

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 EN CUBA Y SUS IMPLICACIONES EN LA TRANSMISIBILIDAD Y PROGRESIÓN

Autoría principal: Madeline Blanco de Armas¹

Otros autores: Liuber Machado Zaldívar, Héctor Díaz Torres, Dania Romay Franchy, Nancy Ruiz Gutiérrez y Eladio Silva Cabrera

Colaboradores: Felipe Rolo Gómez, Carlos Duarte Cano, Nadia Martínez Marrero y Ana Luisa Lubían Caballero

Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil/ Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). Carretera de Tapaste y Autopista Nacional. San José de Las Lajas. Mayabeque. Teléf. (047 848725)

Otra entidad participante: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

¹Autor de correspondencia. Correo electrónico madeniba@infomed.sld.cu

Madeline Blanco De Armas (35%). Diseño de etapas, procesamiento de las muestras, ejecución de experimentos y análisis de resultados relacionados con el estudio realizado con el aislamiento y caracterización molecular de variantes del VIH-1. Estudios de Epidemiología molecular en Cuba, y estudio transmisibilidad y progresión clínica de la enfermedad en las personas que viven que VIH/ SIDA. Reportes del hallazgo y circulación de nuevas variantes y formas recombinantes circulantes del VIH-1 en la población seropositiva en Cuba. Realización de tesis de doctorado sobre la temática.

Liuber Machado Zaldívar (25%). Ejecución de experimentos mediante secuenciación de ácidos nucleicos para la caracterización molecular de cepas y el estudio de resistencia a los antirretrovirales, análisis filogenético de las secuencias. Análisis de los resultados relacionados con los estudios moleculares.

Héctor Díaz Torres (20%). Selección de voluntarios, tomó el consentimiento informado de cada paciente que participó en los estudios, participó en la toma de muestra, informó los resultados directamente a los pacientes, análisis de resultados.

Dania Romay (10%). Procesamiento de las muestras, confección del banco de muestra, ejecución de experimentos relacionados con la caracterización molecular de cepas de VIH-1.

Nancy Ruiz Gutiérrez (5%). Determinación de la carga viral de los pacientes incluidos en el estudio.

Eladio Silva Cabrera (5%). Asesor del estudio, tutor de Tesis de Doctorado.

RESUMEN

Los estudios serológicos y moleculares del VIH-1 en Cuba han mostrado una seropositividad muy baja, pero una creciente diversidad genética, debido a la introducción de un amplio número de variantes del VIH-1 de diferentes áreas geográficas, a la convivencia de las personas que viven con VIH en comunidades, a la concurrencia de más de una vía de contagio, así como múltiples factores de riesgo presentes en la población seropositiva, que conllevaron a la elevada diversidad genética observada en Cuba. Este trabajo se realizó con el objetivo de estudiar la variabilidad del VIH-1 en Cuba, profundizar en la epidemiología molecular y asociar el potencial genético y los factores de riesgos epidemiológicos y conductuales con la transmisibilidad y progresión clínica de la enfermedad. Para ello se caracterizaron los genes *env*, *gag* y *pol*, del VIH-1, mediante el Ensayo de Movilidad del Heteroduplex y la Secuenciación de ácidos nucleicos en 590 personas infectadas, según la prevalencia de seropositivos por provincias entre los años 2001 al 2009. Se identificaron 297 muestras con subtipo B, 269 No B y 24 resultaron no tipables. El subtipo B resultó mayoritario en cada uno de los estudios realizados, con un alto grado de conservación para los tres genes estructurales y predominó en el sexo masculino, fundamentalmente en la población de hombres que tienen sexo con hombres, mientras que los subtipos No B, predominantes en mujeres y hombres heterosexuales mostraron múltiples variantes y formas recombinantes circulantes (CRF). La forma de contagio que predominó en el presente estudio fue la vía sexual aunque otras están presentes en menor proporción. El estudio nos permitió conocer características moleculares de la epidemia cubana y mostrar algunos subtipos introducidos desde diferentes países del mundo, los cuales al mezclarse han posibilitado la ocurrencia de recombinación. Los subtipos B y No B, así como las CRF se encuentran distribuidos en todas las provincias y regiones del país. Después de analizar múltiples variables clínicas, epidemiológicas y conductuales no se encontró asociación entre los subtipos con la transmisibilidad y progresión clínica de la enfermedad. Este trabajo permitió detectar nuevos subtipos no referidos con anterioridad y la circulación de múltiples formas recombinantes VIH-1, empleando diferentes tecnologías de caracterización molecular, permitió profundizar en la epidemiología molecular del VIH-1 y además se abordó por primera vez en Cuba un amplio estudio sobre la influencia de los subtipos virales en la transmisibilidad y progresión clínica de la enfermedad. El trabajo cuenta con 15 publicaciones en revistas cubanas y extranjeras de impacto científico y 32 presentaciones en eventos nacionales e internacionales, ha recibido distinciones como mejor trabajo científico en el Simposio de SIDA en el marco del XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología, Premio al mejor trabajo científico institucional del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil y seleccionada su autora como mejor Innovador provincial y participación en el IV Congreso Internacional de Mujeres creadoras representando la provincia La Habana (actual Mayabeque). La autora del presente estudio participó como coautora en un trabajo que recibió premio de la ACC en el año 1997, el cual contribuyó al conocimiento básico de las

