

EL Virus del HIV-1 de Pacientes de May Harbor de Diferentes Subtipos Filogenéticos: Las implicancias para la Evolución de la Pandemia HIV/SIDA

Danuta Pieniazek, Luiz M. Janini, Artur Ramos, Amilcar Tanuri, Mauro Schechter, Jose M. Peralta, Anna C. P. Vicente, Norman K. Pieniazek, Gerald Schochetman, y Mark A. Rayfield

Las variantes virales aisladas de pacientes infectados con HIV a través del mundo comparten una diversidad notable, especialmente en la glicoproteína de envoltura gp120. Los estudios filogenéticos han agrupado a los aislamientos de HIV-1 en ocho subtipos (A-H). No obstante, aún dentro de una sola persona infectada, el HIV está presente como unas «cuasi-especies,» o un enjambre de variantes estrechamente conexas. Esta diversidad genética, que en el caso del HIV-1 se acumula a una tasa de aproximadamente una sustitución de nucleótido por genoma por ciclo de replicación, da al virus una flexibilidad enorme para responder a un amplio conjunto de presiones de selección *in vivo*. Como una consecuencia, la droga-resistencia y las mutantes inmunológica se generan rápidamente en personas infectadas mediante todas las etapas de infección. Sobre una escala global, la pandemia del HIV se reconoce como consistiendo de muchas epidemias separadas, cada una con una geografía característica, poblaciones afectadas, y tipo predominante de cepa viral. Con unos estimados 15 millones de personas infectadas, la distribución geográfica de los subtipos virales está llegando a ser más dispersa, y estas demarcaciones son además confundidas por la evidencia creciente de infecciones mixtas.

La emergencia epidémica de infecciones mixtas con variantes heterotípicas de HIV-1 e HIV-2 han sido reconocidas por algún tiempo en las áreas geográficas donde ambos tipos de virus están presentes. Nosotros informamos estas infecciones en Côte d'Ivoire y Brasil (1,2); han sido también informados desde la India (3). En contraste, las infecciones mixtas homotípicas de variantes distintas de HIV-1 han sido sólo recientemente sugeridas por la presencia de sueros de ampliamente reactivos y la evidencia de recombinantes HIV de regiones geográficas en que circulan múltiples subtipos de HIV-1. La infección dual de HIV-1 en dos pacientes de Tailandia ha sido demostrada por análisis de secuencia de DNA viral (4).

Como la pandemia de HIV-1 ha crecido, la presencia simultánea de múltiples subtipos en una región ha llegado a ser común. Como consecuencia, una frecuencia aumentada de infeccio-

nes mixtas de HIV-1 podría esperarse. Así, hay una necesidad de estimar la prevalencia y distribución geográfica de este tipo de infección. El análisis de secuencia del DNA proviral de HIV ha sido el método de elección para caracterizar la diversidad genética del HIV. Sin embargo, debido a las aún relativamente limitadas determinaciones de secuencia de fragmentos pequeños por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por consumir mucho tiempo y ser muy laboriosos, este método no es particularmente práctico para estudios moleculares epidemiológicos a gran escala. Para solucionar este problema, hemos desarrollado un método genético basado en el polimorfismo del sitio de restricción para analizar las infecciones mixtas homotípicas por HIV-1 dentro de poblaciones infectadas. El concepto de este ensayo está basado en la correlación observada entre los mapas de restricción del HIV-1 aislados con su clasificación filogenética, que está basado en los datos de secuenciación. Así, ciertas enzimas de restricción pueden usarse para predecir el filogrupo de HIV-1 de muestras infectadas. Las diferencias en movilidad electroforética de productos de digestión de endonucleasas resultan del polimorfismo del sitio de restricción en la selección del genoma del HIV-1 y permite el rápido reconocimiento de distintos subtipos filogenéticos. Un fragmento 297 bp pol que mide el gen de la proteasa viral entera se usa para nuestro análisis. El gen viral es ampliado por nested PCR que usa templados de DNA, células mononucleares de sangre periférica sin cultivar (PBMC) o cultivo viral. La clasificación preliminar de cepas de HIV-1 en bien definidos subtipos A, B, C, D, y F es hecha por análisis de restricción secuencial por endonucleasa. El polimorfismo de restricción *AluI* en el gen de la proteasa en un PCR ampliado divide a las cepas virales en dos grupos: los subtipos B y D pertenecen a un grupo, y los subtipos A, C, y F a otro (Figura 1A). La diferenciación adicional de los subtipos de HIV-1 dentro de esos dos grupos es realizado por análisis de patrones de digestión enzimática del gen proteasa por *Hinfl*, *BclI*, *MaeI*, *SpeI*, y *Scal* (Pieniazek et al., manuscrito en preparación). Los modelos de migración electroforética visualizados por coloración de bromuro de etidio o por sondas radiomarcadas se determinan en un gel

