoría de ellas pertenecientes a los subtipos B y C, y a la FRC12_BF. Aunque en menor frecuencia, también se encontraron secuencias pertenecientes a los sub-subtipos A1 y F1, y a las FRCs 01_AE, 24_BG, 31_BC y 20_BG.

Por otro lado, la eliminación de los sitios de resistencia a ARVs, proporcionó como resultado un alineamiento con una longitud de 800 nt, que abarcó desde la posición 2358 hasta la 3251 en relación con el genoma de referencia HXB2 (Figura 10).



Figura 10. Mapa del genoma del VIH-1. Se resalta en violeta la región analizada en este trabajo y en gris los gaps pertenecientes a los sitios de resistencia a ARVs.

4.2. Análisis filogenético

4.2.1. Inferencia filogenética para asignación de linajes: primera aproximación

A partir de la primera inferencia filogenética realizada por máxima verosimilitud mediante el programa FastTree, fue posible caracterizar el linaje de VIH-1 de 682 secuencias de las 812 que no habían podido ser caracterizadas previamente mediante las herramientas de subtipado online. Por lo tanto, entre las herramientas de subtipado online y esta primera inferencia filogenética se pudo asignar el linaje del 90,1% de las 1308 secuencias estudiadas.

El análisis filogenético, sugiere la presencia de tres linajes puros circulantes en Uruguay: los subtipos B y C, y el sub-subtipo F1 (Figura 11). Por otra parte, se identificaron al menos 12

FRCs: 01_AE, 12_BF, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 28/29_BF1 (estos dos recombinantes no pueden diferenciarse debido a que en la región analizada ambos presentan el mismo patrón de recombinación), 31_BC, 38_BF1, 41_CD, 46_BF1 y 60_BC. Además, se observaron cuatro grupos monofiléticos que abarcaron 111 secuencias. Estos grupos comparten tres particularidades: están compuestos por más de tres secuencias cada uno, presentan un apoyo estadístico elevado ($SH-aLRT \geq 0,80$) y no agrupan junto con ninguna secuencia de referencia de subtipos o FRCs conocidos. Las 111 secuencias que conforman estos clados, junto con otras 18 secuencias que no agruparon dentro de ningún clado, fueron clasificadas como “sin linaje asignado”.

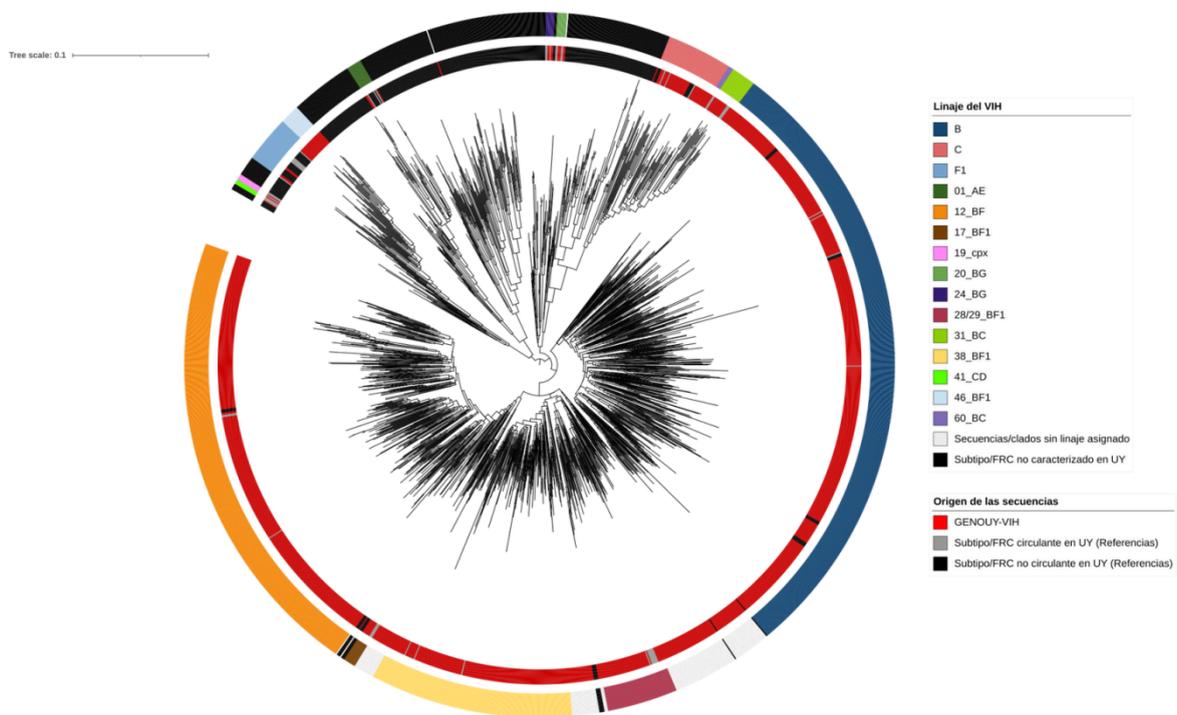


Figura 11. Inferencia filogenética por Máxima Verosimilitud mediante FastTree: Primera aproximación. Realizada en base a 1730 secuencias, 1288 provenientes de GENOUY-VIH, 20 del banco de datos Los Alamos y 422 de referencia de todos los subtipos puros y FRCs del grupo M del VIH-1 de la base de datos Los Alamos. El árbol se enraizó en el punto medio. Todos los agrupamientos de subtipos puros y FRCs presentan un apoyo de $SH-aLRT \geq 0,80$, con excepción del clado 28/29_BF1 ($SH-aLRT = 0,50$). Las longitudes de las ramas se representan en una escala de sustituciones de nucleótidos por sitio. El anillo interno muestra el origen de las secuencias: base de datos GENOUY-VIH (rojo) y Los Alamos (gris y negro). El anillo externo muestra los distintos linajes circulantes en Uruguay (leyenda). Lista de subtipos y FRCs de referencia utilizadas: A1-A4, A6-A8, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K, L, 01_AE, 02_AG, 03_A6B, 04_cpx, 05_DF, 06_cpx, 07_BC, 08_BC, 09_cpx, 10_CD, 11_cpx, 12_BF, 13_cpx, 14_BG, 15_01B, 16_A2D, 17_BF1, 18_cpx, 19_cpx, 20_BG, 21_A2D, 22_01A1, 23_BG, 24_BG, 25_cpx, 26_A5U, 27_cpx, 28_29BF1, 30_0206, 31_BC, 32_06A6, 33_01B, 34_01B, 35_A1D, 36_cpx, 37_cpx, 38_BF1, 39_BF1, 40_BF1, 41_CD, 42_BF1, 43_02G, 44_BF1, 45_cpx, 46_BF1, 47_BF1, 48_01B, 49_cpx, 50_A1D, 51_01B, 52_01B, 53_01B, 54_01B, 55_01B, 56_cpx, 57_BC, 58_01B, 59_01B, 60_BC, 61_BC, 62_BC, 63_02A6, 64_BC, 65_cpx, 66_BF1, 67_01B, 68_01B, 69_01B, 70_BF1, 71_BF1, 72_BF1, 73_BG, 74_01B, 75_BF1, 76_01B, 77_cpx, 78_cpx, 79_0107, 80_0107, 81_cpx, 82_cpx, 83_cpx, 84_A1D, 85_BC, 86_BC, 87_cpx, 88_BC, 89_BF1, 90_BF1, 92_C2U, 93_cpx, 94_cpx, 95_02B, 96_cpx, 97_01B, 98_06B, 99_BF1, 100_01C, 101_01B, 102_0107, 103_01B, 104_0107, 105_0108, 106_cpx, 107_01B, 108_BC, 109_0107, 110_BC, 111_01C, 112_01B, 113_0107, 114_0155, 115_01C, 116_0108, 117_0107, 118_BC.

4.2.2. Optimización de la inferencia filogenética

4.2.2.1. Árbol filogenético de secuencias puras

El árbol filogenético de secuencias puras se obtuvo utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+F+I+G4, el cual fue seleccionado mediante la aplicación ModelFinder (Lanfear et al., 2012) incorporada en IQ-TREE. Específicamente, este análisis permitió caracterizar 564 secuencias de la base de datos GENOUY-VIH que se agruparon dentro de los clados correspondientes a los linajes B ($n = 519$), C ($n = 40$), F1 ($n = 11$) y A1 ($n = 1$). Es de destacar que todos estos clados presentaron un alto apoyo estadístico, con valores de SH-aLRT $\geq 0,80$ (Figura 12).

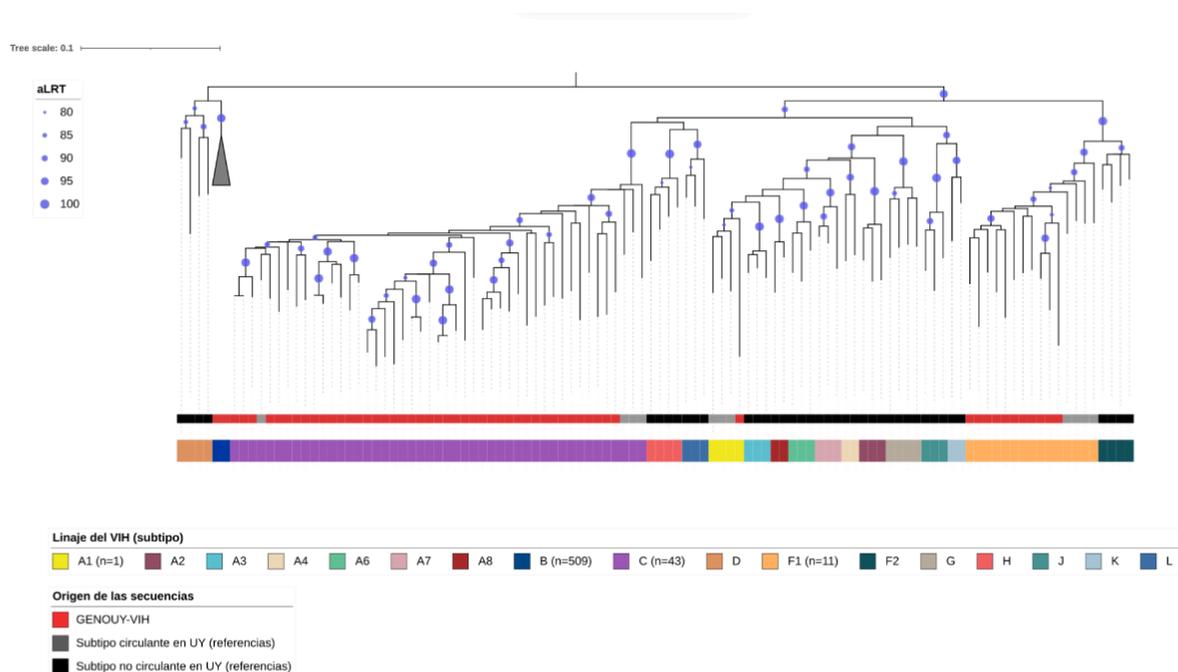


Figura 12. Inferencia filogenética de los subtipos y sub-subtipos puros del VIH-1 obtenida por el método de Máxima Verosimilitud: Árbol de secuencias puras. Realizada en base a 619 secuencias, 556 pertenecientes a GENOUY-VIH, 7 al banco de datos Los Alamos y 56 de referencia pertenecientes a todos los subtipos y sub-subtipos puros del grupo M del VIH-1 de Los Alamos. La barra horizontal superior indica las secuencias de la base de datos GENOUY-VIH (rojo), las secuencias de referencia pertenecientes a linajes del VIH-1 que circulan en Uruguay (gris), y las secuencias de referencia de linajes no circulantes en nuestro país (negro). La barra horizontal inferior muestra las secuencias de los distintos subtipos y sub-subtipos (leyenda colores). El clado B se encuentra colapsado (más de 500 secuencias). El árbol se enraizó en el punto medio. Todos los nodos marcados con círculos presentan un apoyo de SH-aLRT $\geq 0,80$. Las longitudes de las ramas se representan en una escala de sustituciones de nucleótidos por sitio.

4.2.2.2. Árbol filogenético de FRCs

La inferencia se realizó utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+F+I+G4, el cual fue seleccionado mediante la aplicación ModelFinder incorporada en IQ-TREE (Lanfear et al., 2012). Los resultados corroboran la existencia de al menos 12 linajes recombinantes circulantes en Uruguay: 01_AE, 12_BF, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 28/29_BF1, 31_BC, 38_BF1, 41_CD, 46_BF1 y 60_BC. Cabe destacar que los clados correspondientes a cada uno de estos linajes presentan un sólido apoyo estadístico ($SH-aLRT \geq 0,80$), a excepción del linaje 01_AE ($SH-aLRT = 0,50$) (Figura 13). En algunos casos pueden observarse secuencias de referencia de distintos linajes dentro de un mismo clado, tal es el caso de las formas recombinantes 39_BF1 y 89_BF1 no circulantes en nuestro país, que se intercalan entre las secuencias que componen el clado 12_BF. Esto se debe a que las FRCs 39_BF1 y 89_BF1 presentan un patrón de recombinación similar al de 12_BF en la región analizada.

