

Análisis moleculares en el estudio de las enfermedades emergentes

Molecular analysis in the study of emerging infectious diseases

Francisco Javier Díaz,¹ MD, Ph.D.

¹Universidad de Antioquia, Grupo Inmunovirología, Medellín, Colombia.

La disponibilidad cada vez mas amplia de métodos eficientes y económicos para la secuenciación de ácidos nucleicos y los recientes desarrollos teóricos en el entendimiento de la evolución a nivel molecular, han abierto nuevas formas de descubrir y describir las enfermedades infecciosas, investigar sus orígenes y probar las hipótesis relacionadas con las condiciones que posibilitan su emergencia. Esta presentación no esta dirigida a explicar la teoría o la mecánica de tales métodos si no a demostrar algunas de sus posibles aplicaciones con ejemplos de los sucesos recientes en el campo de las enfermedades emergentes.

Uno de estos ejemplos nos remite al brote de encefalitis que afectó a varios ciudadanos de Nueva York en el verano de 1999, causando al mismo tiempo una gran mortalidad en aves urbanas en esa ciudad. Los estudios serológicos enfocados a los agentes conocidos de esa enfermedad en los Estados Unidos sugirieron que se trataba del virus de la Encefalitis de St. Louis (SLEV), un arbovirus del género *Flavivirus*, como posible agente etiológico, no obstante que solo algunos de los sueros mostraron una débil reactividad para ese virus. Sin embargo, para el momento del final de la epidemia ese fue el diagnóstico oficial. Varios meses después un grupo de

investigadores en una universidad del Estado de California logró amplificar un segmento del genoma de ese virus y luego procedió a secuenciarlo y analizarlo filogenéticamente. El resultado fue una sorpresa mayor para todos. Se trataba de un agente nunca antes detectado en el continente americano, el Virus de Oeste del Nilo (VON), hasta ese entonces sólo reportado en África, Europa y el Medio Oriente (1).

El análisis detallado de fragmentos de genoma del VON mostraron inequívocamente que el virus venía del Medio Oriente por su identidad de casi 100% con un aislado de ese virus obtenido en Israel el año anterior y que hacia parte de una cepa especialmente virulenta que venía circulando desde 1995 en Europa y varios países asiáticos (2). Este descubrimiento permitió el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas, el descubrimiento del mecanismo de hibernación del agente y el posterior seguimiento de la dispersión del virus en los Estados Unidos y en las Américas. En los años siguientes se observó la aparición de una nueva variante, llamada la cepa Texas, que es ahora la predominante en este continente. En los 10 años siguientes a su aparición en los Estados Unidos el VON ha causado mas de 10.000 muertes en

humanos, cuantiosas pérdidas en la industria equina y una redistribución de las especies de aves de Norteamérica.

En el transcurso de estas mismas investigaciones se descubrió además que el virus Kunjin, otro agente del grupo de los Flavivirus descrito años antes en Australia, no era mas que una cepa del mismo VON (2). Este hallazgo expande aun más la distribución conocida del VON a al menos 5 continentes y plantea interrogantes sobre el significado de los recientes hallazgos de anticuerpos contra este virus en nuestro país.

Otro arbovirus muy diseminado también pertenece al género de los Flavivirus y es un viejo conocido de todos nosotros, el virus del dengue (DENV), el cual ha llegado a ser un líder mundial en términos de morbilidad y mortalidad. La evolución molecular de este agente ha sido estudiada exhaustivamente. En uno de los primeros trabajos se descubrió que la súbita aparición del dengue hemorrágico en Las Américas en 1981 coincidía con la introducción de una variante o subtipo del DENV-2 procedente del sureste asiático (3). La comparación detallada de esta variante y del subtipo "nativo" de las Américas ha permitido identificar mutaciones asociadas a virulencia importantes en el diseño de vacunas para este agente (4).

