

Recombinación Intersubtipo del VIH-1 en Individuos de la Región Occidente de México.

^{1,3}Eduardo Vázquez Valls, ²Blanca M Torres Mendoza, ³Liliana Gómez Flores Ramos, ³Liliana Flores Romero, ³Martha Escoto Delgadillo.

¹Hospital de Especialidades CMNO, Instituto Mexicano del Seguro Social; ²Centro Universitario de Ciencias de la Salud, U de G; ³Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, U de G. Correo electrónico: labvih@hotmail.com

Introducción

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) identificado en los años 80, ha fundamentado su diseminación global en linajes de VIH independientes debido a diversos factores, entre otros a la capacidad de variar su secuencia genética mientras retiene sus funciones vitales, a pesar de presentar diferencias de más del 35% en la posición de los aminoácidos. Esta amplia variabilidad del VIH tiene impacto potencial sobre su epidemiología, prevención, diagnóstico y tratamiento (Brumme y cols. 2004; Butler y cols. 2007).

La heterogeneidad genética de las cepas de VIH es una de las mayores características del virus y de la epidemia. Esta diversidad, generada por el proceso de mutación y recombinación, ha llevado al desarrollo de la nomenclatura de los subtipos para la clasificación de las cepas (McCutchan, 2006).

La filogenia del VIH ha sido compilada desde 1986, por el Laboratorio Nacional de los Álamos, del Instituto Nacional de Salud de EUA, (Los Alamos National Laboratory, 2008), donde el análisis filogenético de numerosas cepas provenientes de las diversas regiones geográficas del mundo, ha revelado que el VIH se puede clasificar en 2 tipos: VIH-1 y VIH-2 (Roquebert y cols. 2008).

El VIH-1 se clasifica en grupos (M, N, O), subtipos (A-D, F-H, J y K), sub-subtipos (A1, A2, etc.) y formas recombinantes circulantes (FCR01- FCR43) (Butler y cols. 2007; Los Alamos National Laboratory, CRFs, 2008). El VIH-2 se divide solamente en grupos A-D, F y G Los Alamos National Laboratory, CRFs, 2008; Lal y cols. 2005).

La variabilidad genética es el resultado de dos factores: primero, la transmisión de múltiples virus genéticamente diversos del simio al humano. Segundo, la alta tasa de error que tiene la enzima transcriptasa reversa del VIH, además de la ausencia de actividad de exonucleasa (proofreading), que favorece desde la transmisión del virus del simio al humano, exista una rápida acumulación de mutaciones que generan una gran diversidad genética (Ramírez y cols. 2008; Tebit y cols. 2007).

Otros factores que contribuyen a la rápida diversificación genética incluyen: la velocidad de replicación de cada subtipo viral, el número de mutaciones que se dan en cada ciclo de replicación, la propensión a la recombinación genómica y la capacidad viral (Spira y cols. 2003).

El principal mecanismo de variación en el VIH es la recombinación genética y para que ésta ocurra, se requiere que se empaquen dos genomas de

ARN, uno de cada subtipo en la misma partícula viral, y la recombinación se genera cuando se sintetiza el ADN por la transcriptasa reversa, al utilizar las dos cadenas de ARN empaquetadas, esta enzima salta de una cadena a otra (Archer y cols. 2008; Ramírez y cols. 2008). Está descrito que en el VIH-1 en promedio ocurren de 2 a 3 saltos durante cada ciclo de replicación.

La recombinación genética aumenta la diversidad del VIH-1, lo que permite la existencia de variantes que escapan a la inmunidad del huésped o a las terapias antivirales (Archer y cols. 2008; Ramírez y cols. 2008). Puede ocurrir entre diferentes cepas del mismo subtipo (intrasubtipo), diferentes subtipos (intersubtipo) o diferentes grupos (intergrupos) (Nájera y cols, 2000). Hasta la fecha no se ha descrito recombinación entre el VIH-1 y VIH-2, aunque si la coexistencia de ambos tipos de virus.