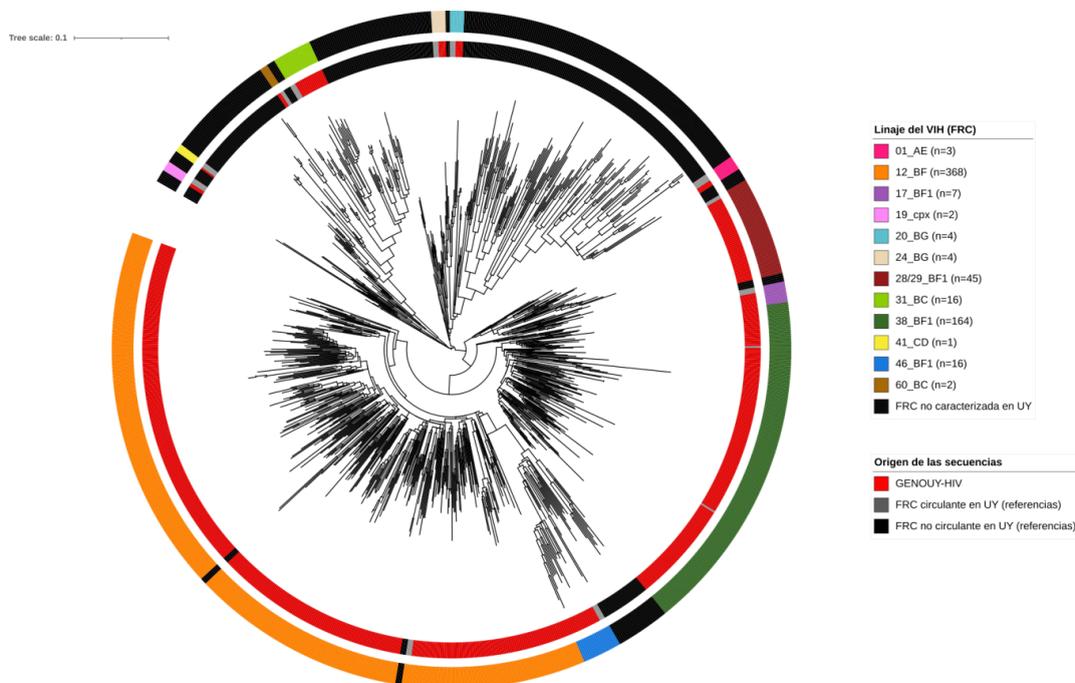


Figura 13. Inferencia filogenética de los linajes recombinantes del VIH-1 obtenida por el método de Máxima Verosimilitud: Árbol de FRCs. Realizada en base a 1077 secuencias, 633 provenientes de GENOUY-VIH, 11 del banco de datos Los Alamos y 356 de referencia de todas las FRCs descritas en Los Alamos. El árbol se enraizó en el punto medio. Todos los clados de linajes recombinantes presentaron un apoyo de $SH-aLRT \geq 0,80$, excepto el correspondiente a 01_AE ($SH-aLRT = 0,50$). Las longitudes de las ramas se representan en una escala de sustituciones de nucleótidos por sitio. El anillo interno muestra el origen de las secuencias: base de datos GENOUY-VIH (rojo) y Los Alamos (gris y negro). El anillo externo indica los distintos linajes circulantes en Uruguay (leyenda de colores). **Lista de FRCs de referencia utilizadas:** 01_AE, 02_AG, 03_A6B, 04_cpx, 05_DF, 06_cpx, 07_BC, 08_BC, 09_cpx, 10_CD, 11_cpx, 12_BF, 13_cpx, 14_BG, 15_01B, 16_A2D, 17_BF1, 18_cpx, 19_cpx, 20_BG, 21_A2D, 22_01A1, 23_BG, 24_BG, 25_cpx, 26_A5U, 27_cpx, 28_29BF1, 30_0206, 31_BC, 32_06A6, 33_01B, 34_01B, 35_A1D, 36_cpx, 37_cpx, 38_BF1, 39_BF1, 40_BF1, 41_CD, 42_BF1, 43_02G, 44_BF1, 45_cpx, 46_BF1, 47_BF1, 48_01B, 49_cpx, 50_A1D, 51_01B, 52_01B, 53_01B, 54_01B, 55_01B, 56_cpx, 57_BC, 58_01B, 59_01B, 60_BC, 61_BC, 62_BC, 63_02A6, 64_BC, 65_cpx, 66_BF1, 67_01B, 68_01B, 69_01B, 70_BF1, 71_BF1, 72_BF1, 73_BG, 74_01B, 75_BF1, 76_01B, 77_cpx, 78_cpx, 79_0107, 80_0107, 81_cpx, 82_cpx, 83_cpx, 84_A1D, 85_BC, 86_BC, 87_cpx, 88_BC, 89_BF1, 90_BF1, 92_C2U, 93_cpx, 94_cpx, 95_02B, 96_cpx, 97_01B, 98_06B, 99_BF1, 100_01C, 101_01B, 102_0107, 103_01B, 104_0107, 105_0108, 106_cpx, 107_01B, 108_BC, 109_0107, 110_BC, 111_01C, 112_01B, 113_0107, 114_0155, 115_01C, 116_0108, 117_0107, 118_BC.

4.2.2.3. Árboles de secuencias sin asignación de linaje

Las inferencias realizadas en base a las secuencias que no fueron asignadas previamente a ningún linaje conocido evidenciaron la presencia de un clado con elevado apoyo estadístico, conformado por 107 de las 111 secuencias analizadas. Este clado, conformado únicamente por secuencias de la base de datos GENOUY-VIH y sin ninguna de las secuencias de referencia, fue denominado “BF1.x”.

a) Con secuencias de referencia de subtipos puros del grupo M del VIH-1

La inferencia filogenética de secuencias sin linaje asignado y secuencias de referencias de subtipos puros del grupos M se obtuvo utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos K3Pu+I+G4, seleccionado mediante ModelFinder (Lanfear et al., 2012). El árbol filogenético resultante muestra el clado BF1.x con un apoyo estadístico de SH-aLRT = 0,96 (Figura 14). Cabe destacar que, esta inferencia deja aún sin caracterizar 4 secuencias, ya que estas aparecen dispersas fuera del clado BF1.x y sin agrupar con ninguna secuencia de referencia de linaje conocido.

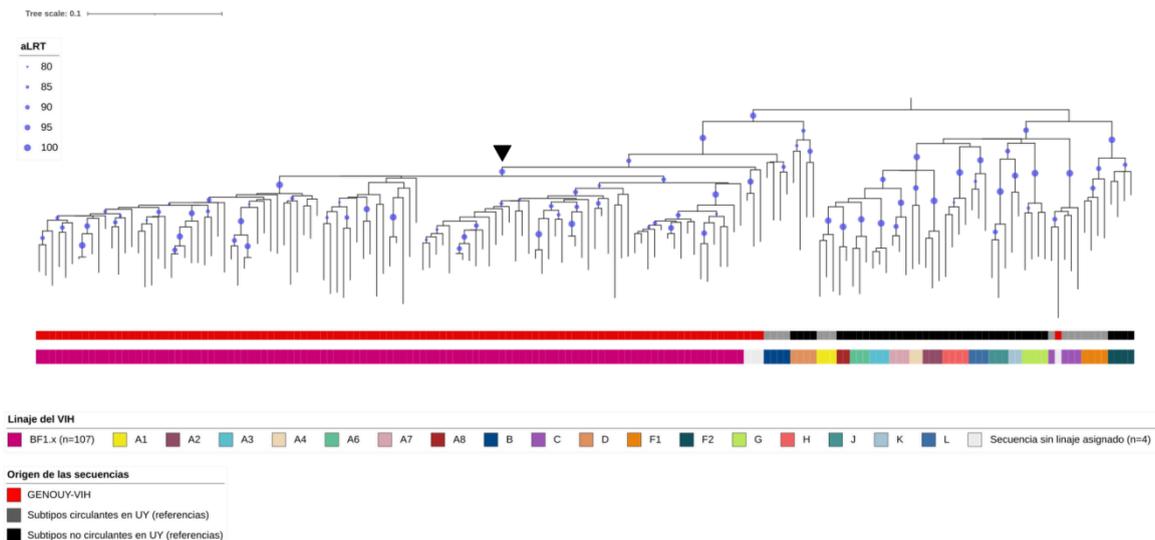


Figura 14. Inferencia filogenética mediante el método de Máxima Verosimilitud de secuencias “sin linaje asignado” Realizada en base a 166 secuencias, 109 provenientes de GENOUY-VIH, 2 del banco de datos Los Alamos y 55 de referencia de subtipos y sub-subtipos puros del grupo M. El árbol se enraizó en el punto medio. Todas las ramas marcadas con un punto presentan un apoyo de SH-aLRT \geq 0,80. Las longitudes de las ramas se muestran en una escala de sustituciones de nucleótidos por sitio. La barra horizontal superior indica el origen de las secuencias: base de datos GENOUY-VIH (rojo), secuencias de referencia de los linajes circulantes en Uruguay (gris) y secuencias de referencia de los linajes no circulantes en Uruguay (negro). La barra horizontal inferior muestra las secuencias de los linajes puros del VIH. La flecha negra marca el nodo raíz del clado “BF1.x” (SH-aLRT=0,96).

b) Con secuencias de referencia de linajes recombinantes

El árbol filogenético de secuencias sin linaje asignado y secuencias de referencias de linajes recombinantes se obtuvo utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+F+I+G4, seleccionado mediante ModelFinder (Lanfear et al., 2012). El árbol filogenético obtenido muestra el clado BF1.x con alto apoyo estadístico (SH-aLRT = 0,92). Como se puede observar, este resultado coincide con el obtenido con la inferencia filogenética previamente realizada utilizando secuencia de referencias de subtipos puros (sección 4.2.2.3.a), dejando a las mismas 4 secuencias sin linaje asignado dispersas sin agrupar junto a secuencias de ningún linaje conocido (Figura 15).

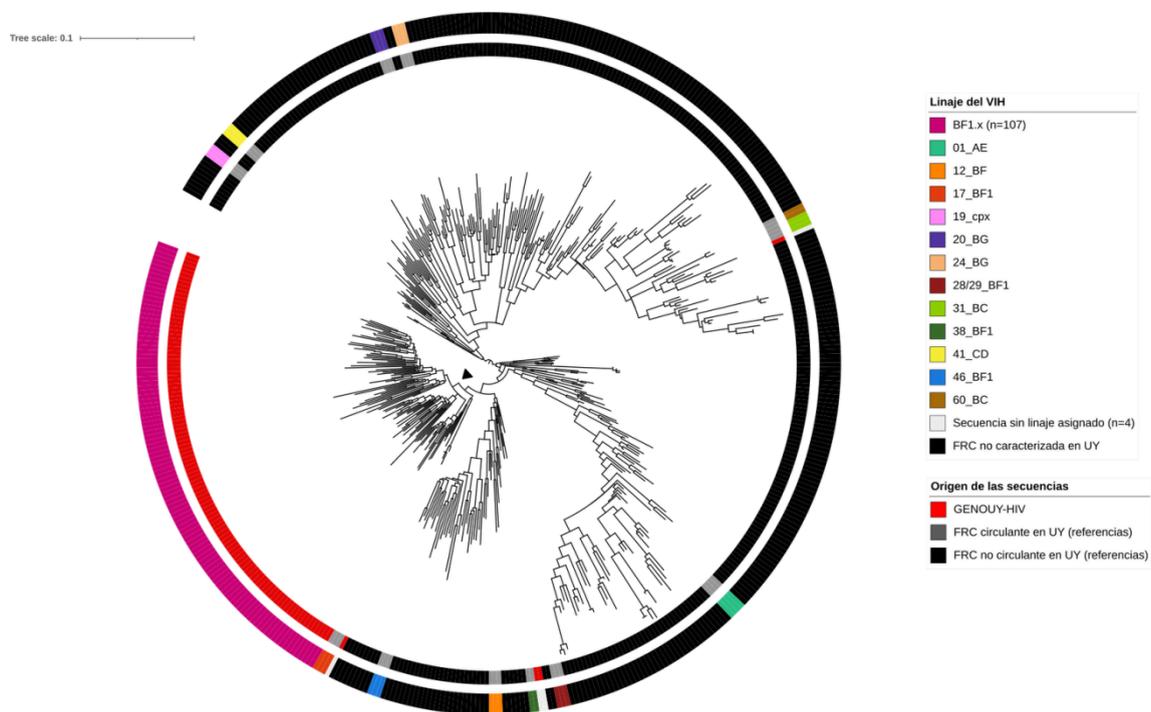


Figura 15. Reconstrucción filogenética obtenida por el método de máxima verosimilitud de las secuencias de nuestra base de datos sin linaje asignado. Realizada en base a 467 secuencias, 109 provenientes de GENOUY-VIH, 2 del banco de datos Los Alamos y 356 de referencia de los diferentes linajes recombinantes del VIH-1. El árbol se enraizó en el punto medio. Las longitudes de las ramas se muestran en una escala de sustituciones por sitio. El anillo interno muestra las secuencias de GENOUY-VIH (rojo), las de referencia de recombinantes circulantes en Uruguay (gris) y las de referencia no circulantes en el país (negro). El anillo externo indica las secuencias de los linajes recombinantes circulantes en Uruguay. La flecha negra marca el nodo raíz del clado “BF1.x” (SH-aLRT=0,96). **Lista de FRCs de referencia utilizadas:** 01_AE, 02_AG, 03_A6B, 04_cpx, 05_DF, 06_cpx, 07_BC, 08_BC, 09_cpx, 10_CD, 11_cpx, 12_BF, 13_cpx, 14_BG, 15_01B, 16_A2D, 17_BF1, 18_cpx, 19_cpx, 20_BG, 21_A2D, 22_01A1, 23_BG, 24_BG, 25_cpx, 26_A5U, 27_cpx, 28_29BF1, 30_0206, 31_BC, 32_06A6, 33_01B, 34_01B, 35_A1D, 36_cpx, 37_cpx, 38_BF1, 39_BF1, 40_BF1, 41_CD, 42_BF1, 43_02G, 44_BF1, 45_cpx, 46_BF1, 47_BF1, 48_01B, 49_cpx, 50_A1D, 51_01B, 52_01B, 53_01B, 54_01B, 55_01B, 56_cpx, 57_BC, 58_01B, 59_01B, 60_BC, 61_BC, 62_BC, 63_02A6, 64_BC, 65_cpx, 66_BF1, 67_01B, 68_01B, 69_01B, 70_BF1, 71_BF1, 72_BF1, 73_BG, 74_01B, 75_BF1, 76_01B, 77_cpx, 78_cpx, 79_0107, 80_0107, 81_cpx, 82_cpx, 83_cpx, 84_A1D, 85_BC, 86_BC, 87_cpx, 88_BC, 89_BF1, 90_BF1, 92_C2U, 93_cpx, 94_cpx, 95_02B, 96_cpx, 97_01B, 98_06B, 99_BF1, 100_01C, 101_01B, 102_0107, 103_01B, 104_0107, 105_0108, 106_cpx, 107_01B, 108_BC, 109_0107, 110_BC, 111_01C, 112_01B, 113_0107, 114_0155, 115_01C, 116_0108, 117_0107, 118_BC.

4.3. Análisis de recombinación de las secuencias sin linaje asignado

El análisis de recombinación realizado a las secuencias que no agruparon con ningún subtipo o FRC conocido permitió determinar el punto de recombinación de cada una de ellas. La posición promedio del punto de recombinación de todas las secuencias del clado BF1.x fue 2519 ± 140 nucleótidos con respecto a la cepa de referencia HXB2 (Figura 16).

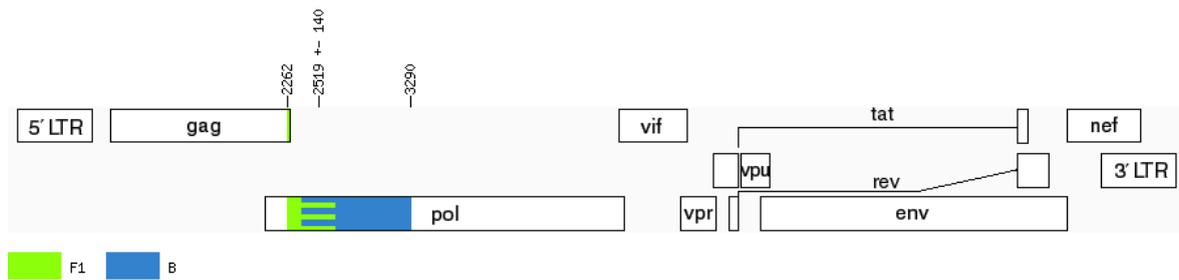


Figura 16. Rango del punto de recombinación estimado para el clado BF1.x. Realizada utilizando la herramienta *Recombinant HIV-1 Drawing Tool* disponible en Los Alamos.

El análisis de recombinación de las 4 secuencias sin linaje asignado muestra que tres de ellas son recombinantes B/F1, mientras que la restante presenta un predominio del subtipo C en la región de secuencia analizada. Teniendo en cuenta que estas secuencias se han encontrado en menos de tres individuos y que no presentan relación con linajes conocidos del VIH-1, se sugiere que podrían ser FRUs (Figura 17).

