

Para superar fronteras

La secuenciación genética en tiempo real reconstruye el itinerario del virus del Zika por América

Maria Guimarães y Karina Toledo (de Agência FAPESP)

PUBLICADO EN JUNIO DE 2017

El virus del Zika llegó al noreste brasileño un año y medio antes de ser identificado como un enemigo público. Eso es lo que se informa en dos artículos redactados por grupos de investigadores distintos y publicados el día 24 de mayo en la revista *Nature*. El virus se difundió velozmente, sacando partido de los mosquitos de la especie *Aedes aegypti* y de una población humana cuyo sistema inmunológico no poseía anticuerpos contra el mismo, además de camuflarse entre los síntomas del dengue y del chikunguña. Los científicos trabajaron en forma simultánea, con diferentes recursos y con un objetivo común: monitorear la evolución del genoma viral, tanto para entender lo que ocurrió como para prever brotes y mantener los métodos de diagnóstico actualizados.

Parte de los resultados surgen a partir del proyecto ZiBRA (Análisis del Zika en Brasil en Tiempo Real). A bordo de un laboratorio móvil y provisto con una tecnología de secuenciación genética que cabe en la palma de la mano, un grupo internacional estudia la trayectoria del virus del Zika desde que el mismo desembarcó en Brasil y comenzó a propagarse por América. La secuenciación completa

del genoma quedó a disposición de otros grupos de investigación, lo cual permitió ampliar el alcance del trabajo. “La combinación de datos epidemiológicos y genéticos nos permitió advertir que el zika circuló en forma inadvertida por todas las regiones de América durante al menos un año antes de que fuera identificado el virus, en mayo de 2015”, dice el biomédico portugués Nuno Faria, de la Universidad de Oxford, en el Reino Unido, primer autor del artículo que describe los resultados del monitoreo efectuado en 2016.

Según estima Faria, el virus se introdujo en el noreste brasileño en febrero de 2014. En aquel año, es probable que haya tenido lugar alguna transmisión por la región, aunque no demasiado acentuada. “El gran brote epidémico se produjo muy probablemente en 2015, en simultáneo con el del dengue. Desde el noreste, el virus del Zika se habría difundido hacia el sudeste de Brasil [inicialmente en Río de Janeiro] y también hacia el Caribe y otros países de América del Sur y Centroamérica, llegando hasta la península de Florida”, relata.

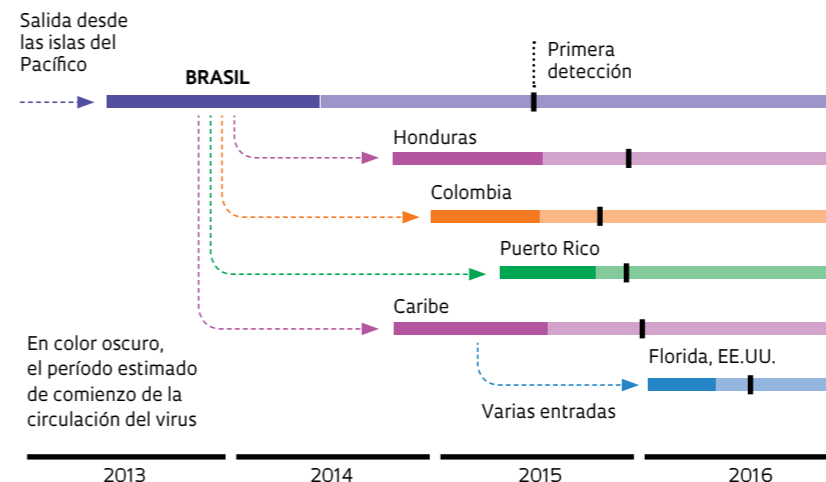
Las conclusiones a las que se arribó en el marco del Proyecto ZiBRA se basan en el análisis de 254 genomas completos