al 10% de acrilamida. En infecciones únicas, se detecta un único modelo de restricción, mientras que en infecciones múltiples que involucran cepas de distintos subtipos de HIV-1, son observados complejos modelos de digestión en personas infectadas. Como ejemplo, en la Figura 1A, presentamos tres modelos distintos de restricción *AluI* del gen de la proteasa que son característicos para infecciones únicas por subtipos virales de A, C, y F (modelo # 1) y por subtipos B y D (modelos # 2 y # 3). En la Figura 1B, mostramos una combinación típica de dos modelos distintos de restricción *AluI* (#1 y # 2) encontrados en un paciente infectado con dos cepas virales de subtipos F y B. Basados en nuestro análisis sobre la región conservada del gen de proteasa, deberíamos detectar la mayoría de las cepas de HIV-1; sin embargo, algún aislamiento altamente divergente puede escapar a la amplificación de PCR como resultado de desigualdades de los primers. Además, desde un sólo nucleótido la sustitución podría o generar o destruir un sitio de restricción, el análisis de sucesión permanece como la herramienta definitiva para identificar variantes de infecciones múltiples. No obstante, este ensayo puede aplicarse convenientemente para screening de un número grande de muestras.

Usando este método, hemos realizado el screening de 208 muestras de DNA proviral de HIV-1 recolectados de países en Sudamérica, África, y Asia donde se encuentran cepas de distin-

tos subtipos de HIV-1. Observamos la presencia simultánea de dos modelos distintos de digestión en PCR del gen de la proteasa amplificada (Figura 1B) en 31 muestreos; nuestra observación sugiere la superinfección con cepas de HIV-1 de distinto origen. Para eliminar la potencialidad en el laboratorio de contaminación cruzada, analizamos los modelos de restricción del gen de la proteasa de múltiples alícuotas del PBMC del paciente. Además, el análisis fue repetido en el DNA de un segundo muestreo de sangre recolectadas de cada uno de los pacientes. Los análisis para los primeros cinco de 31 pacientes se completaron, y los datos se resumen aquí (los detalles están en Janini et al., manuscrito en preparación). Secuencia y análisis filogenético del gen de la proteasa (Figura 2) en PBMC de esos cinco pacientes con infecciones duales confirmadas ocasionado por cepas de subtipos de HIV-1 B y F en una persona (Br5), subtipos F y D en otro

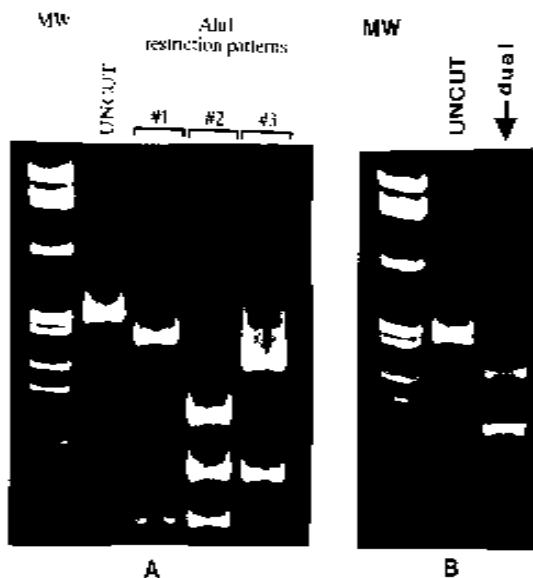


Figura 1.
A. Tres patrones de digestión distintos *AluI* de los genes de proteasa por PCR representando una sola infección por HIV-1 por cepa viral del subtipo A, C, y F (patrón # 1), y subtipos B y D (patrones #2 y #3).
B. La presencia de dos patrones distintos de digestión *AluI* (#1 y #2) de la proteasa del gene en PBMC del paciente dualmente infectado por cepas virales del subtipo F y B (lane 3). La flecha indica el fragmento diagnóstico detectado por hibridación con probe radiactiva (2). MW representa el peso molecular del marcador Θ_{X174} RF DNA digerido con *HaeIII*

