ISBN: 978-607-00-2083-4

EVOLUCIÓN DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH-1): MUTACIONES REVERTANTES EN EL GEN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA

Liliana Gómez Flores Ramos[1], Martha Escoto Delgadillo[2], Eduardo Vázquez Valls[3]

[1] División de Ciencias Biológicas, CUCBA, UDG; [2] IMAREFI, Departamento de producción Agrícola y Ciencias Agronómicas, CUCBA, U de G; [3] UIMEC, UMAE, Hospital de Especialidades, CMNO, IMSS.

Correo: liligblue@yahoo.com.mx

Introducción

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es una de las entidades biológicas con las tasas más aceleradas de evolución. Debido a su velocidad de replicación, de 10^{10} nuevas partículas virales por día, además de la ausencia de actividad exonucleasa de la Transcriptasa Reversa viral, las mutaciones genómicas en el VIH aparecen de manera natural y continua (Shafer 2008). La tasa de mutación del VIH-1 es de 1 en 10^5 pares de bases, es decir, aparece una mutación por cada ciclo de replicación, por lo que la infección con VIH se caracteriza por una extremada diversidad genética de las poblaciones virales (Clavel 2004).

Las mutaciones de resistencia son cambios en el ARN viral que están asociadas con la resistencia fenotípica a cualquiera de los fármacos antirretrovirales disponibles (Van de Vijver 2007). Generalmente, se expresan a modo de codones, en los que se indica el aminoácido y su posición dentro de la proteína en la cepa silvestre así como el cambio en la misma posición por otro aminoácido en la cepa mutante. (Figura 1).

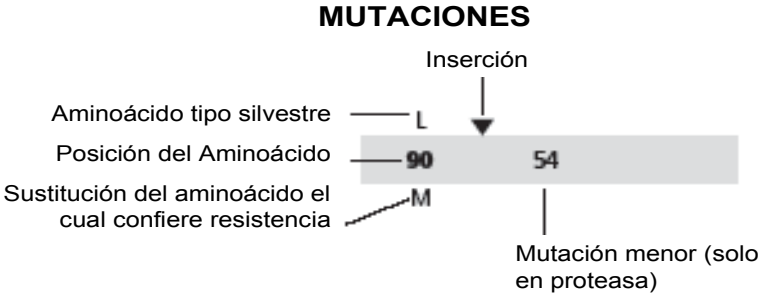


Figura 1. Nomenclatura de las mutaciones de resistencia.

La diversidad genética juega un papel clave en el proceso de adaptación del VIH, brindando mecanismos de escape ante la respuesta inmune del hospedador y desarrollando resistencia a los fármacos antirretrovirales (ARV).

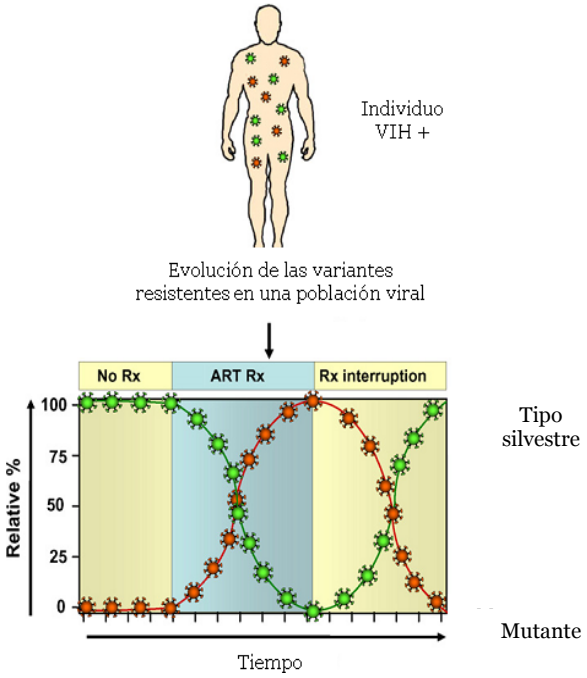
Las principales proteínas susceptibles a variaciones son aquellas que son sujetas a la presión selectiva. Los fármacos antirretrovirales tienen como blanco principal las enzimas encargadas catalizar los pasos cruciales de la replicación viral, y se han

denominado de acuerdo al mecanismo de acción: Inhibidores de la Transcriptasa Reversa (IT), Inhibidores de la Proteasa (IP), Inhibidores de la Integrasa (IN), Inhibidores de Entrada (IE) e Inhibidores de Fusión (IF).

En el año de 1987 se introdujo el primer fármaco con acción antirretroviral, la Zidovudina (AZT) que es un inhibidor de la Transcriptasa Reversa (TR), y durante al menos 10 años, se utilizó como monoterapia para combatir la infección por VIH. La TR es la proteína responsable de transcribir la información genómica del VIH que se encuentra en forma de ARN en ADN complementario para ser insertado en el genoma de la célula infectada (Nisole 2004).

A partir de 1996 se inició la era de la Terapia Antirretroviral Altamente Activa, la cual combina al menos tres fármacos ARV, esto ha permitido suprimir la replicación viral y por lo tanto, llevar la carga viral en plasma de individuos infectados hasta niveles indetectables por pruebas clínicas. Sin embargo, el principal obstáculo para el éxito a largo plazo de la terapia ARV es el surgimiento de la resistencia a los fármacos (Lal 2005).