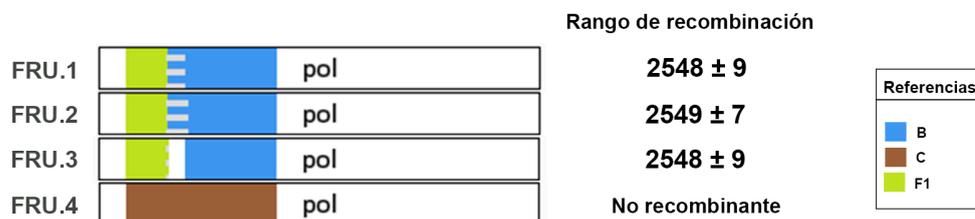


Figura 17. Análisis de recombinación del gen *pol* de las 4 secuencias sin linaje asignado. Las coordenadas se obtuvieron utilizando como referencia el genoma de la cepa de VIH-1 HXB2.

4.4. Diversidad molecular del VIH-1 en Uruguay

La caracterización molecular de las 1308 secuencias (1288 pertenecientes a GENOUY-VIH y 20 obtenidas del banco de datos Los Alamos), permitió establecer que entre 1999 y 2022 circularon al menos 17 linajes de VIH-1 en nuestro país.

La variación en la diversidad del VIH-1 en Uruguay, centrada específicamente en las 1270 secuencias pertenecientes a la base de datos GENOUY-VIH que abarcan el periodo 2007-2021, se muestra en la Figura 18 y en la Tabla 1.

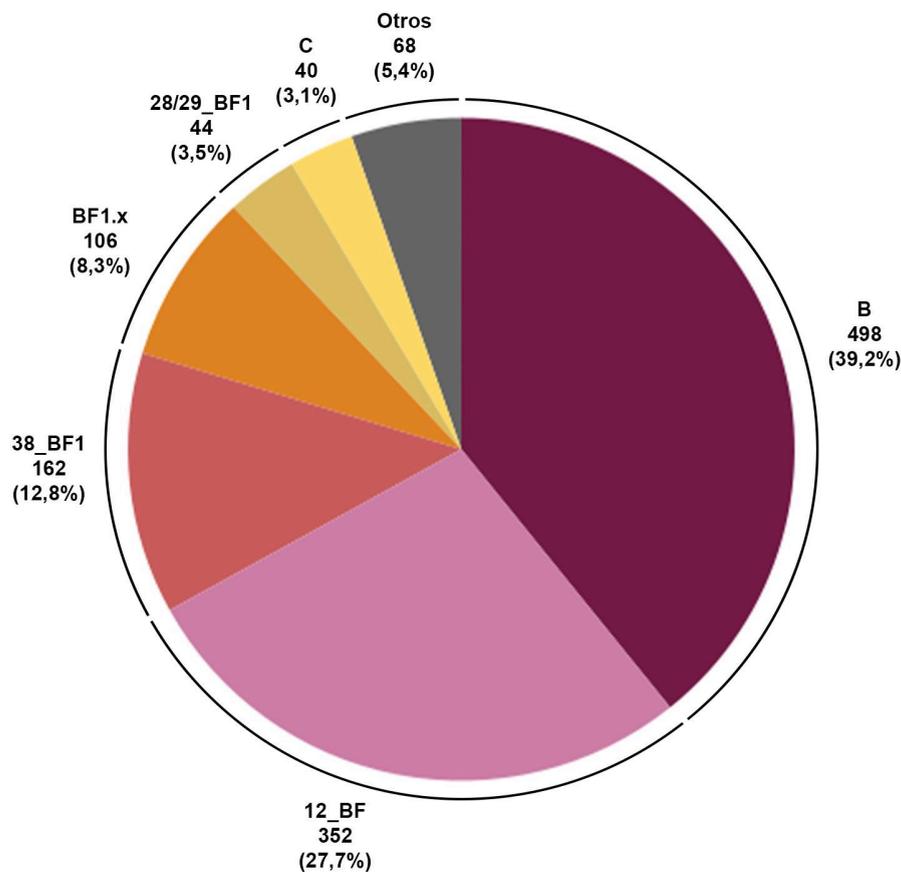


Figura 18. Prevalencia de los linajes circulantes en Uruguay entre 2007 y 2021. Para cada linaje, se muestra el número de secuencias y el porcentaje. El grupo denominado "Otros" representa todos los linajes con un número de secuencias menor a 40.

Los resultados muestran que, en Uruguay, el subtipo B (39,2%) y las FRCs 12_BF (27,7%) y 38_BF1 (12,8%) son responsables de aproximadamente el 80% de las infecciones por VIH-1 en el periodo 2007-2021. En términos de prevalencia, les siguen el clado BF1.x (8,3%), las FRCs 28/29_BF1 (3,5%) y el subtipo C (3,1%). Los sub-subtipos A1 y F1, las FRCs 01_AE, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 31_BC, 41_CD, 46_BF1 y 60_BC y las FRUs en conjunto comprenden el 5,4% de las secuencias analizadas (Figura 18, Tabla 1).

Tabla 1. Diversidad del VIH-1 en Uruguay en el periodo 2007-2021. Se muestra, para cada linaje, la cantidad de secuencias, el porcentaje y rango temporal.

Linaje	Cantidad	Porcentaje	Rango temporal
B	498	39.2	2007-2021
12_BF	352	27.7	2007-2021
38_BF1	162	12.8	2007-2021
BF1.x	106	8.3	2007-2021
28/29_BF1	44	3.5	2008-2021
C	40	3.1	2009-2021
46_BF1	16	1.3	2010-2021
31_BC	14	1.1	2011-2021
F1	10	0.8	2008-2021
17_BF1	7	0.6	2008-2019
20_BG	4	0.3	2014-2020
24_BG	4	0.3	2011-2021
FRU	4	0.3	2008-2016
01_AE	3	0.2	2012-2017
19_cpx	2	0.2	2021
60_BC	2	0.2	2017-2019
41_CD	1	0.1	2010
A1	1	0.1	2009
Total	1270	100	

Por otro lado, el análisis de las frecuencias en los periodos 2007-2010 y 2011-2021 (Tabla 2) muestra una leve disminución en la frecuencia del subtipo B y un marcado aumento de los recombinantes BF1 (FRCs 12_BF, 17_BF1, 28/29_BF1, 38_BF1, 46_BF1 y BF1.x en conjunto). A su vez, se observa un pequeño incremento en la frecuencia del subtipo C, mientras que la frecuencia del sub-subtipo F1 no experimenta cambios.

Tabla 2. Frecuencia de los linajes del VIH-1 en Uruguay en los periodos 2007-2010 y 2011-2021.

	Frecuencia (%)	
	2007-2010	2011-2021
B	42.9	38.7
Recombinantes BF1*	37.9	54.6
C	1.2	3.4
F1	0.6	0.8
Otros	17.4	2.5

*comprende las secuencias 12_BF, 17_BF1, 28/29_BF1, 38_BF1, 46_BF1 y BF1.x en conjunto.

4.5. Análisis estadísticos

4.5.1. Distribución Geográfica

De las 1270 secuencias de la base de datos GENOUY-VIH que se utilizaron para hacer las inferencias filogenéticas, solamente 777 (61,1%) tenían información sobre el lugar de adquisición del virus. De estas, 584 (75,2%) pertenecían a la Zona Metropolitana, 73 (9,4%) a la región Noreste, 71 (9,1%) a la región Oeste, 43 (5,5%) a la región Este y 6 (0,8%) a la región Centro (Figura 19). Cabe mencionar que, debido al bajo porcentaje de secuencias de la región Centro, los análisis estadísticos obtenidos para esta región deben ser tomados con cautela.

Los resultados muestran una amplia distribución del subtipo B, de los recombinantes 12_BF, 38_BF1 y del clado BF1.x en todo el país. Específicamente, el subtipo B presenta una frecuencia cercana al 30% (29,6% a 39,7%) en todas las regiones analizadas, siendo el linaje de mayor prevalencia en las regiones Centro, Noreste y la Zona Metropolitana. En cuanto al linaje 12_BF, se observa una gran variación en su frecuencia entre las distintas regiones, destacándose como el linaje de mayor prevalencia en las regiones Este y Oeste. En la región Oeste, presenta una frecuencia superior al 50,0%, en marcado contraste con el 15,1% observado en la región Noreste. Los resultados obtenidos de las pruebas Z entre regiones indican que la región Oeste tiene una mayor proporción de secuencias 12_BF y una menor de subtipo B en comparación con la región Noreste y la Zona Metropolitana (Anexo TABLA1). Aunque el linaje 38_BF1 está presente en todas las regiones, su frecuencia es menor que la observada en el subtipo B y 12_BF, oscilando entre el 8% y el 16% en las diferentes regiones geográficas definidas. Entre los linajes que se encuentran en todas las regiones, el clado BF1.x es el que posee la menor prevalencia, con la excepción de la región Centro, donde su frecuencia iguala a la de 38_BF1. Específicamente, en la Zona Metropolitana y en las regiones Noroeste, Este y Centro, el clado BF1.x presenta una frecuencia mayor al 4,0%, oscilando entre el 4,7% y el 16,7%. En la región Oeste, su frecuencia es inferior (Figura 19).

El subtipo C y el linaje 31_BC solo fueron identificados (con una frecuencia mayor a 4,0%) en dos de las cinco regiones analizadas. Mientras que el subtipo C fue detectado en las regiones Noreste y Centro, el linaje 31_BC fue encontrado en las regiones Noreste, Este y, en menor medida, en la Zona Metropolitana (Figura 19). A su vez, los resultados de las pruebas Z de la comparación entre regiones indican que la región Noreste tiene una mayor proporción de subtipo C y, a su vez, una proporción menor de 12_BF y 38_BF en comparación con la Zona Metropolitana (Anexo TABLA 1).

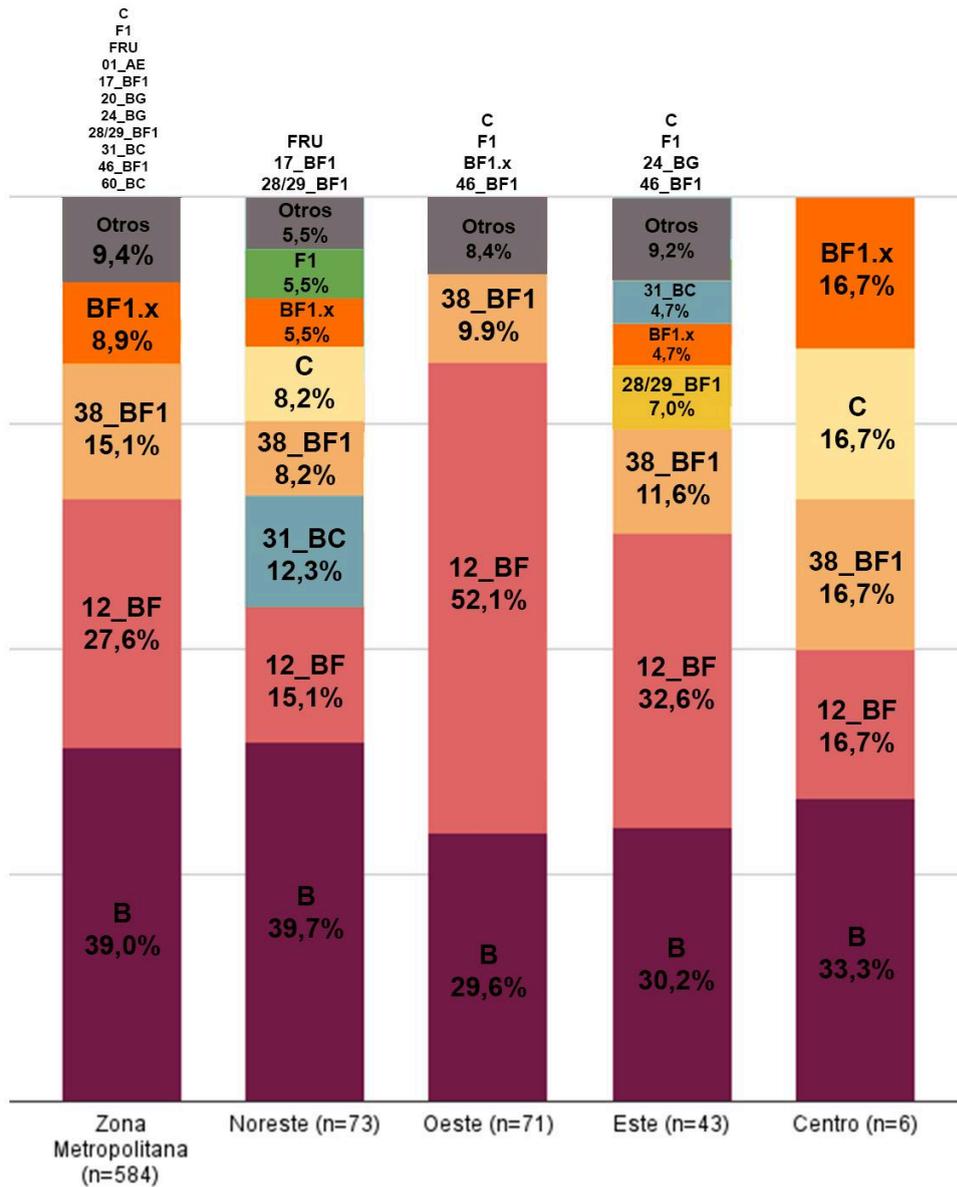


Figura 19. Distribución de los linajes del VIH-1 circulantes en Uruguay por región geográfica (n = 1270). El grupo "Otros" (gris) engloba los linajes con una frecuencia menor al 4%, detallados arriba de cada barra.

4.5.2. Género

De las 1270 secuencias de la base de datos GENOUY-VIH que se utilizaron para hacer las inferencias filogenéticas, un total de 1230 (96,9%) tenían información sobre el género del paciente.

