

Epidemiología y Relaciones Evolutivas entre cepas de HIV Subtipo F Rumano y Brasileño

La clasificación inicial del virus del HIV-1 como las cepas Africanas u Occidentales han sido reemplazadas por la subtipificación filogenética que usa datos de secuencia de nucleótidos. En HIV-1 han sido definidos ocho linajes o subtipos distintos de A a H, (1). Considerando que el valor de la evolución del genoma del HIV-1 se estima en 0,5% a 1% al año y que la distancia genética promedio entre los subtipos de HIV-1 es aproximadamente 20%, es probable que estos subtipos se originaran antes de la pandemia del HIV-1 (1). El mosaico global de los subtipos del HIV-1 es consistente con la hipótesis que la mayoría de las epidemias regionales comenzaron con la introducción de uno o de unas pocas variantes que se diversificaron localmente más que mediante olas radiantes de subtipos de HIV-1 ya diversificados que se diseminaron desde el lugar de origen. En este informe, nos abocamos a las relaciones evolutivas epidemiológicas entre el subtipo F del virus del HIV-1 recientemente identificados en dos regiones geográficamente distintas, Rumania y Brasil.

La epidemia de HIV-1 entre niños huérfanos Rumanos que viven en orfanatos fue reconocido durante los años 1989-1990 (2). Los estudios epidemiológicos han mostrado que la mayoría de los niños llegaron a infectarse por transmisión horizontal del HIV-1 mediante transfusiones de sangre o mediante el uso de equipo médico sin esterilizar. Hemos mostrado por análisis de secuencia de nucleótidos que todos los aislamientos de HIV-1 de niños en Rumania del sudeste están altamente relacionados genéticamente (3). La distancia nucleótido promedio interpersonal dentro de la región C2-V3 del gen *env* fue 0,9% a 3,6%. El análisis filogenético de estas secuencias mostró que las cepas de HIV-1 Rumano agrupadas juntas con una sola cepa de HIV-1 Brasileña en un clade evolutivo anteriormente no reconocido luego designado como subtipo F. Ahora tenemos la oportunidad de aumentar esta comparación con subtipos adicionales de secuencias de F de los dos países y para fomentar el estudio de la relación entre los virus Rumanos y Brasileños. En el análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del envelope C2-V3 (Figura 1), incluimos ocho subtipos del virus de HIV-1 F aislados de niños en el sudoeste de Rumania (L19570-L19579) (3) así como también dos secuencias

representativas del virus del HIV-1 encontrados en niños que viven en Rumania norcentral (R18586 y R18598) (Banda et al., manuscrito en preparación). Desde Brasil, incluimos, además de la secuencia de la primer cepa subtipo identificado de F (BRA7944) (4), tres secuencias F recientemente reportadas (BZ126A, BZ162A, y BZ163A) (5) y cuatro cepas F (BR46, BR57, BR58, y BR59) aisladas en nuestro laboratorio de pacientes en Río de Janeiro. También incluimos dos cepas de HIV-1 de Camerún, CA4 y CA20, que se han clasificado tentativamente como subtipo viral F (1,6) y las secuencias de referencia de nucleótidos representando los otros subtipos de HIV-1.

Los resultados de este análisis filogenético muestran que las secuencias Brasileño y Rumanas se agrupan en dos grupos altamente relacionados pero separados. La distancia genética entre las secuencias del subtipo F Brasileño fueron del 5% a 13,8%, que están dentro de los valores límites establecidos para la distancia intrasubtipo (1). Entre la secuencia de nucleótidos Romanian C2-V3 esta distancia fue 0,9% a 6,5%, y entre los dos grupos fue 7,5% a 12,9%. Estos valores apoyan la inclusión de los grupos Rumanos y Brasileños dentro del mismo subtipo F de HIV-1. La confiabilidad de estos resultados filogenéticos fue verificada por el análisis de lanzamiento automático (100 conjuntos de datos) y por el método poda, que consiste en remover secuencialmente las diferentes cepas y volver a correr el análisis.

Las dos secuencias de Camerún sólo se asociaron débilmente con los grupos Rumanos y Brasileños, y esta asociación no fue estable. La distancia genética entre las secuencias Rumanas y Brasileñas y las secuencias de Camerún fue de 16,5% a 24,1%, que es típicas de distancias genéticas intersubtipo más que intrasubtipo. Nuestro análisis no apoya un fuerte enlace entre las cepas de Camerún y los otros subtipos F del virus; sin embargo, en términos evolutivos, estos virus pueden estar más cerca el uno al otro que de los otros subtipos, o pueden haber experimentado una evolución convergente dentro de la región de envoltura que nosotros analizamos. El análisis de secuencias adicionales de otras regiones del genoma HIV-1 puede aclarar la relación entre la cepa de Camerún y los otros subtipos.