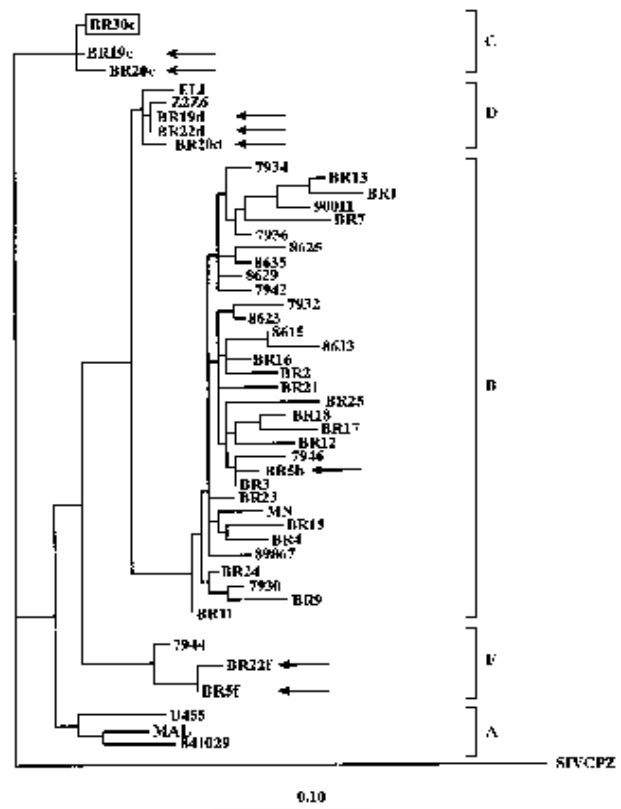


Figura 2
Clasificación filogenética de cepas de HIV-1 en pacientes dualmente infectados. Secuencia de HIV-1 de infecciones duales (Br5, 19, 20 y 22) están indicadas con flechas, y la cepa principal en el niño infectado (Br30) en un recuadro. Las tres fueron construidas en base a la secuencia de DNA de la proteasa del gen usando el método de máxima probabilidad por el programa fastDNAm1 (6). La secuencia de proteasa SIVcpz fue usada como grupo externo. Los distintos subtipos de HIV-1 están delineados. La escala de la barra muestra la relación de la sustitución de nucleótidos dados por la longitud de la rama horizontal. La distancia vertical está realizada sólo para fines de claridad.

paciente (Br22), y subtipos C y D en una pareja casada (Br19 y 20). Además, en el niño (Br30) de esta pareja, dos modelos distintos de digestión por *AluI* fueron encontrados también; la cepa más importante de HIV-1 se agrupó entre el subtipo C del virus de los padres. La cepa menor de este niño es probable que represente el subtipo D, pero no hubo suficiente material para el clonado y secuenciado adicional de esta cepa.

La detección de las infecciones múltiples homotípicas y heterotípicas de ocurrencia natural pueden tener importantes implicaciones para la inmunoterapia porque la infección con un subtipo de HIV no puede proteger totalmente contra superinfecciones subsiguientes con cepas distintas de HIV. Sin embargo, nosotros no sabemos si la adquisición del virus en los pacientes adultos doblemente infectados fue secuencial o simultánea. No obstante, las consecuencias de infecciones mixtas pueden afectar profundamente la capacidad del virus para cambiar y puede modificar la dirección de la pandemia mediante modelos alterados de patogénesis viral, aumentar variación genética mediante recombinación, y la generación de viriones pseudotipos, incluyendo partículas fenotípicamente mixtas del virus. Está por ser anticipado que tales sucesos ensancharían finalmente el tropismo celular para el HIV y comandando el diseño de inmunoterapias polivalentes. Finalmente, nuestros datos juntos con el recientemente publicado análisis genético del HIV-1 y el HIV-2 (5) sugiere que múltiples infecciones homotípicas con las cepas divergentes de HIV pueden ser más comunes que lo que se pensaba anteriormente. La prueba de screening descrita aquí será útil en estimar la incidencia de

tales infecciones de HIV-1. Creemos que esta información es crucial para tanto las evaluaciones de la pandemia como para el desarrollo de estrategias de intervención.

Danuta Pieniazek, * Luiz M. Janini, *# Artur Ramos, *# Amilcar Tanuri, # Mauro Schechter, & Jose M. Peralta, # Anna C.P. Vicente, Norman J. Pieniazek, * Gerald Schochetman, * and Mark A. Rayfield *
* National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA; # Universidade Federal do Rio de Janeiro, and & Hospital Clementino Fraga Filho, and Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Referencias

1. Rayfield M, De Cock K, Heyward W, et al. Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: demonstration of both type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1988;158:1170-6.
2. Pieniazek D, Peralta JM, Ferreira JA, et al. Identification of mixed HIV-1/HIV-2 infections in Brazil by polymerase chain reaction. *AIDS* 1991;5:1293-9.
3. Grez M, Dietrich U, Balfe P, et al. Genetic analysis of Human Immunodeficiency Virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses. *J Virol* 1994;68:2161-8.
4. Artenstein AW, VanCott TC, Mascola JR, et al. Dual infection with HIV type 1 of distinct envelope subtypes in humans. *J Infect Dis* 1995;171:805-10.
5. Gao F, Yue L, Robertson DL, et al. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* 1994;68:7433-47.
6. Larsen N, Olsen GJ, Madaid BN, et al. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3021-3.