variantes virales que iniciaron la epidemia en Cuba, para el establecimiento de medidas de control y en función del proyecto de vacuna que se encontraba en estudio en ese momento en nuestro país.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

Desde la descripción hace 29 años del primer caso infectado con el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), la pandemia ha afectado a más de 150 países en los cinco continentes con una continua expansión. 34.2 millones de personas viven actualmente con VIH en el mundo, según reporte de la OMS y ONUSIDA. (ONUSIDA, 2012).

En estas tres décadas muchos esfuerzos e intervenciones sociales se han realizado sin grandes resultados. La raíz de este desafío es la patogénesis molecular del VIH, que ha desarrollado numerosos mecanismos que evitan que sea controlado por el sistema inmune. (Kijak y cols, 2005). Este virus que pertenece a la familia retroviridae, es un lentivirus, considerado un retrovirus complejo, que se distingue de otros virus por la extraordinaria variabilidad, expresada en grupos, subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (CRF) y formas únicas recombinantes (URF). Aunque existe gran variabilidad, el análisis filogenético de numerosas cepas del VIH-1, aisladas de diversos orígenes geográficos, ha permitido clasificar cuatro grupos distintivos: grupo M, grupo O, grupo N y recientemente el grupo P. El grupo M agrupa la mayoría de las cepas responsables de la pandemia que nos afecta a nivel global, que incluye los subtipos A, B, C, D, F, G, H, J y K, los Sub-subtipos A1, A2, A3, A4 y F1, F2. Hasta el momento se han descrito 55 CRFs. Así como múltiples URF. (Plantier y cols, 2009).

La diversidad que muestra el VIH es el resultado combinado de diferentes fuerzas que actúan por separado: 1) La introducción frecuente de mutaciones debido al rol de la RT en la generación de diversidad en los retrovirus (debido a los errores de la reverso transcriptasa y la falta de acción correctiva. 2) El alto rango de replicación o rápido recambio de virus "*in vivo*", la presión selectiva de la respuesta inmune y la presión terapéutica. 3) El fenómeno de recombinación genética entre cepas forma parte del mecanismo normal de replicación de los retrovirus. (Nájera y cols, 2005; Requejo, 2006).

Estudiar la diversidad genética del VIH es necesario, no solo para conocer el origen y entender la epidemiología del VIH-1, sino también para vigilar la emergencia de nuevas variantes, que puedan ser más transmisibles o patogénicas y las implicaciones que se derivan de ello, para el desempeño del diagnóstico serológico y molecular de laboratorio, los cambios en los patrones de resistencia a las drogas antirretrovirales y el logro de una vacuna eficaz. (Kandathil y cols, 2005).

En Cuba, se produjo en la década del 80 la introducción de un amplio número de variantes virales de diferentes regiones geográficas, Norteamérica, Europa, pero fundamentalmente de países de África, continente donde coexisten todos los subtipos, a esto se suma la convivencia de las personas que viven con VIH-SIDA (PVS) en comunidades, la concurrencia de más de una vía de contagio y el amplio número de factores de riesgo epidemiológicos y conductuales presentes en la población seropositiva, que han dado lugar a la elevada variabilidad genética del VIH-1 observada en Cuba. (Rolo y cols, 1995; Gómez y cols, 1996; Resik y cols, 2004).