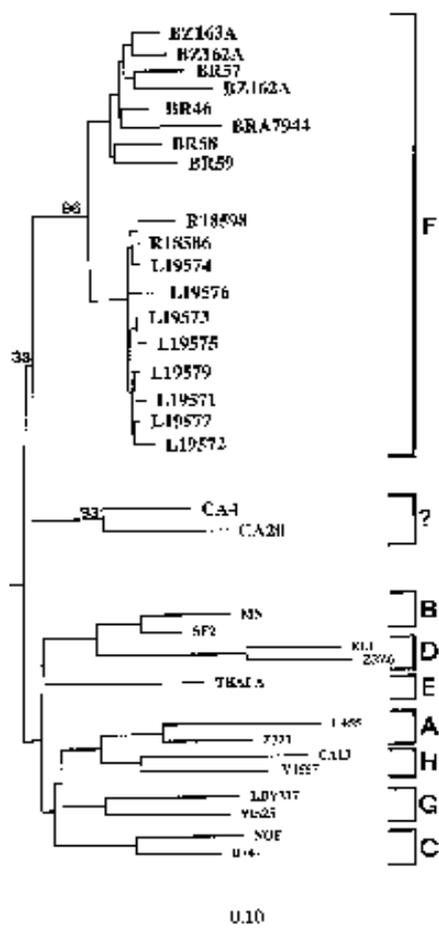


Figure 1. Relación filogenética entre las secuencias de nucleótidos de los subtipos F Rumano y Brasileños. Los tres fueron construidos usando el método de "neighbor joining" incluidos en el paquete Phylip 3.5c (7). Trescientos dos nucleótidos de la región de envoltura C2-V3 fueron usados para el análisis. La distancia vertical entre las ramas no es informativa y sólo se realiza para claridad. El número de ramas indica valores de salto. La secuencia de nucleótidos entre las cepas puede ser deducida por el uso de la barra incluida en la figura.

El patrón amino-ácido GPGR en la extremidad del loop de la proteína V3 ha sido considerada una secuencia de impronta para el subtipo F Brasileño (5). Este patrón relativamente conservado fue perceptible debido a la característica entre los subtipos de virus B, considerando la secuencia predominante de GPGQ entre todas las cepas HIV-1, incluyendo todo el virus inicial F Rumano. Dos de las nuevas cepas Brasileñas identificadas (BR58 y BR59), sin embargo, contenían el patrón GPGQ, y la cepa Romanian R18598 contiene el patrón GPGH (Figura 2). Filogenéticamente, estas secuencias se agrupan con sus clusters geográficos respectivos (Figura 1), que indica que mutaciones independientes pueden haber ocurrido en este locus.

Como fue indicado antes, la distancia genética entre las secuencias de nucleótidos de HIV-1 Rumanos es muy pequeña, lo que sugiere un nexo epidemiológico directo entre estas cepas y un período corto de evolución. La presencia exclu-

siva de virus altamente relacionados en dos provincias geográficamente distintas de Rumania sugiere fuertemente que la epidemia inicial pediátrica de HIV-1 en este país comenzó de una fuente infecciosa única. Esta sugerencia es también apoyada por el hecho que ese subtipo viral F son infrecuentes y, por lo tanto, las oportunidades para la introducción múltiple independiente de cepas altamente relacionadas de las cepas del subtipo F en Romanas de niños son muy bajas. Aunque ningún dato de secuencia de nucleótidos están disponibles acerca de las cepas de HIV-1 circulantes en la población adulta en Rumania, los estudios epidemiológicos y serológicos indican que el número de infecciones es pequeño, y probablemente la mayoría de los adultos infectados por HIV-1 se infectaron por contacto sexual con visitantes extranjeros o con Rumanos que viajaron afuera el país (2). Es de esperar, por lo tanto, que la mayoría de las cepas de HIV-1 que infectan a los adultos representan los subtipos prevalentes internacionalmente. Es remotamente posible, sin embargo, que los adultos se infectaran con virus subtipo F y podrían haber servido como el original o los transportadores intermediarios para la transmisión del HIV-1 entre los grupos de niños que viven en regiones geográficas distintas de Rumania.

En Brasil, la relativamente larga distancia genética entre el subtipo F de virus podrían indicar que un ascendiente único se introdujo durante las fases tempranas del HIV-1 epidémico y que divergió localmente, o que múltiples diferentes cepas F se introdujeron a este país. La baja prevalencia del subtipo F viral a través del mundo hace la alternativa última menos probable. Sin embargo, no hay información disponible sobre las cepas de HIV-1 presentes durante las fases iniciales de la epidemia en Brasil. Nuestro estudios en proceso y los datos publicados (4,5) indican que las infecciones por el HIV-1 subtipo F representan groseramente el 10% del número estimado de casos. Este número relativamente grande de infecciones del subtipo F y la tasa estimada de divergencia del HIV-1 sugiere una introducción temprana del subtipo F viral en Brasil.