Cuando se compara, mediante el test de Fisher, la cantidad de secuencias discriminada por los tres géneros (Femenino, Masculino y Transgénero) de cada uno de los linajes por

separado con la cantidad de secuencias por género del “resto” de los linajes (“resto” incluye todas aquellas secuencias que no pertenecen al linaje en cuestión), los resultados obtenidos muestran que existe una asociación entre el género y el subtipo B ($p = 0,000$), el linaje 12_BF ($0,005$) y el linaje 38_BF1 ($0,036$). Por otra parte, los resultados de las pruebas Z (test de proporciones) indican que, el subtipo B tiene una mayor proporción de hombres y una menor proporción de mujeres que el resto. A su vez, el recombinante 12_BF tiene una mayor proporción de individuos transgénero y una menor proporción de hombres, mientras que el recombinante 38_BF1 tiene una mayor proporción de mujeres y menor proporción de hombres (Figura 20, Anexo TABLA 2). Cabe mencionar que, aunque el resultado del test de Fisher no muestra una asociación entre el clado BF1.x y el género ($p = 0,083$), el test de proporciones indica que este clado presenta significativamente una mayor proporción de mujeres y una menor proporción de hombres que el resto de los linajes en conjunto (Anexo TABLA 1)

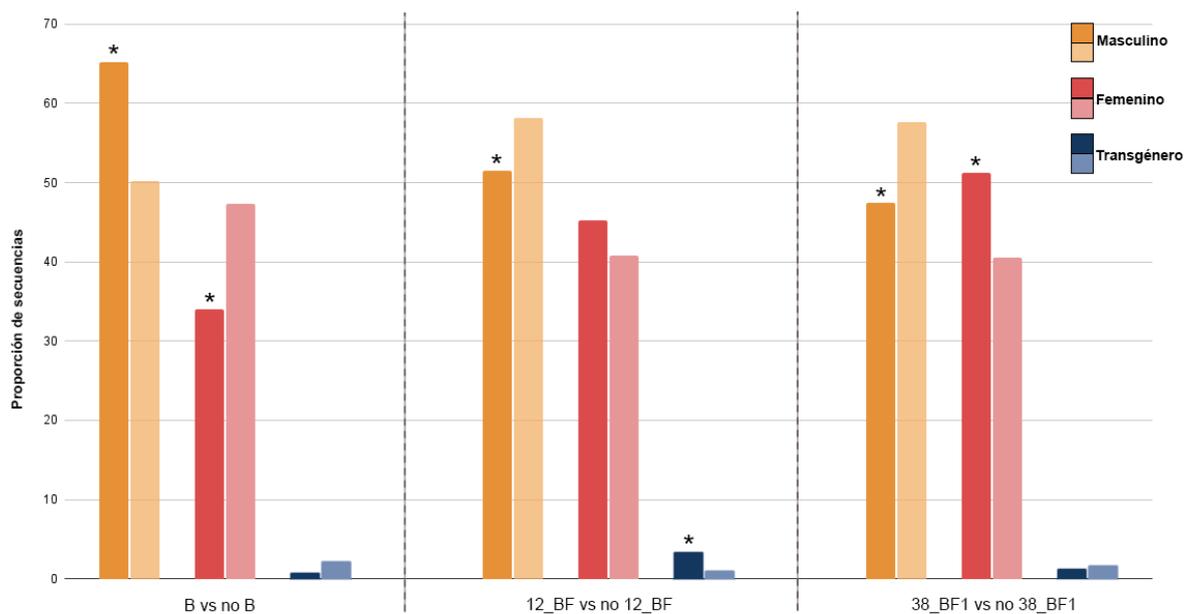


Figura 20. Linaje y género. Para cada uno de los tres linajes en el que el test de Fisher mostró una asociación con el género (B, 12_BF y 38_BF), se muestra el porcentaje de secuencias para cada uno de los tres géneros analizados (Femenino, Masculino y Transgénero). * Test de proporciones significativos.

A su vez, al realizar estos mismos análisis pero teniendo en cuenta sólo los géneros Femenino y Masculino, los resultados muestran que existe una asociación entre el género y el subtipo B ($p = 0,000$), el linaje 38_BF1 ($p = 0,015$) y el clado BF1.x ($p = 0,042$). Para estos tres linajes, el test de proporciones fue significativo e igual a los obtenidos cuando se tienen en cuenta los tres géneros. Como se esperaba, al considerar únicamente el género

Femenino y Masculino, no se evidencia una asociación entre el linaje 12_BF y el género, ya que esta asociación está dada por una mayor proporción de individuos transgénero dentro de este linaje.

Por su parte, el análisis de riesgo realizado, reveló que las mujeres presentan un mayor riesgo de portar la FRC38_BF1 (OR [95% IC] = 1,537 [1,097 - 2,153], $p = 0,012$) y BF1.x (OR [95% IC] = 1,545 [1,019 - 2,342], $p = 0,040$) que los hombres. A su vez, los hombres presentan un mayor riesgo de tener el subtipo B (OR [95% IC] = 1,792 [1,429 - 2,273], $p = 0,000$) en comparación con las mujeres.

Respecto a la comparación entre linajes, tanto cuando realizan los análisis teniendo en cuenta los tres géneros como cuando se consideran sólo los géneros Femenino y Masculino, el test de proporciones evidencia que el subtipo B tiene significativamente una mayor proporción de hombres que las FRCs 12_BF, 28/29_BF1 y 38_BF1, así como también que el subtipo C y el clado BF1.x (Anexo TABLA 2).

4.5.3. Vía de transmisión

De las 1270 secuencias de la base de datos GENOUY-VIH que se utilizaron para hacer las inferencias filogenéticas, un total de 1185 (93,3%) tenían información sobre la vía de transmisión. Sin embargo, únicamente 854 secuencias pudieron ser utilizadas para los análisis estadísticos, ya que la información de las 331 (27,9%) restantes no discriminaba la vía de transmisión (“Sexual/Bisexual”).

Los resultados obtenidos del análisis de la relación entre los linajes y la vía de transmisión, teniendo en cuenta HTX (Heterosexual), HSH (Hombre que tienen sexo con Hombres) y UDIV (Usuarios de Drogas Intravenosas), muestran que existe una asociación entre esta variable y el subtipo B ($p = 0,000$), la FRC38_BF1 ($p = 0,000$) y el clado BF1.x ($p = 0,013$) descrito en esta tesis (Anexo, TABLA 3). Estas mismas asociaciones fueron encontradas cuando se tuvieron en cuenta únicamente las vías de transmisión HTX y HSH (datos no mostrados).

Por su parte, el test de proporciones evidenció que el subtipo B tiene una mayor proporción de transmisión por HSH (31,1%) que el Resto de los linajes en conjunto (18,6%) (Figura 21, Anexo TABLA 2). Específicamente, cuando se comparan las proporciones entre linajes, se observa que el subtipo B tiene una mayor proporción de transmisión por HSH que los recombinantes 12_BF (21,8%) y 38_BF1 (12,5%), así como también que el clado BF1.x (11,0%). A su vez, la FRC38_BF1 tiene una mayor proporción de transmisión por Drogas (12,5%) y una menor proporción de transmisión por HSH que el Resto (3,1%) (Figura 21,

Anexo TABLA 2). Concretamente, este recombinante tiene una mayor proporción de transmisión por Drogas que el subtipos B (2,9%), la FRC12_BF (4,4%) y el clado BF1.x (2,7%). Finalmente, el test de proporciones permitió determinar que el clado BF1.x tiene una mayor proporción (86,3%) de transmisión HTX que el Resto (70,8%) (Figura 21, Anexo TABLA 2).

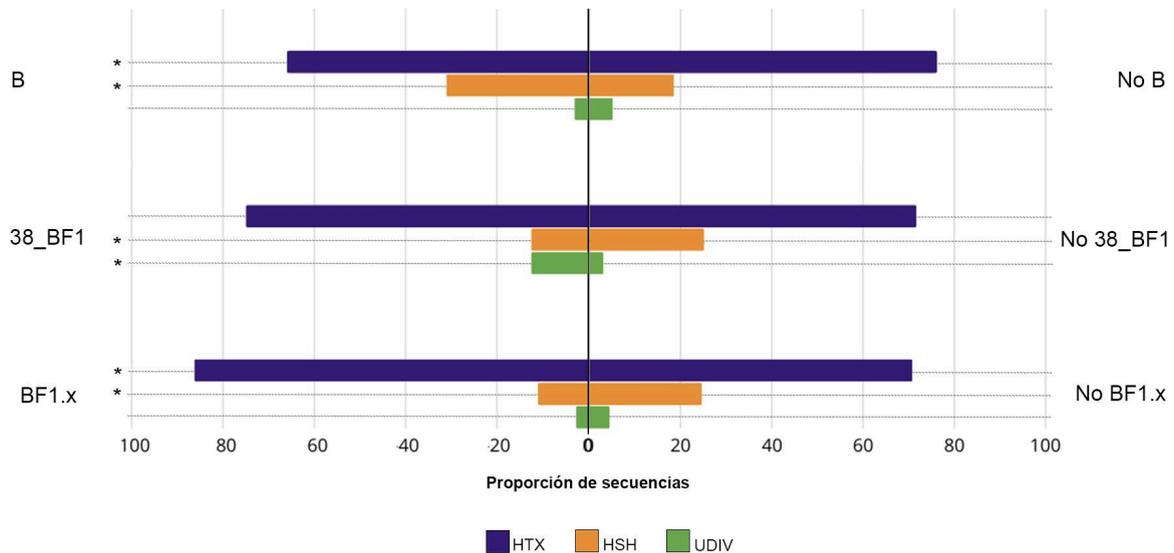


Figura 21. Linaje y vía de transmisión. Para cada uno de los tres linajes en el que el test de Fisher mostró una asociación con la vía de transmisión (B, 38_BF y BF1.x), se muestra el porcentaje de secuencias para cada uno de los tres vía de transmisión analizadas. * Test de proporciones significativos. HTX: heterosexual, HSH: hombres que tienen sexo con hombres, UDIV: usuarios de drogas intravenosas.

Por su parte, el análisis de riesgo, mostró que la vía de transmisión HSH presenta mayor riesgo de transmitir el subtipo B (OR [95% IC] = 1,928 [1,397 - 2,659], $p = 0,000$) en comparación con el resto de los linajes estudiados de forma conjunta. A su vez, la vía de transmisión HTX presenta un mayor riesgo de transmitir la FRC38_BF1 (OR [95% IC] = 2,110 [1,170 - 3,802], $p = 0,013$) y BF1.x (OR [95% IC] = 2,747 [1,294 - 5,848], $p = 0,009$) que el resto de los linajes en conjunto.

4.5.4. Correlación Temporal

Al analizarse la posible correlación por años de los seis linajes más frecuentes y de los recombinantes BF1 (se incluyen aquí las FRCs 12_BF, 17_BF1, 28/29_BF1, 38_BF1, 46_BF1 y BF1.x), el test de Pearson evidenció únicamente una correlación negativa para el subtipo B ($R = -0,525$; $p = 0,044$) a lo largo del tiempo (Figura 22). Esta correlación negativa también fue evidenciada cuando los análisis se realizaron por trienios ($R = -0,908$; $p = 0,033$) (Figura 23, Anexo FIGURA 1).

A su vez, el análisis por trienios de los recombinantes BF1 mostró una correlación positiva ($R = 0,929$; $p = 0,022$) a lo largo del tiempo, que no había sido encontrada en el análisis de correlación de Pearson por años (Figura 23).

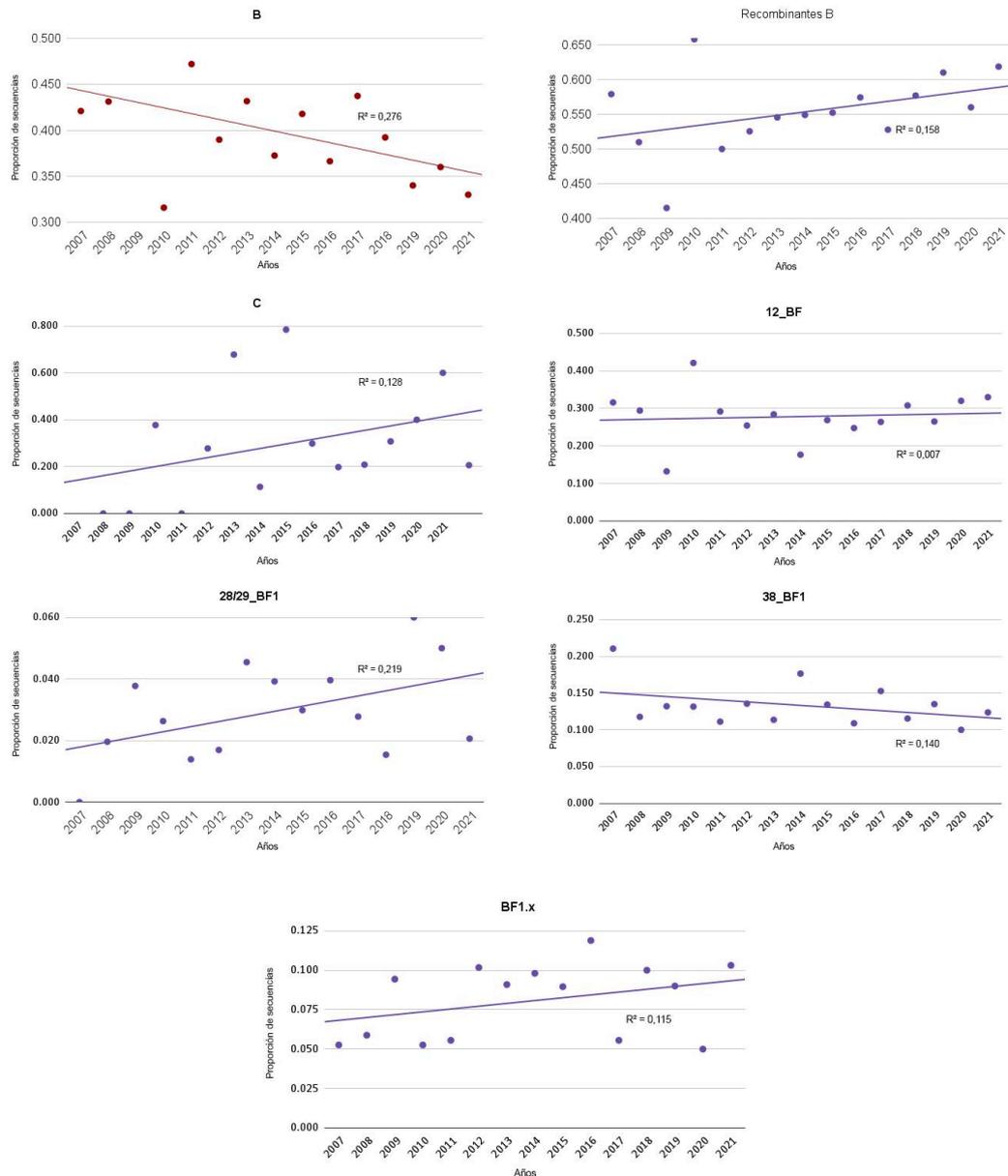


Figura 22. Tendencia temporal por año. Para cada uno de los seis linajes más frecuentes y los recombinantes B, se muestra la proporción de secuencias por año en el periodo 2007-2021. En rojo, aquellos linajes para los que el test de Pearson fue significativo (p -valor < 0,05). “Recombinantes B”: secuencias 12_BF, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 28/29_BF1, 31_BC, 38_BF1, 46_BF1, 60_BC y BF1.x.