Dentro de las implicaciones de la variabilidad del VIH, si los tipos, subtipos y FCR del VIH-1 tienen diferencias biológicas, con respecto a la transmisión y al curso de progresión de la enfermedad, está claro que la extensa divergencia genética entre los subtipos es más que suficiente para causar tales diferencias. Su conformación depende de la obtención y análisis de datos en estudios in vivo y tomará tiempo en estar disponible. Es importante hacer notar, que las pruebas de diagnóstico, antirretrovirales y vacunas contra el VIH han sido principalmente desarrolladas para el subtipo B (Tebit y cols, 2007).

En México no existen abordajes científicos sobre la estructura molecular de los subtipos del VIH-1 y dadas las aplicaciones que la identificación de estos subtipos y sus variantes tienen en la epidemiología molecular, patogenicidad, historia natural de la enfermedad, tropismos hacia órganos y tejidos, resistencia antiviral y sobre todo, en el aporte de información inmunogénica necesaria para la selección y preparación de posibles vacunas preventivas o terapéuticas con una alta eficacia local y regional.

El objetivo del presente estudio fue describir las recombinaciones intersubtipo del VIH-1 presentes en individuos de la región occidente de México

Métodos

A 223 pacientes VIH positivos de hospitales de región occidente de México, previa explicación de los objetivos y riesgos del estudio, del llenado voluntario de la forma de consentimiento informado y su autorización por escrito para participar en el estudio, se obtuvo por venopunción, una muestra de 5 ml sangre periférica con el fin de separar plasma para realizar la extracción y la retrotranscripción del ARN viral con iniciadores específicos para el subtipo B.

En general, se extrajo el ARN plasmático utilizando el método QIAmp ARN viral (Qiagen, Hilden, Germany) y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento; posteriormente el ARN viral fue transcrito a un ADN complementario a través de retrotranscripción mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la subsiguiente amplificación de un fragmento de 1.3 kb del gen pol. El amplificado incluye las regiones del gen de la proteasa y los primeros 318 codones del gen de la transcriptasa reversa del VIH-1. Para este fin se utilizó el ensayo de VIH-1 TruGene (Siemens, Toronto, Ontario)

El producto amplificado se dividió en tres porciones para realizar una reacción CLIP con PCR anidado del gen de la proteasa completa, de los codones 39 al 142 y 135 al 244 del gen de la transcriptasa reversa.

La reacción CLIP consta de un PCR con la presencia de los iniciadores marcados con fluorescencia Cy5.5 (sentido) Cy5.0 (antisentido), dNTPs y didesoxinucleótidos con una proporción de 300:1. El producto de cada reacción se aplicó en un gel de poliacrilamida al 6%.

Cada muestra se analizó en un secuenciador automatizado (Long read tower) por medio del software de GeneObjects (versión 3.2, Siemens, Toronto, Ontario). Se creó un caso en donde se ponen las secuencias sentido y antisentido de las tres regiones secuenciadas y se generó una secuencia consenso del paciente. Se alineó y comparó con la secuencia consenso LAV-1 subtipo B usando el programa GeneLibrarian (versión 3.5, reglas 12.0, Siemens, Toronto, Ontario). Se analizó y revisó la secuencia del paciente para verificar los cambios con respecto al consenso LAV-1.

Posteriormente, la secuencia verificada se alineó con las secuencias consenso de los subtipos virales y la forma recombinante 01 que están reportados hasta la fecha, en el Laboratorio Nacional de los Álamos, EUA, con el programa de alineamiento múltiple de Clustal X.

Para la confirmación del subtipo B, se generó un árbol filogenético con el software MEGA 4.1. La relación filogenética se determinó con el programa neighbor joining y la distancia de evolución fue calculada con el método de dos parámetros de kimura, con un bootstrap de 1,000 replicados. Finalmente el análisis de recombinación de los subtipos se realizó con el programa SimPlot versión 3.5.1.