Este mismo descubrimiento ha llevado a reconocer que la introducción de variantes foráneas de un serotipo ya presente puede ser uno de los determinantes del comportamiento agresivo del DENV. Este hecho cobra importancia en el momento actual por el reciente reporte de un nuevo subtipo o variante de DENV-3 identificado en Brasil y más recientemente en Colombia y el cual ha sido asociado a casos dengue severo (5). Sin embargo la secuencia genética de esta variante presenta algunas particularidades que permiten cuestionar su real existencia. La misma metodología filogenética nos permite testar la hipótesis de la introducción de la nueva variante. Aquí se presentarán

resultados de análisis moleculares que nos permiten arrojar luz sobre este importante asunto.

Otro ejemplo interesante de la utilidad de los análisis moleculares es el del Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH). En una secuencia de hallazgos similares a las del caso del VON, estos agentes fueron descubiertos en 1993 en los Estados Unidos en el transcurso de una epidemia que comprometió a 42 personas, 26 (62%) de las cuales fallecieron. Inicialmente se encontró una débil reactividad de uno de los sueros a un Hantavirus del viejo mundo. Con este dato se desarrollaron "primers" que permitieron amplificar segmentos del genoma de un nuevo virus de este género y posteriormente desarrollar pruebas serológicas sensibles y específicas que han confirmado, hasta el año 2009, 534 casos del SPH con una letalidad del 37% en sólo los Estados Unidos (6). Estos mismos métodos han llevado a descubrir una gran variedad de agentes de este género, cada uno asociado a un roedor diferente, diseminados en casi todos los países de las Américas. Hasta hace poco Colombia no figuraba en esta lista de países con presencia de Hantavirus. Estudios recientes, utilizando inicialmente pruebas serológicas y luego técnicas moleculares, han permitido demostrar la presencia de al menos un Hantavirus en la Costa Atlántica de este país. Los estudios filogenéticos nos permiten explorar si se trata o no de un nuevo agente, así como explorar su parentesco genético con otros Hantavirus y lanzar hipótesis sobre su origen.

Un aspecto único de los Hantavirus es el paralelo casi perfecto entre los árboles filogenéticos de estos agentes y el de sus hospederos vertebrados (7). Estos estudios, han llevado a la conclusión de que cada Hantavirus se ha asociado a su roedor reservorio desde el mismo momento de la especiación de estos últimos. En otras palabras los Hantavirus no han aparecido recientemente si no que ya prevalecían en los roedores ancestrales que colonizaron el continente

americano y han coevolucionado con ellos en una especie de simbiosis que no afecta al hospedero habitual. Basados en este hallazgo, la observación de la estructura del árbol filogenético de los Hantavirus americanos nos ilumina la historia de la colonización de las Américas por los roedores de la subfamilia *Sigmodontine* y por sus virus asociados

Los anteriores ejemplos nos permiten definir algunas de las aplicaciones del análisis molecular en las enfermedades emergentes: identificar exactamente el agente causal, inferir su origen, investigar las bases moleculares de su virulencia y describir algunos aspectos ecológicos y de la interacción con sus hospederos, aclarando aspectos claves de su comportamiento clínico y epidemiológico.

REFERENCIAS

1. Briese T, Jia XY, Huang C, Grady LJ, Lipkin WI. Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *The Lancet* 1999; 354:1261-2.
2. Lancitti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 1999; 286:2333-6.
3. Rico-Hesse R, Harrison RM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997; 230:244-51.
4. Leitmeyer KC, Vaughan DW, Watts DM, Salas R et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999; 73:4738-47.
5. Usme-Ciro JA, Mendez JA, Tenorio A, Rey GJ, et al. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia. *Virology* 2008; 5:101-12.
6. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 1993; 262:914-7.
7. Jackson AP, Charleston MA. A Cophylogenetic Perspective of RNA-Virus Evolution. *Mol Biol Evol* 2004; 21:45-57.