
Variabilidad genética del VIH-1 en Navarra

Genetic variability of HIV-1 in Navarra

J. Sola¹, I. Urtasun², J. Repáraz¹, J. Castiello¹

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), al igual que otros virus ARN, presenta alta variabilidad genética *in vivo*^{1,6}. Este hecho está mediado por mecanismos moleculares que incluyen mutaciones, recombinaciones, y frecuentes deleciones e inserciones^{7,8}. Esta evolución ha dado lugar a dos grupos: M o mayoritario y O, y a la descripción de 10 subtipos (A-J) dentro del grupo M^{9,10}. Estudios epidemiológicos han concluido que, en cada área geográfica, predomina un subtipo aunque cada vez es más frecuente su intercambio geográfico⁵. El subtipo B es el responsable de la primera epidemia en Europa, América del Norte y Australia^{5,6}.

El fenómeno de la variación genética plantea dos retos. El primero, la aparición de cepas de VIH-1 mutantes y resistentes a fármacos tanto en pacientes que no han sido tratados previamente (resistencia natural) como en pacientes que reciben tratamiento antiretroviral (resistencia adquirida)⁴. En segundo lugar, el desarrollo de un método efectivo de inmunización. El pro-

blema es doble porque existen variaciones espaciales y temporales. Por una parte, cada área geográfica presenta unos subtipos de VIH-1. Por otra, la distribución global de genotipos de VIH-1 evoluciona constantemente^{9,10}. Cualquier vacuna que se desarrolle frente al VIH deberá ser elaborada específicamente para cada área geográfica de forma que vaya dirigida contra los subtipos del virus presentes en dicho área¹¹.

Las variaciones genéticas y biológicas del VIH-1 se han relacionado con el curso de la enfermedad. Así, cepas macrofago-trópicas no inductoras de sincitios predominan en la etapa temprana y asintomática de la infección. Estas cepas mutan con el tiempo y generan otras no macrofago-trópicas e inductoras de sincitios que se imponen en las etapas avanzadas de la enfermedad¹².

La glicoproteína gp120 de la envuelta del VIH-1 está formada por 5 dominios variables (V1-V5) y 4 constantes (C1-C4). El dominio V3 está localizado entre los aminoácidos 296 y 331 y es el principal determinante del fenotipo biológico^{11,12}. Se ha sugerido que es la carga neta de V3 la que influye en el tro-

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 181-187.

1. Sección de Enfermedades Infecciosas. Hospital de Navarra.
2. Especialista en Microbiología y Parasitología.

Correspondencia:

Dr. Julio Sola Boneta
Sección de Enfermedades Infecciosas
Hospital de Navarra
C/ Irunlarrea s/n
31008 Pamplona
Tfno. 948 422100
Fax 948 171741

pismo celular y en la capacidad para formar sincitios debido a que, en el curso de la infección, se van sustituyendo aminoácidos cargados negativamente o sin carga por otros con carga positiva lo que modifica la estructura secundaria de la proteína y, con ello, sus propiedades biológicas¹²⁻¹⁴.

Por otra parte, el dominio V3 es la diana de la respuesta inmune⁹. Presenta un epítopo central, formado por un tetrapéptido en posiciones 17-20, con estructura secundaria b, que es reconocida por los linfocitos T citotóxicos y éstos sintetizan Ac neutralizantes^{11,14}. La secuencia consenso de las cepas de Europa y Norteamérica es altamente conservada y presenta Glicina-Prolina-Glicina-Arginina (GPGR) como tetrapéptido central de la V3 en el 63-80% de las cepas según las series estudiadas. La secuencia consenso de las cepas africanas presentan Glicina-Prolina-Glicina-Glutamina (GPGQ)¹¹.

Inicialmente, se abordó el subtipado de VIH-1 mediante técnicas de serología pero se comprobó que el número de reacciones cruzadas entre subtipos era demasiado alto para ser una prueba válida. Actualmente, se utilizan sólo como prueba de screening. Sin embargo, el estudio del VIH-1 mediante genotipado por análisis filogenético de fragmentos del gen *env* es un método veraz que permite identificar con fidelidad los subtipos⁵. Es, por lo tanto, el método de elección. Estudiar fragmentos más largos puede cambiar la topología del árbol filogenético pero no altera la designación de subtipo⁵. Los alineamientos de secuencias de *pol* y *env* han sido empleados para el establecimiento de relaciones filogenéticas entre aislados. Es necesario tratar estas secuencias con extremo cuidado evitando errores que puedan falsear los resultados de su análisis¹⁵.