Resultados

De las 247 muestras seleccionadas para secuenciación solo 223 (90.3%) mostraron una secuencia de buena calidad, el restante 9.7% se excluyeron del estudio, ya que las secuencias eran parciales o de insuficiente calidad. Las 215 muestras que se incluyeron en el estudio, todas pertenecen al subtipo B (figura 1).

La distribución de la frecuencia por género fue de 198 (88.8%) hombres y 25 (11.2%) mujeres. El promedio de edad fue de 39 años con rango de edad que fluctuó entre 18 y 64 años. El promedio de la carga viral fue 284,749 copias/mm (rango 199-750,000) y de los CD4 212 células/mm³ (rango 3-1,117), del total de los pacientes se encontró 212 (95.1%) con solo subtipo B y 11(4.9%) con recombinación intersubtipo (figura 2). De estos 8 (3.6%) se encontró con recombinación con el subtipo D, 2(0.9%) con el subtipo G y 1(0.45%) con el subtipo F.

Se dividieron en dos grupos, el grupo con tratamiento antirretroviral 124 (55.6%) y el grupo sin tratamiento antirretroviral 99 (44.4%).

El grupo con tratamiento antirretroviral, el promedio de la carga viral fue 241,551 copias/mm (rango 704-750,000) y de CD4 215 células/mm³ (rango 3-

1,117). De éstos pacientes, 116 (93.5%) no tenían recombinación, y el resto, 6 (4.8%) era recombinación intersubtipo BD, 1 (0.8%) BF y 1(0.8%) BG.

El grupo sin tratamiento antirretroviral, el promedio de la carga viral 346,143 copias/mm (rango 199-750,000) y de CD4 210 células/mm³ (rango 4-856). De éstos pacientes, 96 (97%) no tenían recombinación, y el restante 3% fueron recombinaciones intersubtipo, 2 (2%) BD y 1 (1%) BG.

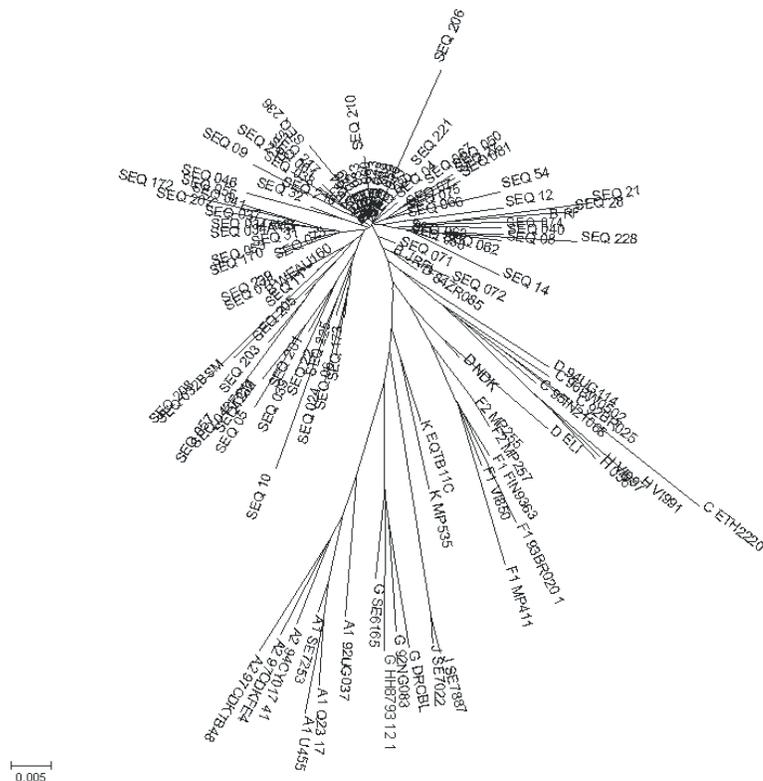
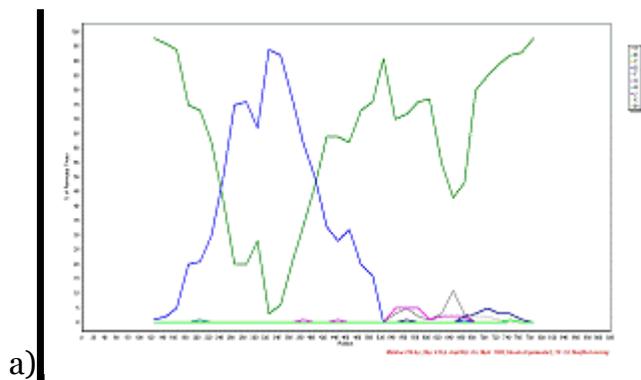