El verdadero rol de la variabilidad genética del VIH-1 y sus implicaciones en la transmisibilidad y la progresión clínica de la enfermedad aún se desconoce. Ha existido un interés creciente en el mundo de estudiar esta asociación, ya que existen pocos estudios bien diseñados que comparen satisfactoriamente subtipo B con No B, ya que la información clínica y epidemiológica de los pacientes y sus contactos es escasa y además existen múltiples factores epidemiológicos y sociales que introducen sesgos en la información. (Taylor y cols, 2008).

Los estudios serológicos y moleculares en Cuba muestran una seropositividad muy baja pero una creciente variabilidad genética con implicaciones epidemiológicas, por lo que nos planteamos la necesidad de profundizar en la epidemiología molecular del VIH-1 en nuestro país y estudiar la asociación entre la variabilidad genética del VIH-1, con la transmisibilidad de los subtipos encontrados o la progresión clínica de la enfermedad en las PVS.

A partir de estos antecedentes, los objetivos de estas investigaciones estuvieron encaminadas a:

- Estimar la variabilidad genética del VIH-1, para las regiones de los genes estructurales *env*, *gag* y *pol*.
- Determinar la prevalencia de los subtipos B y No B según variables epidemiológicas y conductuales.
- Relacionar los hallazgos moleculares con la progresión clínica y la transmisibilidad.
- Contribuir al conocimiento de la epidemiología molecular del VIH-1.
- Determinar si existe relación entre la variabilidad genética del VIH-1 y la transmisibilidad y progresión clínica de la enfermedad en las PVS en Cuba.

Universo de estudio

Se realizó un muestreo no aleatorio (muestras por cuotas) de acuerdo a la prevalencia de seropositivos en cada una de las provincias del país. Se estudiaron un total de 590 personas infectadas por el VIH-1, entre los años 2001-2009 que representan el 5,0% del total de seropositivos hasta diciembre de 2009; quedando

incluidas personas de ambos sexos, 480 hombres y 110 mujeres, en edades comprendidas entre 14 y 70 años.

Tipaje molecular mediante el ensayo de movilidad del heteroduplex, y secuenciación de ácidos nucleicos para los genes ENV, GAG Y POL del VIH-1

Mediante el empleo de dos tecnologías para la caracterización molecular (Ensayo de Movilidad del Heteroduplex (HMA) y la Secuenciación de ácidos nucleicos se tiparon los genes *env*, *gag* y *pol* del VIH-1 y fue posible la detección de múltiples subtipos y CRFs en la población seropositiva cubana. (Delwart y cols, 1995; Heyndrickx y cols, 2000; Quarleri y cols, 2004).

El subtipo B resultó mayoritario en la muestra estudiada y mostró un alto grado de conservación para los genes estudiados, sin embargo los subtipos No B y las formas recombinantes circulantes mostraron una amplia diversidad de subtipos y combinaciones recombinantes, algunas de las cuales se encuentran emergiendo con gran rapidez y mostraron patrones de recombinación complejos (CRF18 cpx, CRF19 cpx, CRF 20, 23, 24 cpx BG). (Pérez y cols, 2006; 2007).

Se encontró por primera vez en Cuba la presencia de los subtipos G y J, así como la circulación de las CRF01 A/E, CRF02 A/G y otras siete combinaciones recombinantes al emplear la tecnología HMA para los genes *env* y *gag*, donde predominó la combinación A/D.

El HMA *env/gag* (método propuesto por OMS/ ONUSIDA), mostró limitaciones para ser utilizado en la vigilancia epidemiológica a nivel molecular, debido a la amplia circulación de subtipos y variantes recombinantes en Cuba. (Delwart y cols, 1995; Heyndrickx y cols, 2000).