Las distancias genéticas calculadas en VIH y expresadas en % de divergencia son: entre VIH-1 y VIH-2, 50 %; entre el grupo M y el O, 35 %; entre los subtipos del grupo M, 25 %; entre cepas del mismo subtipo, alrededor del 12 % (aumenta con el tiempo y con la distancia geográfica); entre las cepas del mismo individuo pero en distinto tiempo, alrededor del 3,5 % y entre las cepas de un individuo en el mismo tiempo, alrededor del 2 %.

Estudios con el objeto de conocer los subtipos de VIH circulantes se han llevado a cabo en otras áreas geográficas de América (USA, Brasil), Asia (Tailandia), África

(Marruecos, Uganda), y Europa (Francia, Italia, Holanda, Reino Unido) y en España en la Comunidad de Madrid. En Navarra no se ha realizado ningún estudio con este objeto. Pensamos que es de interés, clínico y epidemiológico, porque ayuda a conocer características específicas de la infección en nuestro medio como punto de partida para optimar los recursos económicos y las medidas asistenciales destinadas a esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de los pacientes

Treinta y cuatro personas infectadas por VIH-1, que acudieron a la consulta de Enfermedades Infecciosas del Hospital de Navarra durante el periodo comprendido entre Octubre de 1995 y Octubre de 1997, fueron seleccionados para este estudio. Ninguna de ellas había recibido anteriormente tratamiento antiretroviral.

Muestras

De cada paciente se obtuvieron 8 ml de sangre periférica que se recogieron en tubos con EDTA. Siete mililitros de muestra se destinaron a la obtención de los linfocitos y el resto de la sangre se destinó a la extracción directa del ADN celular.

Obtención de los linfocitos

Se separaron los linfocitos mediante centrifugación en gradiente de densidad. Se tomó un tubo para centrifuga estéril con capacidad para 15 ml y se añadieron 3,5 ml de una solución separadora de linfocitos comercial. Se adicionó la sangre total sin diluir dejándola resbalar lentamente por la pared del tubo para que quede situada encima de la solución separadora de linfocitos. Se centrifugó 10 minutos a 626 g (2000 r.p.m.).

Se recogió la banda de linfocitos y se transfirió a un nuevo tubo para centrifuga. Se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 225 g (1200 r.p.m.). Se desechó el sobrenadante. Se resuspendieron los linfocitos en 1 ml de PBS de pH = 7,4 y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

Extracción del ADN celular

Inicialmente, el ADN total de las células infectadas se extrajo directamente de 300 ml de sangre completa. Se utilizó el Kit

comercial "Wizard genomic DNA purification kit" de Laboratorio Promega. La extracción del ADN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se guardó seco a -70 °C hasta el momento de su uso. Antes de la amplificación del ADN, éste se rehidrató con una solución tampón a temperatura ambiente durante 24 horas y se guardó a -20 °C.

Extracción del ADN de los linfocitos

En los casos en los que no se consiguió suficiente cantidad de ADN tras doble amplificación por PCR, se extrajo nuevamente el ADN celular de los linfocitos congelados. La extracción se llevó a cabo con el mismo kit y siguiendo el mismo procedimiento.

Amplificación del ADN

Se llevó a cabo mediante una doble reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se optimizaron las condiciones de PCR para cada muestra. El fragmento amplificado codifica el dominio V3 entero y parte de los dominios C2 y C3.

Primera PCR

Amplificación de un fragmento de 2665 pares de bases (correspondientes a las posiciones 6008-8673 de la secuencia completa del genoma del VIH-1) que se incluyen en el gen *env* y que codifica casi toda la Gp 120 y parte del péptido de fusión.

La mezcla de la reacción (50 ml) contenía 12,5 mM de cada desoxinucleótido (dNTP), 100 ng/ml de cada iniciador, 1,5 mM de Mg²⁺ y 1U de Taq polimerasa. La cantidad de muestra que se agregó a la mezcla de reacción fue variable. Los siguientes iniciadores se utilizaron: 60EU (24 bases y secuencia 5'GCCACACATGCCTGTGTACCCACA3') como hebra sentido del ADN (up) y 50EBND (29 bases y secuencia 5'TAGCCCTTCCAGTCCCCCTTTTCTTTTA3') como hebra antisentido (down). El proceso de amplificación se realizó utilizando el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización a 94°C/5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C/30 segundos, hibridación a 55 °C/1 minuto y extensión a 72 °C/2 minutos. La amplificación fue completada con un paso de extensión final a 72 °C/10 minutos.