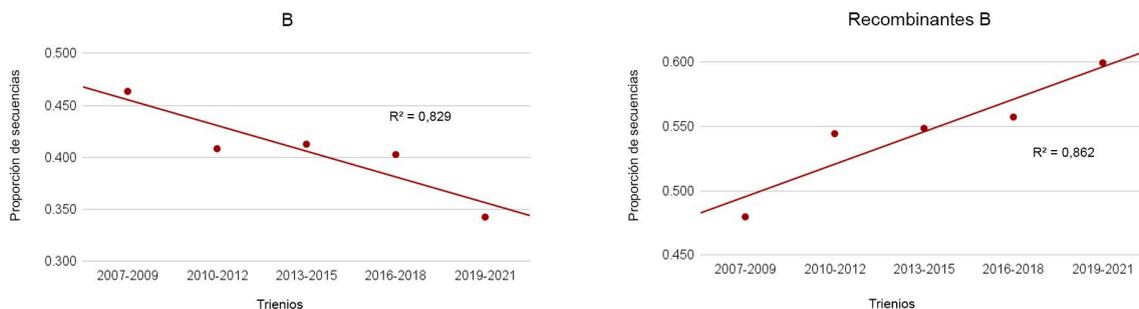


Figura 23. Tendencia temporal por trienio del subtipo B y recombinantes B. Para cada uno de los linajes, se muestra la proporción de secuencias por trienio en el periodo 2007-2021. “Recombinantes B”: 12_BF, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 28/29_BF1, 31_BC, 38_BF1, 46_BF1, 60_BC y BF1.x.

5. Discusión

Este estudio representa el análisis más exhaustivo de epidemiología molecular del VIH-1 en Uruguay hasta la fecha, tanto en términos de la cantidad de secuencias genéticas consideradas como en el periodo temporal abordado. Su objetivo consistió en la caracterización de la dinámica de la epidemia del VIH-1 mediante el análisis de 1270 secuencias genéticas virales, pertenecientes a la base de datos GENOUY-VIH, que corresponden a muestras tomadas en el periodo 2007- 2021.

La caracterización genética realizada proporciona una visión detallada de los linajes predominantes de VIH-1 en Uruguay (B, C, 12_BF, 38_BF1, BF1.x y 28/29_BF1) durante el período estudiado. La extensa cantidad de secuencias analizadas permitió también la identificación de linajes de menor prevalencia o de introducción esporádica, como los sub-subtipos A1 y F1, así como los recombinantes 01_AE, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 31_BC, 41_CD, 46_BF1 y 60_BC.

El registro más antiguo sobre epidemiología molecular de VIH-1 en Uruguay es un estudio realizado por el DLSP en el año 2007, en conjunto con el Instituto de Salud Carlos III de España. En dicho estudio, se analizaron filogenéticamente 95 secuencias correspondientes a fragmentos de los genes *gag* y *vpu/env* pertenecientes al periodo 1989-2005. Sus resultados describen al subtipo B como el linaje más frecuente. Se identificaron también el subtipo C y las FRCs 12_BF y 28/29_BF1, además de un nuevo recombinante BF (Ruchansky et al., 2007), el cual se analiza en estudios posteriores y se describe como la FRC 38_BF1 (Ruchansky et al., 2009).

Desde el año 2010, el MSP publica anualmente un informe epidemiológico que resume la información más reciente sobre la epidemia del VIH en Uruguay. No obstante, únicamente el informe del año 2011 incluye información sobre la epidemiología molecular, específicamente el análisis de secuencias provenientes del genotipado de resistencia obtenidas entre 2007 y 2010. Estas secuencias comprenden el mismo fragmento de la región *pol* que se examina en este trabajo, abarcando parte de los genes *pr* y *rt*. Este documento notifica la prevalencia, en ese entonces, de los subtipos B (46,6%), F (1,16%) y C (1,16%), así como de las formas recombinantes BF1 (50,9%), entre las cuales se destacan las FRCs 12_BF y 38_BF1. También se reportan los linajes A1 (0,58%) y D (0,58%) (Informe de la situación nacional de VIH/SIDA, 2011).

La publicación más reciente que aborda datos moleculares sobre el VIH-1 en Uruguay, se basa en el análisis de 206 secuencias obtenidas de adultos que iniciaron o reiniciaron la TARV entre los años 2018 y 2019. Estas secuencias también abarcan la misma región de los genes *pr* y *rt* que el presente trabajo pero incluye también las posiciones aminoacídicas 1 a 288 de la integrasa. Según dicho trabajo, los linajes del VIH-1 de mayor prevalencia en base a la región *pol* para el periodo analizado fueron, en orden descendente, el subtipo B (42,0%), los recombinantes B/F1 en su conjunto (37,6%), el sub-subtipo F1 (8,3%), y el subtipo C (4,4%) (Flieller et al., 2023).

Los resultados del presente estudio refuerzan y ratifican las tendencias previamente identificadas en investigaciones anteriores, confirmando la predominancia del subtipo B y los recombinantes BF1 en el panorama genético del VIH-1 en Uruguay. Es esencial resaltar que, aunque estas tendencias concuerdan con los estudios mencionados previamente, los mismos, aunque valiosos, se llevaron a cabo en intervalos temporales más cortos, no siempre abordaron la misma región genómica y emplean diferentes métodos y herramientas para identificar los linajes del VIH-1, lo que dificulta la comparación de resultados. El análisis ininterrumpido a lo largo del período de 15 años que abarca el presente trabajo, posibilita la identificación de tendencias epidemiológicas, manteniendo una metodología uniforme para el análisis de todas las secuencias.

Subtipo B

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que, aunque el subtipo B fue predominante en términos de prevalencia promedio (39,2%) durante el periodo 2007-2021, su frecuencia ha ido disminuyendo progresivamente a lo largo de dicho periodo (Figura 23, Tabla 2). La prevalencia calculada para el subtipo B, específicamente para el periodo 2007-2010 (Tabla 2), es similar a la reportada para el mismo periodo por el MSP en su informe del año 2011,

donde el subtipo B comprendía el 46,6% de las secuencias analizadas. Sin embargo, en el periodo 2011-2021, se observa una disminución de su frecuencia en relación con el periodo anterior (38,7%). En concordancia, el conjunto de todos los recombinantes BF1 caracterizados en este estudio (12_BF, 17_BF1, 28/29_BF1, 38_BF1, 46_BF1 y BF1.x), presentó una frecuencia promedio de 54,2%, pero con una frecuencia de 37,9% en el periodo 2007-2010 y una frecuencia de 54,6% entre 2011 y 2021, evidenciando un aumento en los últimos años. A su vez, el análisis de correlación temporal, respalda la tendencia al aumento de los recombinantes B, fenómeno que podría atribuirse a un desplazamiento del subtipo B por linajes recombinantes que lo incluyen. De hecho, en la última década en regiones como Europa occidental y central, América del Norte y otros países de América Latina, se ha observado que la proporción de subtipo B ha disminuido con el tiempo, acompañada de un aumento de FRCs y FRUs (Hemelaar et al., 2019; Gräf et al., 2021). Cabe destacar que Flieller et al. (2023), reporta una frecuencia ligeramente mayor para el subtipo B entre el periodo 2018-2019 (42,0%), que la calculada con los datos de GENOUY-VIH para ese periodo (37,0%). Esta discrepancia podría atribuirse a la limitada representatividad dada por el corto período temporal analizado en dicho estudio.

La importante presencia de este subtipo en todas las regiones del país, sugiere que la introducción temprana de este linaje en nuestro país ha contribuido a su predominio a nivel nacional. Aunque aún no se dispone de información acerca del inicio de la epidemia de subtipo B en Uruguay, esta hipótesis es concordante con lo propuesto por Mir et al.(2015), quienes indican que los linajes más antiguos de subtipo B en América del Sur y Central se originaron entre finales de la década de 1960 y mediados de la década de 1970. Es relevante señalar que, en Brasil se ha caracterizado el linaje de subtipo B más antiguo de América Latina (origen estimado 1968) y que la transmisión entre países vecinos juega un importante papel en la dinámica de este subtipo en el continente (Mir et al., 2015). Dada esta información, es altamente probable que Brasil haya desempeñado un papel central en la introducción temprana de este subtipo en Uruguay.

En línea con tendencias globales identificadas en estudios previos (Abecasis et al., 2013; Takebe et al., 2014), se observó que durante el período analizado, el subtipo B exhibió una prevalencia significativamente mayor en hombres (65,2%) que en mujeres (34,0%). Además, se identificó una asociación estadísticamente significativa entre este subtipo y la vía de transmisión. Es importante destacar que, este subtipo presenta una mayor proporción de infecciones vinculadas a relaciones HSH que el resto de los linajes en su conjunto (31,1% vs 18,6%). Este hallazgo es también particularmente significativo en comparación con los linajes 12_BF (21,8%), 38_BF1 (12,5%) y el clado BF1.x (11,0%). Esto podría

sugerir que la predominancia del subtipo B en hombres se encuentra impulsada principalmente por redes de transmisión HSH, un patrón que se ha observado en varios países a nivel mundial (Patiño-Galindo et al., 2017; Le Vu et al., 2019; Shiino et al., 2020; Gräf et al., 2021) y que, además, es respaldada por los resultados del análisis de riesgo, que indican que la vía de transmisión HSH presenta un riesgo 1,928 veces mayor de propagar subtipo B que cualquier otro linaje.

FRCs 12_BF y 38_BF1

En las últimas décadas, América Latina ha sido lugar de origen de numerosas formas recombinantes BF, ya que, poco tiempo después de la introducción del subtipo F del VIH-1 en América del Sur en la década de 1970, ya habían surgido las primeras cepas recombinantes entre este subtipo y el subtipo B, dando origen a los denominados recombinantes BF1 (Dilernia et al., 2011). Los recombinantes BF1, han emergido como actores clave en la epidemia del VIH-1 en toda América del Sur. Estudios previos (Ruchansky et al., 2009; Bello et al., 2010) han señalado la presencia de estos recombinantes en nuestro país, especialmente el 12_BF y el 38_BF1, sin aportar detalles en cuanto a sus prevalencias a nivel individual ni asociación con variables epidémicas.

Bello et al. (2010) evidenciaron que la propagación de 12_BF en Argentina y Uruguay constituye una sola epidemia, la que experimentó un rápido crecimiento exponencial durante los 5-10 años posteriores a su origen, datado entre 1982 y 1983, para luego disminuir a partir de principios de la década de 1990. En este mismo estudio se estimó que la epidemia de 38_BF1 se originó entre 1985 y 1986.

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, el recombinante 12_BF presenta una gran importancia epidemiológica en nuestro país, siendo el de mayor prevalencia (27,7%) después del subtipo B durante el periodo 2007-2021. Los análisis de distribución muestran que esta FRC se encuentra presente en todas las regiones del país, pero particularmente en las regiones Oeste y Este, donde representa el 52,1% y el 32,6% de las secuencias, respectivamente. Su importante presencia en el Oeste podría explicarse por la alta prevalencia de este linaje en Argentina (Thomson et al., 2002), país que colinda con los departamentos del oeste uruguayo, conectándose por varios cruces fronterizos. En el caso de la región Este, es probable que se deba a que las costas de Maldonado y Rocha son las que reciben mayor cantidad de turistas argentinos durante los meses de verano. Este recombinante, se observó en mayor frecuencia en la población transgénero en comparación con el resto de los linajes analizados (3,3% vs 1,0%). Aunque estos resultados carecen de respaldo en la literatura existente, destacan la necesidad de investigaciones futuras para

comprender mejor este vínculo. Aunque no se encontraron asociaciones significativas con una vía de transmisión específica, aproximadamente el 74% de las secuencias caracterizadas como 12_BF están vinculadas a transmisión HTX. Este resultado coincide con estudios previos en Argentina, donde se observó que la vía de transmisión HTX desempeña un papel fundamental en la diseminación de este recombinante, al igual que para los recombinantes BF1 en general (Ávila et al., 2002; Gomez-Carrillo et al., 2006).

Durante el periodo analizado, el recombinante 38_BF1 presentó una frecuencia promedio de 12,8%, distribuyéndose en todas las regiones del país, con variaciones regionales que abarcan desde el 8% hasta el 17% del total de casos caracterizados en cada región. Los análisis estadísticos mostraron que esta FRC es más frecuente en mujeres (51,3%) que en hombres (47,5%) y que se presenta con mayor frecuencia entre los UDIV en comparación con el resto de los linajes (12,5% vs 3,1%). A pesar de haber sido identificado en Uruguay (Ruchansky et al., 2009), no existen datos sobre la prevalencia de este linaje para poder establecer comparaciones con los valores obtenidos en el presente trabajo. Además, tampoco hay información sobre la introducción y diseminación de esta variante en otros países, incluso en los limítrofes.

La única investigación previa que proporciona datos de prevalencia para el linaje 12_BF en Uruguay, reporta una frecuencia del 2,9% durante el periodo 2018-2019 (Flieller et al., 2023). En dicho trabajo, no se detectan cepas 38_BF1, a pesar de su reconocida diseminación en nuestro país desde al menos la segunda mitad de la década de 1980 (Ruchansky et al., 2007, 2009; Bello et al., 2010). Sin embargo, para este mismo periodo, el presente trabajo indica una frecuencia promedio de 29,0% para el linaje 12_BF y de 13,0% para 38_BF1. Es probable que la falta de secuencias de linaje 38_BF1 en la investigación de Flieller et al. (2023) se deba a que la herramienta REGA Subtyping Tool utilizada por estos autores, no incluye referencias de esta FRC en su base de datos. Mientras que, la notoria diferencia en las prevalencias de 12_BF entre ambas investigaciones podría atribuirse, al menos en parte, al enfoque metodológico, ya que Flieller et al., (2023) analiza un fragmento perteneciente a la región *pol* y parte de la Integrasa. Una secuencia caracterizada como 12_BF a partir de la región *pol* puede presentar eventos de recombinación en la Integrasa, por lo que pasaría a clasificarse como recombinante de segunda generación. La caracterización de recombinantes de segunda generación, disminuiría la frecuencia de las secuencias clasificadas como 12_BF. Por esto, cuanto más extensa la región o regiones genómicas analizadas, más específica será la clasificación de linajes.

Clado BF1.x

El clado BF1.x caracterizado en el presente trabajo, engloba un considerable porcentaje de las secuencias analizadas (8,3%). Las cepas que integran este clado han estado presentes en nuestro país desde al menos el 2007. Su presencia en todas las regiones del país, subraya su importancia epidemiológica en nuestro territorio. Los análisis estadísticos indican que BF1.x es más frecuente en mujeres (51,5%) que en hombres (46,5%). Además, la principal vía de transmisión de BF1.x es la HTX, responsable de más del 80% de las infecciones por este linaje.

Aunque se necesitan análisis adicionales para determinar con precisión el punto de recombinación de las secuencias de este clado, los resultados obtenidos dejan abierta la posibilidad a dos hipótesis. La primera sugiere que, debido a que se trata de un grupo monofilético altamente respaldado, se trate de una nueva FRC de tipo BF aún no descrita. Por otro lado, la segunda hipótesis, basada en los amplios rangos de recombinación estimados (2519 ± 140), plantea la posibilidad de que estas cepas formen parte de una familia de recombinantes B/F1-*like* en lugar de representar una única FRC. Esta perspectiva considera una *familia* como un grupo de secuencias recombinantes, cuyas estructuras genómicas y puntos de recombinación pueden no ser los idénticos, pero su patrón genético es más cercano a una cepa central definida de esa familia que a cualquier otra (Zhang et al., 2010).