Epidemiología molecular del VIH-1, asociación de los subtipos B y no B con variables epidemiológicas y conductuales

Se confeccionó una base de datos en la que se incluyeron los hallazgos moleculares del genotipaje, así como los datos de identificación, clínicos y epidemiológicos de los pacientes, tomados de las bases de datos PACIENTE y CONTACTOS, del Programa Nacional de Epidemiología, del MINSAP y SIDATRAT, del IPK. Para analizar la Epidemiología Molecular del VIH-1 en Cuba y asociar la variabilidad con la transmisibilidad de los subtipos B y No B y la progresión clínica de la enfermedad en la PVS, se analizaron múltiples variables epidemiológicas, clínicas y conductuales de cada paciente incluido en el estudio. (Gorry, 2011; Limia, 2011).

Se encontró asociación del subtipo B con el sexo masculino y la orientación sexual hombres que tienen sexo con hombres y los No B con el sexo femenino y heterosexuales, donde la forma de contagio que predominó para ambos grupos B y No B, fue la vía sexual.

Se identificaron subtipos y CRFs introducidas en Cuba desde diferentes países del mundo, los cuales al mezclarse facilitaron la ocurrencia de recombinación, que está presente en un alto porcentaje en la población seropositiva cubana y permitió conocer que los subtipos B y No B, así como las CRF se encuentran en la actualidad distribuidos en todas las provincias y regiones del país.

No se encontraron diferencias en la transmisibilidad de los subtipos B y No B, así como entre los No B y las formas recombinantes que se encuentran en mayor proporción en la muestra estudiada.

No se encontró diferencias en la progresión clínica de la enfermedad entre los subtipos B y No B, aunque la proporción de enfermos y fallecidos predominó en el subtipo B, no existen diferencias en el tiempo en que enferman y fallecen los pacientes, lo que se puede explicar por prevalencia del subtipo B en la población seropositiva cubana desde los inicios de la epidemia, a la asociación de este subtipo al grupo de mayor riesgo (masculino/HSH) y a que comparten variables epidemiológicas y conductuales que potencian la eficiencia de la transmisión y la progresión, independiente del subtipo viral.

Conclusiones

1. Se demostró una elevada variabilidad en tres genes estructurales del VIH-1 en Cuba, expresada en subtipos, sub-subtipos y múltiples combinaciones recombinantes, con predominio del subtipo B con un alto grado de conservación en la población estudiada.
2. Debido a la elevada circulación de variantes virales y recombinantes del VIH-1 en Cuba, la secuenciación de ácidos nucleicos es el método que debe ser empleado en la vigilancia epidemiológica a nivel molecular, ya que los métodos de pesquisa muestran limitaciones.
3. Se encontró asociación del subtipo B con el sexo masculino y la orientación sexual hombres que tienen sexo con hombres y los No B con el sexo femenino y heterosexuales, donde la forma de contagio que predominó para ambos grupos B y No B, fue la vía sexual.
4. Se identificaron subtipos y CRF introducidos en Cuba desde diferentes países del mundo, los cuales al mezclarse facilitaron la ocurrencia de recombinación, que está presente en un alto porcentaje en la población seropositiva cubana y permitió conocer que los subtipos B y No B, así como las CRF se encuentran distribuidos en todas las provincias y regiones del país.
5. No se encontraron diferencias en la transmisibilidad de los subtipos B y No B, así como entre los No B y las formas recombinantes que se encuentran en mayor proporción en la muestra estudiada.
6. No se encontró diferencias en la progresión clínica de la enfermedad entre los subtipos B y No B, aunque la proporción de enfermos y fallecidos predominó en el subtipo B, no existen diferencias en el tiempo en que enferman y fallecen los

pacientes, lo que se puede explicar por prevalencia del subtipo B en la población seropositiva cubana desde los inicios de la epidemia, a la asociación de este subtipo al grupo de mayor riesgo (masculino/HSH) y a que comparten variables epidemiológicas y conductuales que potencian la eficiencia de la transmisión y la progresión de la enfermedad, independiente del subtipo viral.

Novedad científica

- El empleo del HMA *env/gag* (método propuesto por OMS/ONUSIDA), para el pesquiasaje a nivel molecular permitió por primera vez detectar en Cuba, la circulación de subtipos no referidos con anterioridad y la presencia de múltiples formas recombinantes del VIH-1, en la población seropositiva cubana.
- El estudio permitió profundizar en la epidemiología molecular del VIH-1, contribuyo al conocimiento de las características moleculares de la epidemia cubana.
- Se abordó por primera vez en Cuba un amplio estudio sobre la influencia de los subtipos virales en la transmisibilidad y progresión clínica de la enfermedad.