Segunda PCR o PCR nested

Amplificación de un fragmento de 324 pares de bases (correspondientes a las

posiciones 6584-6908 del genoma completo del VIH-1) y que codifica el fragmento que va desde mitad de C2 hasta mitad de C3 de la glicoproteína Gp 120.

La mezcla de la reacción (50 ml) contenía 12,5 mM de cada dNTP, 100 ng/ml de cada iniciador, 2 mM de Mg²⁺, 1U de Taq polimerasa y 1-2 ml del producto de la primera PCR. Los siguientes iniciadores se utilizaron: 27EU (26 bases y secuencia 5'ATAAGCTTGCAGTCTAGCAGAAGAAG3') como hebra sentido del ADN (up) y 28DE (26 bases y secuencia 5'ATGAATTCTGGGTCCCCTCCTGAGGA3') como hebra antisentido (down). El proceso de amplificación se realizó utilizando el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización a 94°C/5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C/30 segundos, hibridación a 55 °C/1 minuto, y extensión a 72 °C/1 minuto. La amplificación fue completada con un paso de extensión final a 72 °C/10 minutos.

Verificación de la amplificación

Una vez obtenido el producto de amplificación, se visualizó, mediante electroforesis vertical, en un gel de acrilamida durante 2 horas a 120 V y posterior tinción con bromuro de etidio. La identificación se hace por tamaño, en comparación con un marcador de peso molecular comercial. Los geles teñidos con bromuro de etidio se visualizaron con luz UV en transiluminador y se dejó constancia gráfica del resultado mediante fotografía instantánea.

Secuenciación

Purificación del producto de la PCR

Se utilizó el kit comercial "High Pure PCR Product Purification kit" del Laboratorio Boehringer Mannheim. La purificación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Secuenciación cíclica del ADN

Las muestras fueron secuenciadas mediante proceso cíclico utilizando el kit comercial "f-mol DNA cycle sequencing system sample" de Laboratorios Promega. Este proceso exige la adición de un dNTP marcado radiactivamente. Se utilizó dATP marcado con ³⁵S. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el mismo iniciador 27EU de

la segunda PCR. Como producto del proceso de secuenciación, se obtuvo una mezcla de fragmentos de ADN que contenía fragmentos de todos los tamaños posibles.

Electroforesis

Una vez terminado el proceso de secuenciación, los fragmentos de ADN obtenidos se separaron mediante electroforesis vertical en gel de acrilamida al 6% durante 3 horas a 45 w.

Autoradiografía

Cuando terminó la electroforesis, se secó el gel a 80 °C durante 1 hora. Cada fragmento de ADN emite una radiación capaz de impresionar una película fotográfica. Este proceso se prolongó durante 48 horas. La película se reveló y la lectura de señales sirvió para reconstruir la secuencia del fragmento de ADN.

Análisis filogenético

Las secuencias de los ácidos nucleicos se redujeron a una longitud común y se alinearon con secuencias representativas de

los distintos subtipos del grupo M de VIH-1 (subtipos A, C, D, E, F, G, H y los aislados RF, MN, SF2 y LAI del subtipo B). Los alineamientos, tanto de las secuencias de ácidos nucleicos como de aminoácidos, se realizaron con el programa "Clustal X" y corregidos después manualmente.

El análisis filogenético de los alineamientos se realizó con el programa Phylip. Las distancias genéticas entre cada par de aislados se calcularon usando el programa DNAdist (método Kimura dos-parámetros) y las asociaciones filogenéticas se determinaron usando el método *neighbor-joining*.

RESULTADOS

En este estudio hemos analizado la región V3 de la glicoproteína gp120 de la envuelta del VIH-1. Treinta y cuatro muestras se han estudiado. El ADN proviral de cada muestra ha sido sometido a amplificación por PCR y secuenciación cíclica. Las secuencias de nucleótidos se traducen en secuencias de aminoácidos y se muestran en la Tabla 1. Los aminoácidos idénticos

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de la V₃ de la Gp120.