Figura 1. Árbol filogenético. Los árboles filogenéticos y las distancias genéticas fueron calculados con Mega 4.1. Las muestras del occidente de México se agrupan con las secuencias consenso del subtipo B.



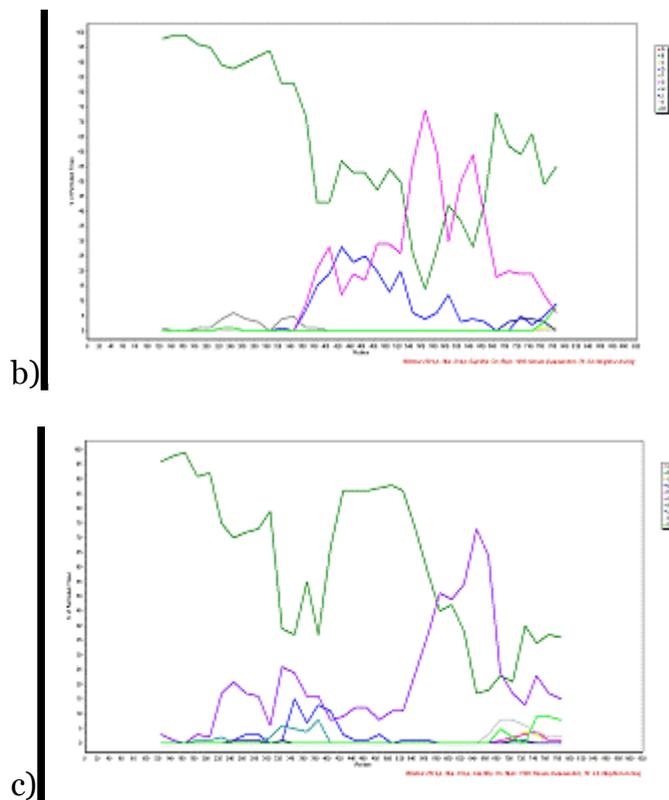


Figura 2. Recombinación intersubtipo con el programa SimPlot. a) recombinación subtipo BD, b) recombinación intersubtipo BG, c) recombinación BF.

Discusión

Los subtipos del VIH-1 se distribuyen geográficamente en forma desigual y su identificación dentro de un país o región puede determinar el origen de una infección y revelar brotes en poblaciones distintas. Las epidemias de diferentes subtipos indican la extensión de un grupo de riesgo a otro, tanto dentro del país como internacionalmente (UNAIDS, 2008). En forma global el subtipo C es el predominante en el mundo, mientras que el subtipo B es el más frecuente en los Estados Unidos y América, incluyendo el occidente de México (McCutchan, 2006).

La recombinación intersubtipo observada con mayor frecuencia fue la BD (3.6%), lo anterior se explica por la similitud en su secuencia y su consiguiente cercanía filogenética de los subtipos B y D, los cuales probablemente con el tiempo lleguen a ser considerados como su-subtipos, sin embargo, por razones históricas hasta la fecha se ha dificultado el cambio de esta designación (Lal y cols, 2005). Sin embargo, la recombinación intersubtipo BG, habrá que considerarla excepcional, dado que el subtipo G pudiera haberse adquirido a través movimientos migratorios de o hacia zonas prevalentes como España o Cuba, con quien existe un constante movimiento turístico (Muñoz Nieto M, 2008).