del patógeno, 54 de los cuales fueron secuenciados para el estudio publicado en la revista *Nature*. La mayor parte de esos nuevos datos genéticos se obtuvieron gracias a un secuenciador portátil conocido por la sigla MinION, desarrollado por la empresa Oxford Nanopore Technologies, que pesa menos de 100 gramos. Los protocolos que permitieron el uso de esa tecnología para la secuenciación del Zika fueron desarrollados en el ámbito del proyecto ZiBRA y constituyeron la base de un segundo artículo, que fue publicado el mismo día en la revista *Nature Protocols*. La adaptación de dicho método para el virus circulante en Brasil se realizó en el Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, en la Universidad de São Paulo (IMT-USP), bajo la coordinación de la epidemióloga Ester Sabino y en un trabajo conjunto con colaboradores de la Universidad de Birmingham, en el Reino Unido. “Nuestra pasante Ingra Claro testeaba las muestras según las instrucciones de Joshua [Quick, primer autor del artículo sobre dicho método], para obtener una cantidad suficiente de ARN del virus”, explica Sabino.

Cuanto mayor es la cantidad de secuencias generadas, añade la investiga-

Migración rápida y discreta

En todos los países a los que llegó a partir del noreste brasileño pasaron meses hasta que la enfermedad fue detectada



FUENTE WOROBEY, NATURE

dora, más fácil se hace entender cuándo ingresó el virus al país, cómo se difundió por el continente y, principalmente, de qué manera está evolucionando. Este análisis es posible gracias a la técnica conocida como reloj molecular, que analiza la acumulación de alteraciones en ciertos genes. Estas modificaciones se producen a una tasa relativamente constante y los genes funcionan como si fuesen cronómetros, indicando el tiempo de divergencia entre aislados virales.

UN LABORATORIO EN LA CALLE

“La idea del proyecto surgió en 2016, cuando parte del grupo publicó en la revista *Science* los primeros hallazgos epidemiológicos y genéticos del virus del Zika en América. Habíamos secuenciado siete aislados virales, pero la cantidad de muestras resultaba insuficiente para disponer de una noción amplia de la diversidad del virus en el continente”, informa el genetista Luiz Carlos Alcântara, de la Fundación Oswaldo Cruz (Fiocruz) en el estado brasileño de Bahía.

El proyecto ZiBRA fue aprobado en el marco de un llamado a la presentación de propuestas emitido en forma conjunta por las agencias de fomento británicas

Un laboratorio montado en un ómnibus visitó en 2016 los estados de Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco y Alagoas

Medical Research Council, Newton Fund y Wellcome Trust. Investigadores de diversas instituciones (Fiocruz, Instituto Evandro Chagas, Ministerio de Salud, USP y las universidades de Birmingham y Oxford) se sumaron a esos esfuerzos.

Un laboratorio montado en un autobús visitó, a lo largo de 2016, los Laboratorios Centrales de Salud Pública

(Lacen) de los estados de Rio Grande do Norte, de Paraíba, de Pernambuco y de Alagoas. Además de Alcântara, Faria y Sabino, también fueron coordinadores de la iniciativa los investigadores Nicholas Loman, de la Universidad de Birmingham, Oliver Pybus, de la Universidad de Oxford y Marcio Nunes, del Instituto Evandro Chagas, del estado de Pará. “En cada Lacen analizamos entre 300 y 400 muestras de sangre de pacientes con sospecha de portar el virus del Zika, totalizando 1.330 análisis. Hacíamos el diagnóstico en tiempo real y, cuando el mismo daba positivo, se secuenciaba el material genético del virus”, relata Alcântara.

Con ayuda de los laboratorios fijos en la Fiocruz de Bahía, en Salvador, y en el IMT, en São Paulo, el grupo también evaluó muestras provenientes de la región sudeste y del estado brasileño de Tocantins. En Estados Unidos, otros colaboradores secuenciaron los genomas de cuatro aislados virales de México y cinco de Colombia. “Esos análisis revelaron que los virus detectados hasta 2016 en las diversas regiones brasileñas y en sus vecinos latinoamericanos aún no presentaban una gran diversidad”, dice Alcântara.