	1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1
NA3	TIIVQLKEPV	KINCTRPNNN	TRKSINIG--	-PGRFYATG	DIIGDIRQAH	CNVSLAEWNK	TLTKIVAKLR	E
NA40NKS.	E.....M.....T.....N.....I.KKD.NKQ.G...	
NA44T.S.	D.H.....T.....T.....I.RTK.DRQ.S...	
NA26NDT.	D.H.....Q.H.....S.H.T.EV.....L.M.K.NS.KQTAS...	
NA36NHT.	D.H.....Q.R.....S.H.T.I.R.K.RDRHVAS...	
NA33NDTIS.....G.H.....G.T.....T.....I.R.S.SGQ.ARQ...	
NA35AIQ.....H.....K.T.....I.R.A.AKQ.AK...	
NA1H.N.S.	E.....R.....V.L.....I.S.NRQV.D...	
NA51N.SI	V.....G.....R.P.....T.....I.R.K.NKQV.K...	
NA28H.N.SI	Q.....R.....P.M.....T.I.G.KY.AN...K	
NA14	I.....NQSI	E.H.....R.P.M.....F.....Y.YL.R.K.VTS.KQV.S.S	
NA23NKSI	D.Y.....Q.P.....K.T.....A.....L.GE.GA.KQV.G...	
NA11T.AI	D.....Q.....T.....Q.....R.RLGDQQ.AK...	
NA37NDSI	D.....T.....Q.VP.....H.....L.ITQ.NRH.AK..I	
NA30	P.....NKSI	A.H.T.....QG.H.....HS.....H.L.G.KNRQVAI.G	
NA47NDSI	E.....P.....Y.....L.R.NQQ.AI...	
NA7T.AI	E.....I.....EG.HF.....G.TA.QT.I.S.K.NKQ.K...	
NA20N.SI	I.....H.....EG.H.....AE.Q.VL.YEQ.NKQV.D...	
NA52I	E.....H.....TA.E.....L.R.T.NKQ.R...	
NA25	V.....I	E.....E.....P.M.....F.....V.....I.G.R.NKQ.KR..G	
NA21Q.....Q.H.....L.L.....I.G.Q.NKQV.N..K	
NA27T.A.	EVH.....QG.H.....H.A.EE.....I.RT.NS.R.K	
NA8NAS.	E.....R.....S.T.....E.....I.E.K.ENRQ.AK...	
NA45D.S.	E.....G.H.....T.....I.K.K.ENA.EQ.AK...	
NA18	I.....NKT.	E.....R.....L.K.DGKQ.AI...	
NA39N.SI	V.....H.....R.....I.RTK.NEQ.TK...	
NA13	V.....N.S.	V.H.....QG.R.....VH.RI.R.D.NRQ.AI...	
NA16	V.....H.N.A.	A.T.....S.....D.....P.....E.....I.RKD.NE.AT...	
NA24	V.....H.N.S.	E.....L.IR.HV.HVG.I.TK.....I.R.K.NKQ.T...	
NA22	I.....H.N.S.	E.....QG.HL.....G.R.....S.....L.SVK.DGQ.K...	
NA6N.TI	E.....EG.H.....I.S.K.VKQ.T.G	
NA10NGSI	A.D.....E.P.....T.....G.....I.R.K.GKQ.S.G	
NA34	M.....N.SI	EMD.....E.H.....K.....Y.....INRTK.QAKQ.T...	
NA15	A.....SQS.D.....EG.H.....T.....M.....L.R.TGKQ.I.S	
NA32N.SI	A.E.A.....R.H.....K.H.....EV.....INRTG.GA.A.K...	

cos entre secuencias están representados por puntos; se introducen guiones para alinear las secuencias cuando una de ellas presenta deleciones.

Las regiones V3 analizadas tienen una longitud de 35-37 aminoácidos. Na-3 presenta una deleción doble en las posiciones 15 y 16, Na-51 y Na-45 sendas deleciones en posición 26 y Na-26 una deleción en posición 27. El análisis de la secuencia de aminoácidos demuestra que el tetrapéptido central GPGR está presente en 25 muestras. En las restantes cepas se ha sustituido Arginina por Serina (Na-36), por Glicina (Na-33, Na-7 y Na-22), o por Lisina (Na-35, Na-23, Na-32 y Na-34) y Prolina por Leucina (Na-21).

Una vez alineadas las secuencias, se calculó las distancias genéticas de cada muestra a un supuesto ancestro común del que se supone derivan todas las muestras. El intervalo de distancias genéticas a este ancestro es 3,5 % (Na-52)-11,6 % (Na-14) con un valor medio de 7,9 %. Las divergencias genéticas se determinan calculando las distancias genéticas que separan a

cada una de las muestras con todas las demás. El intervalo de divergencias es 7-25 % con un valor medio de 15,9 % (Fig. 1).