Para respaldar cualquiera de las hipótesis planteadas, resulta imperativo llevar a cabo la secuenciación completa del genoma de las cepas que conforman el clado BF1.x. La validación de la presencia de un patrón estructural homogéneo entre todas las secuencias de este clado a lo largo de la totalidad de su extensión genómica, evidenciaría la existencia de un nuevo linaje recombinante de VIH-1 no identificado previamente. En cambio, la detección de patrones de estructuración divergentes a lo largo de la extensión de sus genomas, nos conduciría a la identificación de distintas formas recombinantes (URFs y/o CRFs) que están contribuyendo a la diversidad de la epidemia del VIH-1 en nuestro país. La caracterización de esta diversidad resulta fundamental para comprender la dinámica de la epidemia.

FRCs 28_BF1 y 29_BF1

Tanto 28_BF1 como 29_BF1 fueron inicialmente identificados en Brasil. Y, aunque se han reportado casos esporádicos en Estados Unidos y España, la distribución de ambos recombinantes se limita principalmente a la región Sur de América Latina (De Sá Filho et al., 2006; González-Alba et al., 2011; Pyne et al., 2013). Las secuencias de GENOUY-VIH

caracterizadas como 28/29_BF1 abarcan el periodo 2008-2021. No obstante, estudios previos informan sobre la presencia de estos recombinantes en nuestro país durante el periodo 1989-2005 (Ruchansky et al. 2007).

La prevalencia media de 28/29_BF1 entre las secuencias de GENOUY-VIH es de 3,5%. A diferencia de 12_BF, 38_BF1 y BF1.x detectados en todas las regiones del país, no se caracterizaron cepas 28/29_BF1 en las regiones Centro y Oeste de Uruguay. La región con mayor prevalencia de estos recombinantes es la Este (7,0%). Esta observación respalda la hipótesis de que la introducción y prevalencia de los linajes 28/29_BF1 en Uruguay están influidas por la proximidad geográfica y las dinámicas de transmisión con el sur de Brasil, donde estos linajes tienen una alta prevalencia (Gräf et al., 2021).

Por otra parte, no se obtuvieron resultados significativos que permitan vincular estas FRCs con un grupo de riesgo ni una vía de transmisión particular. Tampoco se observó una correlación temporal significativa. Sin embargo, las pruebas Z permiten ver que este linaje se presenta con igual frecuencia en hombres y mujeres (representando el 48,8% en ambos casos) y que el 70,4% de las secuencias de este clado corresponden a transmisión HTX.

Subtipo C

Las FRCs 28_BF1 y 29_BF1 no son los únicos linajes del VIH-1 que probablemente fueron introducidos en Uruguay a través de la frontera con Brasil; de manera análoga, la introducción del subtipo C a Uruguay también podría haberse dado desde el sur de Brasil. Los hallazgos de Bello et al.,(2008) revelaron que la epidemia sudamericana asociada a este subtipo se originó en Brasil, como resultado de la introducción de una cepa fundadora estrechamente relacionada a las secuencias del subtipo C de Burundi, alrededor de 1980. Desde entonces, este linaje ha sido uno de los subtipos más relevantes desde el punto de vista epidemiológico en Brasil, donde su alta circulación en conjunto con el subtipo B ha dado lugar a varios recombinantes BC (Bello et al., 2008). El subtipo C presenta una mayor prevalencia particularmente en la región sur de Brasil, siendo los estados de Rio Grande do Sul (44,7%) y Santa Catarina (66,2%) los más afectados por este subtipo (Gräf et al., 2021). Esto adquiere relevancia dada la cercanía geográfica y el constante flujo de personas entre Brasil y Uruguay. En particular, Rio Grande do Sul comparte una frontera seca con Uruguay, mientras que Santa Catarina se posiciona como uno de los destinos turísticos más apreciados por los uruguayos durante los meses de verano.

Según lo calculado para el periodo 2007-2021, el subtipo C abarca el 3,1% de las secuencias de GENOUY-VIH. En particular, para el periodo 2007-2010, se evidencia que el subtipo C presentó una prevalencia del 1,2%, coincidiendo completamente con los datos proporcionados por el MSP para ese mismo periodo (Informe de la situación nacional de VIH/SIDA, 2011). En contraste con lo observado para el subtipo B, el subtipo C experimentó un aumento en su prevalencia, alcanzando un 3.1% durante el periodo 2011-2021. Este incremento se alinea con la tendencia ascendente constatada en la epidemia del subtipo C en el sur de Brasil a partir del año 2000 (Gräf et al., 2016; Mir et al., 2018). Aunque inicialmente se asoció el aumento de la prevalencia del subtipo C en el sur de Brasil con la expansión de este en el grupo HSH (Gräf et al., 2016), investigaciones posteriores indicaron que la expansión del subtipo C en el sur de Brasil no se limitaba exclusivamente a un grupo de riesgo específico (Mir et al., 2018). Según las pruebas Z realizadas en el presente trabajo, el 80% de las secuencias del subtipo C analizadas están asociadas con transmisión HTX, y su frecuencia no muestra diferencias significativas entre el género femenino (52,5%) y masculino (47,5%). Además, las secuencias pertenecientes a este linaje se encuentran prácticamente concentradas en la región Noreste (8,2%), lo que denota la relevancia de la movilidad de personas entre países en la circulación de variantes del VIH. Ante el evidente aumento de este subtipo en el sur de Brasil y su importancia en la región fronteriza de Uruguay con Brasil, es esencial persistir en la vigilancia molecular de su dinámica epidemiológica. Esto ayudará en el desarrollo de estrategias para gestionar eficazmente las posibles implicaciones derivadas del aumento de la prevalencia y diseminación de este linaje en nuestro país.

Linajes de menor prevalencia

De las secuencias analizadas de GENOUY-VIH, el 1,1% corresponde al recombinante 31_BC, un linaje con relevancia epidemiológica en Brasil (8,9%), especialmente en su región sur (Fritsch et al., 2018; Gräf et al., 2021). No sorprende que la región Noreste de Uruguay, colindante con Brasil, exhiba la mayor prevalencia de este linaje en nuestro país. Por otro lado, el sub-subtipo F1, de alta prevalencia (10,9%) y amplia distribución en Brasil, representa el 0,8% del total de secuencias caracterizadas de GENOUY-VIH y también muestra una presencia destacada en el noreste de Uruguay. La coexistencia de ambos linajes de importancia epidemiológica en Brasil en la región Noreste de Uruguay, refuerza la influencia de la proximidad geográfica y el movimiento de personas entre estos dos países en las dinámicas epidémicas virales.

En este estudio, también se identificaron los linajes 01_AE (0,2%) y 41_CD (0,1%). El primero tiene gran relevancia epidemiológica en África y Asia, mientras que la circulación del segundo se limita al continente africano (Hemelaar et al., 2021; Billings et al., 2017). Se sugiere que ambos linajes podrían haber llegado a Uruguay a través de introducciones vinculadas a la actividad militar en misiones de paz. El linaje 01_AE ha sido documentado en múltiples ocasiones en Uruguay, especialmente entre el personal militar de las Fuerzas Armadas y el Ejército, que participó en misiones de paz en Camboya (Artenstein et al., 1995; McCutchan et al., 1996). Por otro lado, la única secuencia de GENOUY-VIH caracterizada como 41_CD corresponde a una introducción desde la República Democrática del Congo (RDC). Es relevante señalar que el personal militar de Uruguay ha participado en misiones de paz establecidas por la ONU en diferentes países, como Camboya, Mozambique, Angola, Haití y la RDC, desde 1991 (Peppe & Paparamborda, 2011).

El sub-subtipo A1, que exhibe una diseminación predominante en regiones de África, Asia y Europa del Este (Tariq et al., 2022), constituye el 0,1% de las secuencias genómicas virales analizadas. La introducción de este linaje en Uruguay parece derivar de eventos esporádicos.

No hay literatura previa que documente la circulación de las formas recombinantes 17_BF1, 19_cpx, 24_BG, 46_BF1 y 60_BC en nuestro país. Estos linajes, con orígenes diversos, han sido identificados en diferentes regiones del mundo. Por ejemplo, el linaje 17_BF1, inicialmente encontrado en Argentina, ya ha sido documentado en países vecinos como Brasil, Bolivia y Paraguay (Aguayo et al., 2008; Guimarães et al., 2012). Tanto 19_cpx como 24_BG son prevalentes en el Caribe, especialmente en Cuba (Delatorre & Bello, 2013). En cuanto al linaje 46_BF1, la literatura existente es limitada, y su presencia se ha constatado únicamente en São Paulo, Brasil (Sanabani et al., 2006, 2010). Respecto al linaje 60_BC, originario de Italia, donde es una de las formas recombinantes más comunes (Simonetti et al., 2014; Lai et al., 2019), también ha sido identificado en Brasil (Reis et al., 2019). Se presume que el ingreso a Uruguay de estos linajes es esporádico y su caracterización subraya la influencia de la movilidad internacional como factor clave para el aumento de la diversidad del VIH en Uruguay.

6. Conclusiones

En este trabajo, se analizaron 1270 secuencias genéticas de VIH-1 a lo largo de 15 años en Uruguay. Se determinó que durante el periodo 2007-2021, los subtipos B y C, así como las FRCs 12_BF, 38_BF1 y 28/29_BF1 fueron los linajes prevalentes en nuestro país. También se identificó la presencia de linajes de baja prevalencia o introducción esporádica, como los sub-subtipos A1 y F1, así como las formas recombinantes 01_AE, 17_BF1, 19_cpx, 20_BG, 24_BG, 31_BC, 41_CD, 46_BF1 y 60_BC. Además, se caracterizó un nuevo linaje o posible familia de recombinantes del VIH-1, con alta prevalencia y ampliamente distribuido en el país, al que se denominó BF1.x y, cuya determinación final requerirá análisis adicionales mediante secuenciación de genoma completo.

El análisis conjunto de secuencias genéticas virales y datos epidemiológicos, no solo ha permitido la identificación y caracterización de los linajes circulantes, sino también el establecimiento de sus relaciones con variables clínicas y demográficas. Este enfoque integral enriquece la comprensión de la dinámica del VIH-1, brindando una visión detallada de las interacciones entre el virus y la población afectada.

A pesar de las fortalezas de la base de datos utilizada, que constituye el conjunto de datos moleculares de VIH más extenso analizado en nuestro país, es necesario interpretar los resultados obtenidos con precaución. En primer lugar, la cobertura de muestreo es un aspecto a considerar. Anualmente se registran en promedio 900 nuevos casos de VIH en nuestro país (Situación Epidemiológica de VIH/SIDA en Uruguay, 2022). En este contexto, la base de datos GENOUY-VIH ofrece una cobertura de muestreo de aproximadamente el 10% de los nuevos casos para el periodo de 15 años considerado. Esta proporción ofrece una representación considerable de la población afectada en dicho periodo, aunque es fundamental reconocer que la cobertura de muestreo en la región Centro del país es particularmente deficiente. Esta limitación sugiere que la situación epidemiológica del VIH-1 en esta región puede no estar adecuadamente reflejada en los resultados obtenidos.

En segundo lugar, dado que la población muestreada comprende individuos en fallo virológico, las prevalencias y tendencias observadas en este estudio probablemente reflejan eventos de transmisión que ocurrieron algunos años antes de la fecha de muestreo. En consecuencia, la prevalencia real de los linajes caracterizados podría ser tanto menor (subtipo B) como mayor (recombinantes B) de lo que sugieren las estimaciones obtenidas.

Por último, es necesario tener en cuenta que tanto las secuencias genéticas como los datos epidemiológicos fueron originalmente recopilados en el marco de estudios de resistencia genotípica a ARVs. Dado que, los estudios de genotipificación sólo requieren secuenciar un fragmento que corresponde al 10% del genoma viral, la caracterización se ve limitada. En caso de que haya eventos de recombinación en el otro 90% del genoma, estos no serían detectados, lo que podría subestimar el número de secuencias recombinantes y la diversidad inferida.

Por lo anterior, para los objetivos de la vigilancia genómica, es crucial atender dos aspectos fundamentales: optimizar la recopilación de datos y realizar el análisis de genomas virales completos. En cuanto a la recopilación de datos, el formulario adjunto a las muestras para el genotipado de resistencia presenta desafíos, ya que algunas variables no son siempre completadas por los médicos y otras no están claramente definidas. La falta de datos en ciertas variables dificulta los análisis estadísticos, y la variable "género" no diferencia entre el género asignado al nacer y el tipo de identidad de género. En la configuración actual de la base de datos GENOUY-VIH, la categoría "Trans" puede abarcar a individuos de diversos géneros y tipos de identidad de género. Sería apropiado considerar la posibilidad de revisar y ajustar el formulario para reflejar con mayor precisión la diversidad de identidades de género presentes en la población. Además, la realización de análisis de genomas virales completos se vuelve imperativa en la lucha contra la pandemia del VIH, en respuesta al incremento alarmante y la rápida diseminación a nivel mundial de cepas recombinantes. El aumento de la diversidad genética de la pandemia tiene implicaciones significativas que pueden afectar diversos aspectos, como la resistencia a los fármacos y la precisión diagnóstica de ensayos serológicos y moleculares. Así, la necesidad de un seguimiento continuo de la epidemiología molecular del VIH a través de la secuenciación de genomas completos, se presenta como una herramienta clave para el diseño de tratamientos adaptados a la realidad epidemiológica del país y el control del VIH en la población uruguaya.

En síntesis, las secuencias genéticas y los datos resultantes del genotipado de resistencia, aunque presentan limitaciones, constituyen un recurso rentable con potencial significativo para identificar características clave de la epidemia de VIH. La vigilancia genómica, proporciona valiosa información, y su consideración adecuada, podría contribuir de manera significativa a la optimización de la vigilancia sanitaria del VIH en nuestro país.

7. Perspectivas

La caracterización molecular es tan solo el primer paso para llevar a cabo la vigilancia genómica como estrategia de prevención y control del VIH en nuestro país. Los resultados obtenidos en este trabajo serán la base para caracterizar las redes de transmisión de los linajes de mayor relevancia, como son el subtipo B y las FRCs 12_BF y 38_BF1 a partir de un abordaje filodinámico.

Además, se espera poder dilucidar si las cepas que integran BF1.x pertenecen a una "familia de recombinantes" B/F1-like, o representan una forma recombinante no descrita previamente. Actualmente se está trabajando en la optimización de un protocolo de secuenciación con el objetivo de obtener el genoma completo de las mismas.