Entre las formas recombinantes se encuentra BF, que si bien no se encuentra en un porcentaje elevado, si se puede inferir que exista una alta probabilidad de que tengamos subtipo F circulando entre la población infectada por el VIH.

Las formas recombinantes identificadas en este estudio, concuerdan con lo encontrado en Latinoamérica y el caribe, y plantea la posibilidad de que por la estrecha relación existente con países como Brasil, Argentina o Cuba donde existe el subtipo F y otros subtipos noB, (Spira y cols, 2003), esa sea la vía epidemiológica hacia México.

Finalmente debido a la alta variabilidad del VIH, se sugiere que este tipo de estudios se continúen para poder conocer mejor la tendencia de los subtipos y FCR en el comportamiento y evolución de la epidemia en la región y en el país.

Conclusiones

El subtipo B es el predominante tanto en individuos naïve y con tratamiento antirretroviral.

Existen las recombinantes intersubtipo BG y BF en los pacientes infectados del occidente de México

Podemos inferir que en porcentajes bajos los subtipos G y F están presentes entre los individuos infectados por el VIH en el occidente de México.

En pacientes con tratamiento antirretroviral existe mayor cantidad de recombinaciones intersubtipo.

El incremento de la recombinación intersubtipo hace necesario que se monitoree la epidemiología molecular del VIH en México.

Bibliografía

Archer J, JW Pinney, J Fan, E Simon-Loriere, EJ Arts, M Negroni, DL Robertson. 2008. Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints. *PLoS Comput Biol*, **4**(9):e1000178.

Brumme ZL, WW Dong, B Yip, B Wynhoven, NG Hoffman , R Swanstrom, MA Jensen, JI Mullins, RS Hogg, JS Montaner, PR Harrigan. 2004. Clinical and immunological impact of HIV envelope V3 sequence variation after starting initial triple antiretroviral therapy. *AIDS*, **18**(4):F1-9.

Butler IF, I Pandrea, PA Marx, C Apetrei. 2007. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr HIV Res*, **5**(1):23-45.

Lal RB, S Chakrabarti, C Yang. 2005. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antirretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res*, **121**:287-314.

Los Alamos National Laboratory. Disponible en: <http://hiv-web.lanl.gov/> acceso Octubre 2008.

Los Alamos National Laboratory. The Circulating Recombinant Forms (CRFs). Disponible en: <http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs.html>. acceso Octubre 2008.

McCutchan FE. 2006. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol*, **78** (Suppl 1):S7-S12.

Muñoz Nieto M, L Pérez Alvarez, M Thomson, V García, A Ocampo, G Casado, E Delgado, C Miralles, EV de Parga, M Sierra, G Contreras, R Nájera. 2008. HIV type 1 intersubtype recombinants during the evolution of a dual infection with subtypes B and G. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **24**(2):337-43.

Nájera R, E Delgado, L Pérez Alvarez, MM Thomson. 2000. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS*, **16** (Suppl 4):S3-S16.

Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA y Organización Mundial de la Salud. Situación de la Epidemia de SIDA. diciembre de 2004. Disponible en: <http://www.unaids.org>. Acceso Octubre 2008.

Ramirez BC, E Simon-Loriere, R Galetto, M Negroni. 2008. Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res*, **134**(1-2):64-73.

Roquebert B, F Damond, F Brun-Vézinet, D Descamps. 2008. HIV genetic diversity and its consequences *Pathol Biol*, en prensa.

Spira S, MA Wainberg, H Loemba, D Turner, B Brenner. 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother*, **51**:229-240.

Tebit DM, I Nankya, EJ Arts, Y Gao. 2007. HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle? *AIDS Rev*, **9**(2):75-87.