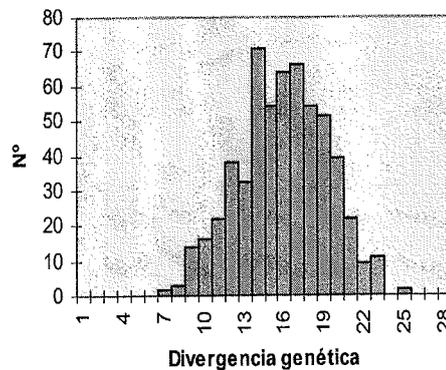


Figura 1. Divergencias genéticas V3 Navarra.

En el árbol filogenético, todas las secuencias navarras están situadas en la rama que representa el genotipo B (Fig. 2).

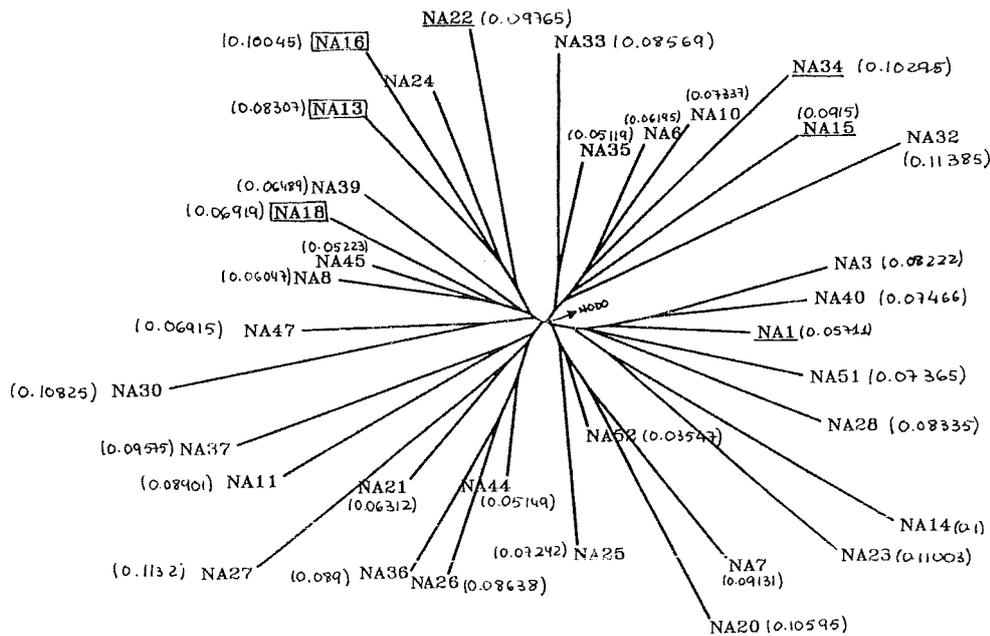


Figura 2. Árbol filogenético con distancias genéticas. Subrayados: Homosexuales. Encuadrados: Virus con una característica muy europea.

La mayoría de los pacientes entraron en el estudio en el momento en que se confirmó su seropositividad frente al VIH-1. Analizando los datos epidemiológicos se concluye que la infección por VIH-1 se está diagnosticando sobre todo en hombres (82,3 %), usuarios de drogas por vía parenteral (79,4 %) y de edad superior a 30 años (67,6 %).

DISCUSIÓN

Analizando el fragmento del gen *env* que codifica C2-V3-C3 de la glicoproteína gp120 de la envuelta del VIH-1, es posible generar un árbol filogenético que es estadísticamente fiable y que agrupa las cepas de VIH en subtipos. Nuestros resultados indican que el serotipo de VIH-1 más frecuente en la Comunidad Foral de Navarra es el B. Este resultado está de acuerdo los datos publicados previamente referentes a que el más prevalente en Europa es el subtipo B.

La secuencia GPGR en el tetrapéptido central de la V3 está presente en el 73,5 % de las cepas (n = 25). Las cepas que han perdido la secuencia GPGR presentan GPGK el 11,8 % (Na-35, Na-23, Na-32 y Na-34), GPGG el 8,8 % (Na-33, Na-7 y Na-22), GPGS el 2,9 % (Na-36) y GLGR otro 2,9 % (Na-21).