8. Referencias bibliográficas

Abecasis, A., & Vandamme, A.M. (2015). Origin and Distribution of HIV-1 Subtypes. In *Encyclopedia of AIDS* (pp. 1–16). Springer New York. doi:10.1007/978-1-4614-9610-6_130-2

Abecasis, A. B., Wensing, A. M., Paraskevis, D., Vercauteren, J., Theys, K., Amc Van De Vijver, D., Albert, J., Asjö, B., Balotta, C., Beshkov, D., Camacho, R. J., Clotet, B., de Gascun, C., Griskevicius, A., Grossman, Z., Hamouda, O., Horban, A., Kolupajeva, T., Korn, K., Vandamme, A.M. (2013). HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*, 10(7). doi:10.1186/1742-4690-10-7

Aguayo, N., Alberto Laguna-Torres, V., Villafane, M., Barboza, A., Sosa, L., Chauca, G., Carrion, G., Coenca, B., Perez, J., Galeano, A., Bautista, C. T., Sanchez, J. L., Carr, J. K., & Kochel, T. (2008). Epidemiological and molecular characteristics of HIV-1 infection among female commercial sex workers, men who have sex with men and people living with AIDS in Paraguay. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropicale*, 41(3), 225–231. doi:10.1590/s0037-86822008000300001

Alemán, Y., Vinken, L., Kourí, V., Pérez, L., Álvarez, A., Abrahantes, Y., Fonseca, C., Pérez, J., Correa, C., Soto, Y., Schrooten, Y., Vandamme, A. M., & van Laethem, K. (2015). Performance of an in-house human immunodeficiency virus type 1 genotyping system for assessment of drug resistance in Cuba. *PLoS ONE*, 10(2). doi:10.1371/journal.pone.0117176

Artenstein, A. W., Coppola, J., Brown, A. E., Carr, J. K., Sanders-Buell, E., Galbarini, E., Mascola, J. R., VanCott, T. C., Schonbrood, P., McCutchan, F. E., & Burke, D. S. (1995).

Multiple introductions of HIV-1 subtype E into the western hemisphere. *The Lancet*, 346, 1197–1198. doi:10.1016/s0140-6736(95)92900-2

Aulicino, P. C., Gómez-Carrillo, M., Bello, G., Rocco, C., Mangano, A., Carr, J., Sen, L., & Foley, B. (2012). Characterization of full-length HIV-1 CRF17_BF genomes and comparison to the prototype CRF12_BF strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 443–447. doi:10.1016/j.meegid.2012.01.003

Ávila, M. M., Pando, M. A., Carrion, G., Martinez Peralta, L., Salomon, H., Gomez-Carrillo, M., Sanchez, J., Maulen, S., Hierholzer, J., Marinello, M., Negrete, M., Rusull, K. L., & Carr, J. K. (2002). Two HIV-1 Epidemics in Argentina: Different Genetic Subtypes Associated With Different Risk Groups. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 29, 422–426. doi:10.1097/00126334-200204010-00015

Ayouba, A., Akoua-Koffi, C., Calvignac-Spencer, S., Esteban, A., Locatelli, S., Li, H., Li, Y., Hahn, B. H., Delaporte, E., Leendertz, F. H., & Peeters, M. (2013). Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: Characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. *AIDS*, 27(15), 2488–2491. doi:10.1097/01.aids.0000432443.22684.50

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*, 220 (4599), 868–871. doi:10.1126/science.6189183

Bbosa, N., Kaleebu, P., & Ssemwanga, D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. In *Current Opinion in HIV and AIDS* (Vol. 14, Issue 3, pp. 153–160). Lippincott Williams and Wilkins. doi:10.1097/COH.0000000000000534

Bello, G., Passaes, C. P. B., Guimarães, M. L., Lorete, R. S., Almeida, S. E. M., Medeiros, R. M., Alencastro, P. R., & Morgado, M. G. (2008). Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS*, 22(15), 1993–2000. doi:10.1097/QAD.0b013e328315e0aa

Bello, G., Aulicino, P. C., Ruchansky, D., Guimarães, M. L., Lopez-Galindez, C., Casado, C., Chiparelli, H., Rocco, C., Mangano, A., Sen, L., & Morgado, M. G. (2010). Phylodynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology*, 7(22). doi:10.1186/1742-4690-7-22

Billings, E., Sanders-Buell, E., Bose, M., Kijak, G. H., Bradfield, A., Crossler, J., Arroyo, M. A., Maboko, L., Hoffmann, O., Geis, S., Birx, D. L., Kim, J. H., Michael, N. L., Robb, M. L., Hoelscher, M., & Tovanabuttra, S. (2017). HIV-1 Genetic Diversity Among Incident Infections in Mbeya, Tanzania. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 33(4), 373–381. doi:10.1089/aid.2016.0111

Carballal, G. & Oubiña, J. (2001). *Virología médica*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires., Argentina: *El Ateneo*.

Carr, J. K., Avila, M., Gomez-Carrillo, M., Salomon, H., Hierholzer, J., Watanaveeradej, V., Pando, M. A., Negrete, M., Russell, K. L., Sanchez, J., Birx, D. L., Andrade, R., Vinales, J., & McCutchan, F. E. (2001). Diverse BF recombinants have spread widely since the

introduction of HIV-1 into South America. *AIDS*, 15, 41–47. doi:10.1097/00002030-200110190-00002

Coffin, J., Blomberg, J., Fan, H., Gifford, R., Hatziioannou, T., Lindemann, D., Mayer, J., Stoye, J., Tristem, M., & Johnson, W. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. *Journal of General Virology*, 102(12). doi:10.1099/JGV.0.001712

Conferencia Internacional sobre el SIDA, (2016). Organización de las Naciones Unidas.

D'Arc, M., Ayoub, A., Esteban, A., Learn, G. H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F. H., Boesch, C., Madinda, N. F., Robbins, M. M., Gray, M., Cournil, A., Ooms, M., Letko, M., Simon, V. A., Sharp, P. M., Hahn, B. H., ... Peeters, M. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), E1343–E1352. doi:10.1073/pnas.1502022112

de Azevedo, S. S. D., Caetano, D. G., Côrtes, F. H., Teixeira, S. L. M., Santos Silva, K., Hoagland, B., Grinsztejn, B., Veloso, V. G., Morgado, M. G., & Bello, G. (2017). Highly divergent patterns of genetic diversity and evolution in proviral quasispecies from HIV controllers. *Retrovirology*, 14(1).doi:10.1186/s12977-017-0354-5

de Mendoza, C., Ramos, J. M., Caballero, E., & Soriano, V. (2021). Current epidemiological status of HIV-2 and HTLV-1 infection in Spain. *Medicina Clinica*, 156(6), 290–296. doi:10.1016/j.medcli.2020.05.029

de Sá Filho, D. J., Sucupira, M. C., Caseiro, M. M., Sabino, E. C., Sobhie Diaz, R., & Mario Janini, L. (2006). Identification of Two HIV Type 1 Circulating Recombinant Forms in Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 22(1), 1–13. doi:10.1089/aid.2006.22.1

Delatorre, E., & Bello, G. (2013). Phylodynamics of the HIV-1 Epidemic in Cuba. *PLoS ONE*, 8(9). doi:10.1371/journal.pone.0072448

Dilernia, D. A., Jones, L. R., Pando, M. A., Rabinovich, R. D., Damilano, G. D., Turk, G., Rubio, A. E., Pampuro, S., Gomez-Carrillo, M., & Salomón, H. (2011). Analysis of HIV type 1 BF recombinant sequences from South America dates the origin of CRF12-BF to a recombination event in the 1970s. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 27(5), 569–578. doi:10.1089/aid.2010.0118

Dirección General de la Salud - División Epidemiología (Programa ITS/Sida- DEVISA - DLSP) (2011). Informe de la situación nacional de VIH/Sida.

Dirección General de la Salud - División Epidemiología (Programa ITS/Sida- DEVISA - DLSP) (2022). Situación epidemiológica del VIH/SIDA en Uruguay.

Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Martin-Hernández, A. M., Sáiz, J. C., & Escarmis, C. (1998). Quasispecies Structure and Persistence of RNA Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 521–527. Dunn, D. (2014). The increasing genetic diversity of HIV-1 in the UK, 2002-2010. *AIDS*, 28(5), 773–780. doi:10.1097/QAD.000000000000119

Flieller, R., & Cabrera, S. (2019). Virus de inmunodeficiencia humana y resistencia a antirretrovirales Virus de inmunodeficiencia humana y resistencia a antirretrovirales.

- Flieller, R., Cabrera, S., Ruchansky, D., Girón-Callejas, A., Brasesco, M., Pérez, D., Chiparelli, H., García-Morales, C., Tapia-Trejo, D., Monreal-Flores, J., Ravasi, G., Jordan, M. R., & Ávila-Ríos, S. (2023). HIV Drug Resistance in Adults Initiating or Reinitiating Antiretroviral Therapy in Uruguay—Results of a Nationally Representative Survey, 2018–2019. *Viruses*, 15(2).doi:10.3390/v15020490
- Foley, B. T., Leitner, T., Paraskevis, D., & Peeters, M. (2016). Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 150–158. doi:10.1016/j.meegid.2016.10.018
- Fritsch, H. M., Almeida, S. E. M., Pinto, A. R., & Gräf, T. (2018). Spatiotemporal and demographic history of the HIV-1 circulating recombinant form CRF31_BC in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 61, 113–118. doi:10.1016/j.meegid.2018.03.024
- Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G., Hui, H., Craig, S., Decker, J., Fultz, P. N., Girard, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H., & Sharp, P. M. (1996). The Heterosexual HumFan Immunodeficiency Virus Type 1 Epidemic in Thailand Is Caused by an Intersubtype (A/E) Recombinant of African Origin. *Journal of Virology* (Vol. 70, Issue 10). doi:10.1038/17130
- Gartner, M. J., Roche, M., Churchill, M. J., Gorry, P. R., & Flynn, J. K. (2020). Understanding the mechanisms driving the spread of subtype C HIV-1. *EBioMedicine* (Vol. 53). doi:10.1016/j.ebiom.2020.102682
- Gilbert, M. T., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T. J., Pitchenik, A. E., & Worobey, M. (2007). The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *PNAS*, 104(47), 18566–18570. doi:10.1073/pnas.0705329104
- Gomez-Carrillo, M., Pampuro, S., Duran, A., Losso, M., Harris, D. R., Read, J. S., Duarte, G., de Souza, R., Soto-Ramirez, L., & Salomón, H. (2006). Analysis of HIV Type 1 Diversity in Pregnant Women from Four Latin American and Caribbean Countries. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 22(11), 1186–1191. doi:10.1089/aid.2006.22.1186
- González-Alba, J. M., Holguín, Á., Garcia, R., García-Bujalance, S., Alonso, R., Suárez, A., Delgado, R., Cardeñoso, L., González, R., García-Bermejo, I., Portero, F., de Mendoza, C., González-Candelas, F., & Galán, J.-C. (2011). Molecular Surveillance of HIV-1 in Madrid, Spain: a Phylogeographic Analysis. *Journal of Virology*, 85(20), 10755–10763. doi:10.1128/jvi.00454-11
- Gräf, T., Machado Fritsch, H., de Medeiros, R. M., Maletich Junqueira, D., Esteves de Matos Almeida, S., & Pinto, A. R. (2016). Comprehensive Characterization of HIV-1 Molecular Epidemiology and Demographic History in the Brazilian Region Most Heavily Affected by AIDS. *Journal of Virology*, 90(18), 8160–8168. doi:10.1128/jvi.00363-16
- Gräf, T., Bello, G., Andrade, P., Arantes, I., Pereira, J. M., da Silva, A. B. P., Veiga, R. v., Mariani, D., Boullosa, L. T., Arruda, M. B., Fernandez, J. C. C., Dennis, A. M., Rasmussen, D. A., & Tanuri, A. (2021). HIV-1 molecular diversity in Brazil unveiled by 10 years of sampling by the national genotyping network. *Scientific Reports*, 11(1). doi:10.1038/s41598-021-94542-5

Guimarães, M. L., Eyer-Silva, W. A., Couto-Fernandez, J. C., & Morgado, M. G. (2008). Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS*, 22, 433–438. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f47ad0

Guimarães, M. L., Velarde-Dunois, K. G., Segurondo, D., & Morgado, M. G. (2012). The HIV-1 epidemic in Bolivia is dominated by subtype B and CRF12-BF “family” strains. *Virology Journal*, 9. doi:10.1186/1743-422X-9-19

Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., & Osmanov, S. (2011). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS*, 25(5), 679–689. doi:10.1097/QAD.0b013e328342ff93

Hemelaar, J., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Fleminger, I., Kirtley, S., Williams, B., Gouws-Williams, E., Ghys, P. D., Abimiku, A. G., Agwale, S., Archibald, C., Avidor, B., Barbás, M. G., Barre-Sinoussi, F., Barugahare, B., Belabbes, E. H., Bertagnolio, S., Bix, D., Zhang, R. (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. doi:10.1016/S1473-3099(18)30647-9

Hemelaar, J., Loganathan, S., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., & Kirtley, S. (2021). Country Level Diversity of the HIV-1 Pandemic between 1990 and 2015 WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. *Journal of Virology*, 95(2). doi:10.1128/JVI.01580-20

Human immunodeficiency virus 1 (2022), ViralZone. <https://viralzone.expasy.org/7>

Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 20(4), 1160–1166. doi:10.1093/nar/gkf436

Kijak, G. H., & McCutchan, F. E. (2005). HIV Diversity, Molecular Epidemiology, and the Role of Recombination. *Current Infectious Disease Reports*, 7, 480–488. doi:10.1007/s11908-005-0051-8

Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2013). *FIELDS VIROLOGY* (J. I. Cohen, D. E. Griffin, Lamb Robert A., M. A. Martin, V. R. Racaniello, & B. Roizman, Eds.; 6th ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS

Lai, A., Simonetti, F. R., Brindicci, G., Bergna, A., di Giambenedetto, S., Sterrantino, G., Mussini, C., Menzo, S., Bagnarelli, P., Zazzi, M., Angarano, G., Galli, M., Monno, L., & Balotta, C. (2019). Local epidemics gone viral: Evolution and diffusion of the Italian HIV-1 recombinant form CRF60_BC. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). doi:10.3389/fmicb.2019.00769

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1695–1701. doi:10.1093/molbev/mss020 1.

Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278. doi:10.1093/bioinformatics/btu531

Le Vu, S., Ratmann, O., Delpech, V., Brown, A. E., Gill, O. N., Tostevin, A., Dunn, D., Fraser, C., & Volz, E. M. (2019). HIV-1 Transmission Patterns in Men Who Have Sex with Men: Insights from Genetic Source Attribution Analysis. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 35(9), 805–813. doi:10.1089/aid.2018.0236

Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W., & Ray, S. C. (1999). Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. In *JOURNAL OF VIROLOGY*, 73(1). doi:10.1128/JVI.73.1.152-160.1999

Los Alamos HIV database. <https://www.hiv.lanl.gov>

McCutchan, F. E., Artenstein, A. W., Sanders-buell, E., Salminen, M. O., Carr, J. K., Mascola, J. R., Nelson, K. E., Khamboonruang, C., Schmitt, D., Kieny, M. P., Mcneil, J. G., Burke, D. S., & Jackson Foundation, H. M. (1996). Diversity of the Envelope Glycoprotein among Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates of Clade E from Asia and Africa. *Journal of Virology*, 70 (6). doi:10.1128/JVI.70.6.3331-3338.1996

Mir, D., Cabello, M., Romero, H., & Bello, G. (2015). Phylodynamics of major HIV-1 subtype B pandemic clades circulating in Latin America. *AIDS*, 29(14), 1863–1869. doi:10.1097/QAD.0000000000000770

Mir, D., Gräf, T., Esteves De Matos Almeida, S., Pinto, A. R., Delatorre, E., & Bello, G. (2018). Inferring population dynamics of HIV-1 subtype C epidemics in Eastern Africa and Southern Brazil applying different Bayesian phylodynamics approaches. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-26824-4

Morrondo, N., Blanco, D., Álvarez, P., & Okatsu, T. (2005). El papel de la recombinación genética en el desarrollo de la pandemia del SIDA. In *Investig. Clín. Farm* (Vol. 2, Issue 1).