Jaqueline Goes de Jesus, de la Fiocruz, y Nuno Faria utilizan el MinION durante un monitoreo en João Pessoa, en el estado brasileño de Paraíba

De acuerdo con el investigador, el virus originario de África llegó al continente asiático poco antes de 2007, cuando provocó la primera epidemia en Micronesia. Más tarde se registraron nuevos brotes en Filipinas (2012) y en la Polinesia Francesa (2013 y 2014). Luego llegó a Brasil, donde se registró la mayor cantidad de casos hasta ahora (en el mes de diciembre de 2016 eran más de 200 mil). “Desde que salió del continente africano, el virus mutó bastante. Probablemente, dentro de siete o diez años su diversidad en América será bastante mayor. Necesitamos realizar un control genómico para estar preparados en caso de que surja un nuevo brote”, recomienda Alcântara.

Además de ayudar a los Lacen en el diagnóstico de cientos de casos sospechosos, los investigadores del ZiBRA capacitan a equipos para efectuar un control genómico a partir del MinION. Ahora ha empezado una nueva etapa del proyecto en la cual, más allá del Zika, serán monitoreados los virus del dengue, del chikunguña y de la fiebre amarilla. “En Manaus montaremos un laboratorio fijo para analizar muestras de los Lacen de los estados de Amapá, Acre, Amazonas, Roraima y Rondônia. En octubre, iremos con un laboratorio móvil a la región centro-oeste y, en marzo de 2018, continuaremos hacia el sudeste”, anticipa Alcântara.

MONITOREO EN EL LABORATORIO

El seguimiento en tiempo real también es el objetivo de otro grupo de trabajo internacional, si bien los análisis genéticos se realizan en laboratorios fijos. Parte de los procedimientos fueron los

Con un control genético y redes establecidas disminuyen los riesgos de que los investigadores sean tomados por sorpresa

mismos, utilizando en aparatos más potentes los protocolos desarrollados para el MinION. “Fueron enfoques complementarios”, analiza la genetista Bronwyn MacInnis, del Instituto Broad, en Estados Unidos. El trabajo que ella coordinó, en colaboración con su colega Pardis Sabeti, implicó la secuenciación de 110 genomas del virus del Zika recolectados en 10 países. Las conclusiones similares obtenidas por distintos caminos por los dos equipos refuerzan las interpretaciones y validan nuevas técnicas de secuenciación, abriendo nuevas posibilidades de seguimiento de epidemias.

Una dificultad que constituyó un reto para ambos grupos fue la baja carga viral (viremia) que se reveló como algo típico de la infección por el virus del Zika. “Cuando el paciente busca ayuda, la infección ya está aminorando”, explica MacInnis. En su experiencia anterior, durante el brote de ébola en África, en 2015, ella detectó entre mil y 10 mil veces más copias virales en las muestras extraídas de los enfermos. Pese a esa diferencia, el entrenamiento con el virus del Ébola constituyó el primer paso para que ella y sus colaboradores pudiesen profundizar en el estudio de la epidemia de Zika sin siquiera tomarse un respiro. “Aquella fue la primera vez que se llevó a cabo un monitoreo genético en tiempo real de una epidemia”, relata. Hasta entonces, era necesario extraer las muestras de los pacientes y cultivarlas en laboratorio para obtener una cantidad suficiente de virus. El problema reside en que no todo lo que se encuentra en la muestra prolifera en cultivo y durante ese proceso se pierde mucho de su diversidad. Lo novedoso fue lograr efectuar los análisis genéticos directamente con la sangre extraída de los pacientes, valiéndose de técnicas para “pescar” el material genético (ARN, en el caso del Zika) en la muestra.

Ante la emergencia de la epidemia en Brasil y en otros países de América del Sur y del Caribe, MacInnis buscó colaboradores en Brasil para sumar conocimientos. Junto a Fernando Bozza, Thiago Souza y Patricia Bozza, de la Fiocruz de Río de Janeiro, estableció lo que califica como una beneficiosa colaboración. “Ellos aportaron la comprensión al respecto de cómo estaba evolucionando la enfermedad y de qué manera interactuaba con los virus causantes del dengue y del chikunguña”, relata.