El perfil del paciente infectado por VIH-1 en la Comunidad Foral de Navarra es varón, usuario actual o en el pasado de drogas por vía parenteral y de edad superior a 30 años. La contribución de la vía de transmisión ha sido difícil de evaluar porque el número de muestras cuya transmisión ha sido sexual es muy pequeño frente al de transmisión parenteral.

Los resultados hasta ahora obtenidos son escasos. Este trabajo podría completarse estudiando otras zonas de la glicoproteína Gp 120 y el péptido de fusión. Asimismo, están puestas las bases para estudiar el gen *pol* y detectar resistencias naturales y adquiridas frente a los antiretrovirales empleados en la terapia de la infección por VIH-1.

Agradecimientos

Al equipo de enfermería de la consulta de Enfermedades Infecciosas por su colaboración en la toma de muestras.

A Cecilio López Galíndez y a Concha Casado Herrero del Departamento de Virología Molecular, Centro de Biología Fundamental del Instituto de Salud Carlos III, por su inestimable colaboración en el análisis e interpretación de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. PANG S, SHLESINGER Y, DAAR ES, MOUDGIL T, HO DD, CHEN ISY. Rapid generation of sequence variation during primary HIV-1 infection. *AIDS* 1992; 6: 453-460.
2. ROJAS JM, DOPAZO J, NAJERA I, SANCHEZ-PALOMINO S, OLIVARES I, MARTIN MJ et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Madrid. *Virus Res* 1994; 31: 331-342.
3. ZHU T, MO H, WANG N, NAM D, CAO Y et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* 1993; 261: 1179-1181.
4. LI Y, HUI H, BURGESS CJ, PRICE RW, SHARP PM, HAHN BH et al. Complete nucleotide sequence, genome organization, and biological properties of Human Immunodeficiency Virus type 1 in vivo: evidence for limited defectiveness and complementation. *J Virol* 1992; 66: 6587-6600.
5. BRENNAN CA, LUND JK, GOLDEN A, YAMAGUCHI J, VALLARI AS, PHILLIPS JF et al. Serologic and phylogenetic characterization of HIV-1 subtypes in Uganda. *AIDS* 1997; 11: 1823-1832.
6. BARIN F, COUROUCE A.M, PILLONEL J, BUCELAY L. Increasing diversity of HIV-1M serotypes in French blood donors over a 10-year period (1985-1995). Retrovirus Study Group of the French Society of Blood Transfusion. *AIDS* 1997; 11: 1503-1508.
7. DOMINGO E, QUIÑONES-MATEU M.E, HOLGUÍN A, MAS A, SORIANO V, GUTIERREZ-RIVAS M, MENÉNDEZ L. Variabilidad en VIH. *SESIDA* 1997; 8: 180-182.
8. McCUTCHAN E, SALMINEN M O, CARR JC, BURKE DS. HIV genetic diversity. XI International Conference on AIDS 1996.
9. McCUTCHAN FE, ARTENSTEIN AW, SANDERS-BUELL E, SALMINEN MO, CARR JK, MASCOLA JR et al. Diversity of the envelope glycoprotein among Human Immunodeficiency Virus type 1 isolates of clade E from Asia and Africa. *J Virol* 1996; 70: 3331-3338.
10. ELHARTI E, ELAOUAD R, AMZAZI S, HIMMICH H, ELHACHIMI Z, APRETEI C et al. HIV-1 diversity in Morocco. *AIDS* 1997; 11: 1781-1783.

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIH-1 EN NAVARRA

11. COUTO-FERNANDEZ JC, JANSSENS W, HEYNDRICKX L, MOTTE J, FRANSEN K, PEETERS M et al. Genetic and antigenic variability of HIV type 1 in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1157-1163.
12. CHESEBRO B, WEHRLY K, NISHIO J, PERRYMAN S. Mapping of independent V3 envelope determinants of Human Immunodeficiency Virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol* 1996; 70: 9055-9059.
13. FOUCHIER RAM, GROENINK M, KOOTSTRA NA, TERSMETTE M, HUISMAN HG, MIEDEMA F et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the Human Immunodeficiency Virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992; 66: 3183-3187.
14. DE JONG JJ, GOUDSMIT J, KEULEN W, KLAVER B, KRONE W, TERSMETTE M et al. Human Immunodeficiency Virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* 1992; 66: 757-765.
15. LEARN G H, KORBER BT. M; FOLEY B, HAHN BH, WOLINSKY SM, MULLINS JI. Maintaining the integrity of Human Immunodeficiency Virus sequence databases. *J Virol* 1996 ; 70 : 5720-5730.