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. doi:10.1093/molbev/msu300

Moutouh, L., Corbeil, J., & Richman, D. D. (1996). Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Medical Sciences*, 93, 6106–6111. doi:10.1073/pnas.93.12.6106

Nora, T., Charpentier, C., Tenailon, O., Hoede, C., Clavel, F., & Hance, A. J. (2007). Contribution of Recombination to the Evolution of Human Immunodeficiency Viruses Expressing Resistance to Antiretroviral Treatment. *Journal of Virology*, 81(14), 7620–7628. doi:10.1128/jvi.00083-07

Onafuwa-Nuga, A., & Telesnitsky, A. (2009). The Remarkable Frequency of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genetic Recombination. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3), 451–480. doi:10.1128/mmbr.00012-09

ONUSIDA (2021). <http://aidsinfo.unaids.org/>

- Patinõ-Galindo, J. A., Torres-Puente, M., Bracho, M. A., Alastrué, I., Juan, A., Navarro, D., Galindo, M. J., Ocete, D., Ortega, E., Gimeno, C., Belda, J., Domínguez, V., Moreno, R., & González-Candelas, F. (2017). The molecular epidemiology of HIV-1 in the Comunidad Valenciana (Spain): Analysis of transmission clusters. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-10286-1
- Peppe, C., & Paparamborda, M. (2011). Prevalencia de la infección por VIH entre militares integrantes de Misiones de Paz. *REV Int Serv Santé Forces Armées*, 84(1), 73–77. doi:10.35954/sm2011.30.1.7
- Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., de Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L., & Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), 871–872. doi:10.1038/nm.2016
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2009). Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 26(7), 1641–1650. doi:10.1093/molbev/msp077
- Pyne, M. T., Hackett, J., Holzmayer, V., & Hillyard, D. R. (2013). Large-scale analysis of the prevalence and geographic distribution of HIV-1 non-B variants in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(8), 2662–2669. doi:10.1128/JCM.00880-13
- Ramos, L. G. F., Escoto Delgadillo, M., & Vázquez Valls, E. (2008). Evolución del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1): Mutaciones Reverberantes en el gen de la Transcriptasa Reversa. *Avances de La Investigación Científica En El CUCBA*.
- Rangel, Héctor R, Garzaro, Domingo, & Pujol, Flor H. (2009). Diversidad genética del virus de inmunodeficiencia humana en las américas, con énfasis en la epidemia venezolana. *Interciencia*, 34(3), 163-169. Recuperado en 8 de enero de 2024, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009000300005&lng=es&lng=es.
- Reeves, J. D., & Doms, R. W. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *Journal of General Virology*, 83, 1253–1265. doi:10.1099/0022-1317-83-6-1253
- Reis, M. N. G., Guimarães, M. L., Bello, G., & Stefani, M. M. A. (2019). Identification of new HIV-1 circulating recombinant forms CRF81-cpx and CRF99-BF1 in central Western Brazil and of unique BF1 recombinant forms. *Frontiers in Microbiology*, 10(97). doi:10.3389/fmicb.2019.00097
- Rios, M., Fernandez, J., Jaramillo, P., Paredes, V., Sanchez, J. L., Laguna-Torres, V. A., Carr, J. K., & Ramirez, E. (2005). Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Chile: Differential Geographic and Transmission Route Distribution of B and F Subtypes. In *AIDS Research and Human Retroviruses*, 21(10). doi:10.1089/aid.2005.21.835
- Rosas, N., Hernandez, P., Najar, I., Guzman, C., & Castañeda, D. (2013). Características estructurales y funcionales del Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 33(4), 163–173.

- Ruchansky, D., Casado, C., Russi, J. C., & Lopez Galindez, C. (2007). Identification of a new BF recombinant form with a major circulation in Uruguay.
- Ruchansky, D., Casado, C., Russi, J. C., Arbiza, J. R., & Lopez-Galindez, C. (2009). Identification of a new HIV Type 1 Circulating Recombinant Form (CRF38_BF1) in Uruguay. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 25(3), 352–356. doi:10.1089/aid.2008.0248
- Sanabani, S., Neto, W. K., Kalmar, E. M. N., Diaz, R. S., Janini, L. M., & Sabino, E. C. (2006). Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 6(5), 368–377. doi:10.1016/j.meegid.2006.01.003
- Sanabani, S. S., de Souza Pastena, Év. R., Neto, W. K., Martinez, V. P., & Sabino, E. C. (2010). Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *Virology Journal*, 7. doi:10.1186/1743-422X-7-74
- Sanjuán, R., Lázaro, E., & Vignuzzi, M. (2012). Biomedical implications of viral mutation and evolution. In *Future Virology* (Vol. 7, Issue 4, pp. 391–402). doi:10.2217/fvl.12.19
- Santos, A., Sousa, T., Soares, E., Sanabani, S., Martinez, A., Sprinz, E., Silveira, J., Sabino E., Tanuri, A., Soares, M. (2006) Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS*. 24;20(16), 2011-2019. doi: 10.1097/01.aids.0000247573.95880.db
- Schneider, W. L., & Roossinck, M. J. (2001). Genetic Diversity in RNA Virus Quasispecies Is Controlled by Host-Virus Interactions. *Journal of Virology*, 75(14), 6566–6571. doi:10.1128/jvi.75.14.6566-6571.2001
- Sides, T. L., Akinsete, O., Henry, K., Wotton, J. T., Carr, P. W., & Bartkus, J. (2004). *HIV-1 Subtype Diversity in Minnesota*. doi:10.1086/430322
- Seitz, R. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203–222. doi:10.1159/000445852
- Shiino, T., Hachiya, A., Hattori, J., Sugiura, W., & Yoshimura, K. (2020). Nation-Wide Viral Sequence Analysis of HIV-1 Subtype B Epidemic in 2003–2012 Revealed a Contribution of Men Who Have Sex With Men to the Transmission Cluster Formation and Growth in Japan. *Frontiers in Reproductive Health*, 2. doi:10.3389/frph.2020.531212
- Siepel A, Halpern A, Macken C, & Korber B. (1995). A Computer Program Designed to Screen Rapidly for HIV Type 1 Intersubtype Recombinant Sequences. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 11(11). doi:10.1089/aid.1995.11.1413
- Simonetti, F. R., Lai, A., Monno, L., Binda, F., Brindicci, G., Punzi, G., Bozzi, G., Violin, M., Galli, M., Zazzi, M., Angarano, G., & Balotta, C. (2014). Identification of a new HIV-1 BC circulating recombinant form (CRF60_BC) in Italian young men having sex with men. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 176–181. doi:10.1016/j.meegid.2014.02.007

- Struck, D., Lawyer, G., Ternes, A. M., Schmit, J. C., & Bercoff, D. P. (2014). COMET: Adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic Acids Research*, 42(18). doi:10.1093/nar/gku739
- Takebe, Y., Naito, Y., Raghwani, J., Fearnhill, E., Sano, T., Kusagawa, S., Mbisa, J. L., Zhang, H., Matano, T., Leigh Brown, A. J., Pybus, O. G., Dunn, D., & Kondo, M. (2014). Intercontinental Dispersal of HIV-1 Subtype B Associated with Transmission among Men Who Have Sex with Men in Japan. *Journal of Virology*, 88(17), 9864–9876. doi:10.1128/jvi.01354-14
- Tariq, U., Nazziwa, J., Sasinovich, S., Shah, S. A., Naeem, S., Abidi, S. H., & Esbjörnsson, J. (2022). Phylogenetic Characterization of HIV-1 Sub-Subtype A1 in Karachi, Pakistan. *Viruses*, 14(10). doi:10.3390/v14102307
- Taylor, B. S., Sobieszczyk, 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. doi:10.1056/nejmra0706737
- Thomson, M. M., Delgado, E., Herrero, I., Villahermosa, L., Va, E., Parga, zquez-de, Cuevas, T., Medrano, L., Cuevas, L., & Na, R. (2002). Printed in Great Britain Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. In *Journal of General Virology* (Vol. 83). doi:10.1099/0022-1317-83-1-107
- Vilsker, M., Moosa, Y., Nooij, S., Fonseca, V., Ghysens, Y., Dumon, K., Pauwels, R., Alcantara, L. C., vanden Eynden, E., Vandamme, A. M., Deforche, K., & de Oliveira, T. (2019). Genome Detective: An automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 35(5), 871–873. doi:10.1093/bioinformatics/bty695
- Visseaux, B., le Hingrat, Q., Damond, F., Charpentier, C., & Descamps, D. (2019). Physiopathology of HIV-2 infection. *Virologie*, 23(5), 277–291. doi:10.1684/vir.2019.0789
- Yamaguchi, J., Vallari, A., McArthur, C., Sthreshley, L., Cloherty, G. A., Berg, M. G., & Rodgers, M. A. (2019). *Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L*. 83(3), 319–322. doi:10.1097/QAI.0000000000002246
- Zhang, M., Zhang, A., Schultz, A. K., Calef, C., Kuiken, C., Leitner, T., Korber, B., Morgenstern, B., & Stanke, M. (2006). jpHMM at GOBICS: A web server to detect genomic recombinations in HIV-1. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), 463–465. doi:10.1093/nar/gkl255

9. Anexo

TABLA 1. Regiones: Linajes más frecuentes y “Otros”

Regiones	Linajes							Total
	B (%)	C (%)	12_BF (%)	28/29_BF1 (%)	38_BF1 (%)	BF1.x (%)	Otros (%)	
OESTE	21 (29,6)	1 (1,4)	37 (52,1)	0	7 (9,9)	2 (2,8)	3 (4,2)	71
NORESTE	29 (39,7)	6 (8,2)	11 (15,1)	2 (2,7)	6 (8,2)	4 (5,5)	15 (20,6)	73
OESTE	21 (29,6)	1 (1,4)	37 (52,1)	0	7 (9,9)	2 (2,8)	3 (4,2)	71
METROPOLITANA	228 (39,0)	13 (2,2)	161 (27,6)	23 (3,9)	88 (15,1)	52 (8,9)	19 (3,3)	584
OESTE	21 (29,6)	1 (1,4)	37 (52,1)	0	7 (9,9)	2 (2,8)	3 (4,2)	71
ESTE	13 (30,2)	1 (2,3)	14 (32,6)	3 (7,0)	5 (11,6)	2 (4,7)	5 (11,6)	43
OESTE	21 (29,6)	1 (1,4)	37 (52,1)	0	7 (9,9)	2 (2,8)	3 (4,2)	71
CENTRO	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	0	1 (16,7)	1 (16,7)	0	6
NORESTE	29 (39,7)	6 (8,2)	11 (15,1)	2 (2,7)	6 (8,2)	4 (5,5)	15 (20,6)	73
METROPOLITANA	228 (39,0)	13 (2,2)	161 (27,6)	23 (3,9)	88 (15,1)	52 (8,9)	19 (3,3)	584
NORESTE	29 (39,7)	6 (8,2)	11 (15,1)	2 (2,7)	6 (8,2)	4 (5,5)	15 (20,6)	73
ESTE	13 (30,2)	1 (2,3)	14 (32,6)	3 (7,0)	5 (11,6)	2 (4,7)	5 (11,6)	43
NORESTE	29 (39,7)	6 (8,2)	11 (15,1)	2 (2,7)	6 (8,2)	4 (5,5)	15 (20,6)	73
CENTRO	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	0	1 (16,7)	1 (16,7)	0	6
METROPOLITANA	228 (39,0)	13 (2,2)	161 (27,6)	23 (3,9)	88 (15,1)	52 (8,9)	19 (3,3)	584
ESTE	13 (30,2)	1 (2,3)	14 (32,6)	3 (7,0)	5 (11,6)	2 (4,7)	5 (11,6)	43
METROPOLITANA	228 (39,0)	13 (2,2)	161 (27,6)	23 (3,9)	88 (15,1)	52 (8,9)	19 (3,3)	584
CENTRO	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	0	1 (16,7)	1 (16,7)	0	6
ESTE	13 (30,2)	1 (2,3)	14 (32,6)	3 (7,0)	5 (11,6)	2 (4,7)	5 (11,6)	43
CENTRO	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	0	1 (16,7)	1 (16,7)	0	6

TABLA 2. Género: Linaje vs Resto

Linaje	N (%)			Total	p-valor*
	Masculino	Femenino	Transgénero		
Resto (Todos menos 12_BF)	523 (58,2)	366 (40,8)	9 (1,0)	898	0.005
12_BF	171 (51,5)	150 (45,2)	11 (3,3)	332	
Resto (Todos menos 28/29_BF1)	673 (56,7)	495 (41,7)	19 (1,6)	1187	0.378
28/29_BF1	21 (48,8)	21 (48,8)	1 (2,3)	43	
Resto (Todos menos 38_BF1)	619 (57,7)	435 (40,6)	18 (1,7)	1072	0.036
38_BF1	75 (47,5)	81 (51,3)	2 (1,3)	158	
Resto (Todos menos B)	372 (50,5)	348 (47,3)	16 (2,2)	736	0.000
B	322 (65,2)	168 (34,0)	4 (0,8)	494	
Resto (Todos menos BF1.x)	648 (57,3)	465 (41,1)	18 (1,6)	1131	0.083
BF1.x	46 (46,5)	51 (51,5)	2 (2,0)	99	
Resto (Todos menos C)	675 (56,7)	495 (41,6)	20 (1,7)	1190	0.380
C	19 (47,5)	21 (52,5)	0	40	

*Test de Fisher

TABLA 3. Vía de Transmisión: Linaje vs Resto

Linaje	N (%)			Total	p-valor*
	HTX	HSH	Drogas		
Resto (Todos menos 12_BF)	447 (71,5)	151 (24,2)	27 (4,3)	625	0.777
12_BF	169 (73,8)	50 (21,8)	10 (4,4)	229	
Resto (Todos menos 28/29_BF1)	597 (72,2)	194 (23,5)	36 (4,3)	827	0.932
28/29_BF1	19 (70,4)	7 (25,9)	1 (3,7)	27	
Resto (Todos menos 38_BF1)	532 (71,7)	187 (25,2)	23 (3,1)	742	0.000
38_BF1	84 (75,0)	14 (12,5)	14 (12,5)	112	
Resto (Todos menos B)	393 (76,2)	96 (18,6)	27 (5,2)	516	0.000
B	223 (66,0)	105 (31,1)	10 (3,0)	338	
Resto (Todos menos BF1.x)	553 (70,8)	193 (24,7)	35 (4,5)	781	0.013
BF1.x	63 (86,3)	8 (11,0)	2 (2,7)	73	
Resto (Todos menos C)	595 (71,9)	196 (23,7)	37 (4,5)	828	0.693
C	21 (80,8)	5 (19,2)	0	26	

*Test de Fisher

FIGURA 1. Tendencia temporal por trienios. Para el subtipo C y linajes BF1 más frecuentes. Se muestra la proporción de secuencias por trienio en el periodo 2007-2021.