El grupo carioca ya contaba con un conocimiento epidemiológico del dengue, trabajando con hospitales y realizando



FOTOS RICARDO FUNARI

un control sistemático de la dolencia. “El Zika nos dio mucho trabajo al principio, a causa de su escasa viremia”, recuerda Fernando Bozza. Una vez obtenido un test rápido para el diagnóstico, su grupo empezó a extraer muestras y a buscar perfeccionar el éxito de la extracción del ARN, lo cual implica acrecentar la rigurosidad con la que se extrae y se almacena el material.

Para Bozza, la demora en la identificación del virus del Zika luego de su aparición en Brasil resalta la importancia del monitoreo genético de enfermedades relevantes ya conocidas en otros continentes. “Cuando identificamos el problema, ya había una epidemia en curso”. El conocimiento de la evolución del virus y el contar con las técnicas para su control les permite a los científicos el desarrollo de estrategias para detectar enfermedades con mayor celeridad.

Los datos genéticos indican que en Puerto Rico, Honduras y Colombia, y en el área que incluye al Caribe y a Estados Unidos, también pasaron meses entre el ingreso del virus y la detección

de los primeros casos. Su circulación en forma discreta le permitió al virus del Zika llegar a Estados Unidos a partir del Caribe, según muestra un cuarto artículo publicado en la revista *Nature* ese mismo día. Con todo, en aquel país, tan sólo el estado de Florida reúne las condiciones adecuadas para la subsistencia del *Aedes aegypti* durante todo el año, permitiendo la difusión del virus. Por eso la enfermedad quedó circunscrita a ese estado, sobre todo a la región de Miami, destino de una gran cantidad de turistas de otros países. “El virus se introdujo muchas veces, no se trató de un evento aislado”, asegura MacInnis, coautora del trabajo. “La percepción de cómo ocurrió eso es importante para coordinar nuestros esfuerzos tendientes a controlar al vector y proteger las rutas de entrada”.

Ella sabe que, si bien en Florida rige una etapa de tregua antes del comienzo del verano, sobrevendrán otras epidemias. Por ahora, el virus del Zika aún guarda una dosis de misterio y su circulación en Brasil durante el último verano fue menor de lo que se esperaba. “Conti-



En Natal (Rio Grande do Norte), Marta Giovanetti, de la Fiocruz, prepara la secuenciación (a la izq.) y mosquitos capturados en la ciudad son examinados

nuaremos monitoreando para tratar de entender cómo avanza el virus”, afirma Sabino, cuyo grupo ha realizado un seguimiento de muestras de sangre donadas en cuatro grandes hemocentros de la ciudad de São Paulo. “Estamos aprendiendo a crear grupos de investigación capaces de brindar respuestas rápidas ante una emergencia”. Con el aprendizaje que permite el control genético y las redes de colaboración establecidas disminuyen los riesgos de que los investigadores sean tomados por sorpresa. Las publicaciones concomitantes destacan que ese trabajo conjunto, que reúne a expertos de diversas áreas, resulta esencial para hacerles frente a las epidemias. Por eso los dos grupos trabajando simultáneamente –y a sabiendas de ello– no se cerraron. “A lo largo del proceso nos mantuvimos en contacto, comparando los resultados”, comenta MacInnis. ■

Proyecto

Caracterización del virus del dengue mediante el análisis del genoma completo viral en muestras de donantes y receptores de sangre en los estados de Pernambuco y Río de Janeiro (n° 12/ 03417-7); **Modalidad** Beca doctoral; **Investigadora responsable** Ester Cerdeira Sabino (USP); **Becario** Antonio Charlys da Costa; **Inversión** R\$ 145.246,14

Artículos científicos

FARIA, N. R. *et al.* Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 24 may. 2017.

GRUBAUGH, N. D. *et al.* Genomic epidemiology reveals multiple introductions of Zika virus into the United States. *Nature*. 24 may. 2017.

METSKY, H. C. *et al.* Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 24 may. 2017.

QUICK, J. *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nature Protocols*. v. 12, n. 6, p. 1261-76. 24 may. 2017.