A causa de la posición geográfica y la dispersión de las relaciones socio-económicas entre Rumania y Brasil, la potencialidad para un nexo epidemiológico entre el HIV-1 subtipo F viral es pequeño. Un argumento más obligado contra un nexo epidemiológico directo entre el subtipo F viral de estos dos países pueden hacerse en base de la topología de las ramas filogenéticas que colocan aparte los dos grupos de virus (Figura 1). Si un nexo epidemiológico directo existió entre los dos grupos, el agrupamiento sería integral con un grupo de bifurcación desde dentro de la otra. El árbol topológico muestra los dos grupos de virus sobre ramas separadas con un

```

F CON      NAKTIIVHLNESVQINCFEPMNTRKSDHLGFGRAFYTTGDIIGDIRKAKCNVBSOTQWNETLERVEAELEKSHF.PNATIKFWSBSSCGDLEITMHSFNCRCGEFFVCNT
BR46      .T-----S-----S-----A--E-----I--E-----G-----T-----
BR57      --I-----Y-----M--G-----A-----Q-K-E--A-----I
BR58      . . . . .I . . . . .Q--A-----T-----K-----V-CNTT-VI--A-----Y-----
BR59      -T-N-----T--R-F--Q--A-----R-----Q-KE--Y-B--T--I-----
BR47944    . . . . .L-T-----G-Q--T--A--R-----N-S--E--RQ--EIG
BR163A     . . . . .F-----Y--YF--H-A-K-----M-----RQ--EIG
BR162B     . . . . .F-----G-T-----A--K-----Q-----
L19576     -T-----T-----Q-----N-VH--E--QPL--E--G-----
L19598     -T-D-----E-----N-VQ--H--E-----R--S-----
CA4        -H-----QF-R-E-----I-----A-----Y-VJNK-J--D--NK-VKAFYKKA--L-VI--R-A-----T-----
CA20       .I-I--Q--R-E-----RI--QV--A-----Y-BINI-L--E--NQ-VREF-KLDENITN-T-SP----F--T--K--Y--
A CON      . . . . .Q-VKE-E-----V-I--Q--A-----Q--I R E-- : QQ ATQ-REY . . E . I AN . . . . .T-----C-----
J CON      . . . . .Q--E-----I-----H-----Q--KAK-N--KQLVK--REY--G-K--V--Q-----V-----G-----
C CON      -V-----E-V-----KI--QT--L-----Q--I-KEE--Q--GK--LEE--K--AP-----T-----
D CON      . . . . .Q--T--Y--QRT-I--Q-L--R-----Q--Y--AE--QQ-AK--GDLN-MMT--I-KP-----T-----G-----
E CON      . . . . .K-E-----S--T--TI--QV--R-----Y EIM . K EA KQ TE--EE--E-K--I-QPT-----H-----

```

Figura 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región de envoltura C2-V3 las cepas de HIV-1 Rumana y Brasileña subtipo F y su comparación con la secuencia de Camerún y la secuencia consensuada para algunos otros subtipos F CON representa la secuencia de aminoácidos (código de una letra) por los subtipos F Rumano y Brasileño de HIV-1 presentado en la figura. La secuencia consensuada para los otros subtipos son de la Ref. 1. Los aminoácidos idénticos al F CON se muestran como una línea, y los puntos representan un intervalo introducidas para alinear secuencias. La barra superior muestra al péptido de la proteína loop V3.

ascendiente común relativamente distante. Aunque limitado en el alcance, nuestros hallazgos apoyan una relación evolutiva entre los virus del subtipo F Rumano y Brasileño e indican que las dos epidemias regionales provinieron independientemente.

Claudiu I. Bandea, * Artur Ramos, * Danuta Pieniazek, * Rodica Pascu, & Amilcar Tanuri, # 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, Rio de Janeiro, Brazil; & University of Medicine and Pharmacy, Tg-Mures, Romania

Referencias

1. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith R, Pavlakis G, eds. Human retroviruses and AIDS 1994: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1993.
2. Hersh BS, Popovici F, Apetrei RC, et al. Acquired immunodeficiency syndrome in Romania. Lancet 1991;338:654-9.
3. Dumitrescu D, Kalish ML, Klicks SC, Bandea CI, Levy JA. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates from children in Romania: identification of a new envelope subtype. J Infect Dis 1994;169:281-8.
4. Potts KE, Kalish ML, Lott T, et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. AIDS 1993; 7:1191-7.
5. Louwagie J, Delwart EL, Mullins JI, McCutchan FE, Eddy G, Burke DS. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. AIDS Res Hum Retroviruses 1994;10:561-7.
6. Nkengasong JN, Janssens W, Heyndrickx L, et al. Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon. AIDS 1994;8:1405-12.
7. Felsenstein J. PHYLIP-phylogeny interference package (version 3.2). Cladistics 1989;5:164-6.