Importancia teórica

- Contribución durante más de 15 años al conocimiento de la variabilidad genética del VIH-1 en Cuba, con los estudios sobre caracterización molecular.
- Contribución al esclarecimiento de la transmisibilidad y progresión clínica de los diferentes subtipos virales de la epidemia en Cuba.

Importancia práctica

- El conocimiento generado es una herramienta valiosa para el desarrollo de estrategias con vistas a enfrentar las consecuencias de la epidemia en nuestras condiciones y para el diseño y aplicación de futuras vacunas en PVS en Cuba.
- El estudio brindó aportes en el establecimiento de metodologías para la caracterización molecular, debido a la elevada circulación de variantes virales y recombinantes del VIH-1 en Cuba, la secuenciación de ácidos nucleicos es el método que debe ser empleado en la vigilancia epidemiológica a nivel molecular, ya que los métodos de pesquisa muestran limitaciones.
- Contar con un proyecto de vigilancia epidemiológica de los subtipos que funciona desde 1997 hasta la actualidad en el LISIDA, en función del programa nacional ITS/VIH/sida del MINSAP.
- Contar con una base de datos actualizada (clínico-epidemiológica y molecular), y con banco de ADN y plasma caracterizado es una valiosa fuente de material para: estudios de validación de medios diagnósticos utilizados en el país; estudios de caracterización biológica de virus; estudio de predicción de co-receptores; estudio de vigilancia de la resistencia a las drogas antirretrovirales; elaboración de paneles para el control externo de la calidad como parte de las funciones del Laboratorio Nacional de Referencia de SIDA (LISIDA).

Referencias bibliográficas

- (1) Delwart EL, Hering B, Rodrigo AG, Mullins JI. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using heteroduplex mobility assay. PCR Meth Appl 1995; 4:202-16.
- (2) Gomez C, Fernandez J, Iglesias E, López A, Lobaina L, Noa E. Complete DNA sequence of the gene encoding the external glycoprotein (gp 120) from a Cuban HIV type I isolate. AIDS Res and Hum Retroviruses 1996; 12(6):553-5.
- (3) Gorry C. Cuba's National HIV/AIDS Program. MEDICC Review. 2011. 13(4): 5-8.
- (4) Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. J Virol 2000; 74:363-70.
- (5) Kandathil S, Ramalingam R, Kannangai S. Molecular epidemiology of HIV. Indian J Med Res 2005; 121:333-44.
- (6) Kijak GH, PharmD, McCutchan F. HIV Diversity, Molecular Epidemiology and the Role of Recombination. Current Infect Dis 2005; 7: 480–8.
- (7) Limia PE, Joanes J, Lantero MI. Sistema informatizado para el control y seguimiento de la epidemia de VIH/sida en Cuba. 2011. SLD181. [VIII Congreso Internacional de Informática en Salud. II Congreso Moodle Salud.](#)
- (8) Nájera R, Delgado E, Pérez L, Thomson M. El papel de la recombinación genética en el desarrollo de la pandemia del sida. Investig Clín Farm 2005; 2 (1): 9-22.
- (9) ONUSIDA Global Report, UNAIDS Report on the global AIDS Epidemic, 2012 Available from: http://www.unaids.org/global_report/default_es.htm.
- (10) Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. J Nat Med 2009; 15(8):871-2.
- (11) Quarleri JF, Rubio A, Carobene M, Turk G, Vignoles M, Harrigan RP, et al. HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: descriptive analysis from 284 patients under treatment failure. AIDS Res Hum Retroviruses 2004; 20(10):1100-7.
- (12) Resik S, Ping, Barrios J, Hoffman N, Pagan M, Kouri V, et al. Molecular characterization of HIV-1 transmission networks in Cuba. Int J Infect Dis. 2004; 8:208.

- (13) Requejo H.Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. Rev Saúde Púb 2006; 40(2):331-45.
- (14) Rolo F, Miranda L, Wainberg M, Gu Z, Lobaina L, Noa E. Envelope V₃ Region Sequences of Cuban HIV-1 Isolates. J. Acquir Immune Defic Syndr 1995; 9:123-5.
- (15) Taylor B, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. N Engl J Med 2008; 358:1590-602.