Bajo la presión selectiva de los fármacos, las cuasiespecies resistentes tienen una capacidad mayor de replicación que las cepas silvestres, sin embargo, cuando la presión selectiva desaparece, la cepa silvestre se reproduce con mayor rapidez, lo que provoca cambios en las poblaciones virales. Estos cambios son producto de la adaptación viral a las condiciones ambientales dentro del individuo infectado y se manifiestan como cambios en las frecuencias génicas de la población viral (Figura 2).



Los cambios en las frecuencias génicas, en parte, son debidos a las mutaciones revertantes. Este tipo de mutaciones se caracterizan por el regreso al estado silvestre de la proteína; es decir, la selección natural favorece las mutaciones que restauran la secuencia de aminoácidos de la enzima a su configuración original (Martínez-Picado 2008).

Figura 2. Estimación relativa de la adaptación viral en poblaciones *in vivo*. La evolución longitudinal de las mutaciones específicas en las poblaciones virales es seguida a través del tiempo

En los últimos años, las pruebas de resistencia del VIH se han vuelto un estándar en los Estados Unidos y países de la Unión Europea. Su objetivo es detectar mutaciones en el genoma del VIH de un paciente y si estas mutaciones afectan la actividad de uno o más de los medicamentos disponibles para el tratamiento del VIH/SIDA (Saag 2001).

Objetivo

Determinar la frecuencia de mutaciones revertantes en el gen de la Transcriptasa Reversa en una muestra de individuos con y sin tratamiento antirretroviral del las regiones Centro y Occidente de México.

Materiales y Métodos

Se obtuvo una muestra de 15 ml de sangre periférica mediante punción venosa de 218 pacientes VIH+ en un tubo con EDTA. Del volumen sanguíneo inicial, se separó el plasma mediante centrifugación y se mantuvo a -80 ºC hasta la extracción del ARN viral.

Extracción de ARN
La extracción de ARN viral contenido en plasma se llevó a cabo con el kit de extracción QIAmp ARN viral (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Prueba de resistencia genotípica
Para el análisis de resistencia genotípica se obtuvo ADNc, a partir del ARN viral extraído del plasma, mediante la técnica de Retrotranscripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Se obtuvieron, como producto de amplificación, el gen de la proteasa y los primeros 318 codones de la trascriptasa reversa, utilizando para esta reacción el kit de amplificación comercial VIH-1 TruGene (Bayer HealthCare, Toronto, Ontario).

Se tomaron tres alícuotas del producto amplificado para realizar la reacción CLIP con PCR anidada del gen de la proteasa, y los codones 39 al 142 y 135 al 244 del gen de la Transcriptasa Reversa. La reacción CLIP consta de una PCR en presencia de los iniciadores marcados con fluorocromos Cy5.5 (sentido) y Cy5.0 (antisentido), dNTPs y didesoxinucleótidos en proporción 300:1.

Los productos de reacción se colocaron en un gel de acrilamida al 6% en un Long Read Tower para su secuenciación. Cada muestra secuenciada se analizó con el programa de GeneObjects (versión 3.2, SIEMENS), las secuencias fueron alineadas con Clustal X y analizadas con los algoritmos del programa de identificación de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales de la Universidad de Stanford.

Análisis de las mutaciones revertantes
Una vez obtenidos los resultados del algoritmo de la Universidad de Stanford, se identificaron las mutaciones revertantes en base a las referencias bibliográficas.

Resultados y Discusión

Las mutaciones de resistencia tienen implicaciones importantes para el éxito de la terapia antirretroviral. En este estudio, se determinó con el 95% de confianza la prevalencia de mutaciones de resistencia en 118 individuos con tratamiento y 100 individuos sin tratamiento antirretroviral derechohabientes de los principales centros de salud pública de regiones Centro y Occidente del país.

Individuos con tratamiento
La mutación más prevalente en la Transcriptasa Reversa para los individuos con tratamiento fue la mutación T215Y con una frecuencia del 35%; su forma revertante T215F estuvo presente en el 6% de los individuos, T215C en el 2% y T215D, T215I y T215S afectó al 1% de la población estudiada (Fig 3).

Estas reversiones en individuos con tratamiento previo se explican como el resultado de la ausencia de presión selectiva de fármacos antirretrovirales inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de los nucléosidos debido al cambio de una monoterapia con AZT a una terapia altamente activa que no lo incluye. La aparición de estas mutaciones revertantes, también puede deberse a una inadecuada adherencia al tratamiento, ya que al tomar los fármacos en una dosis inadecuada, se produce una supresión subóptima de la replicación y se permite el aumento de las poblaciones virales revertantes.

Individuos sin tratamiento
La mutación T215Y estuvo presente en el 2% de los individuos sin tratamiento. Esto es una evidencia de la resistencia transmitida a los fármacos, la cual es producto de la infección con una cepa que ha sido expuesta previamente al tratamiento con Inhibidores de la Transcriptasa Análogos de los Nucleósidos. Producto de las reversiones de esta mutación, se encontraron las formas revertantes T215A y T215 C en el 1% de la población sin tratamiento estudiada (Figura 3).

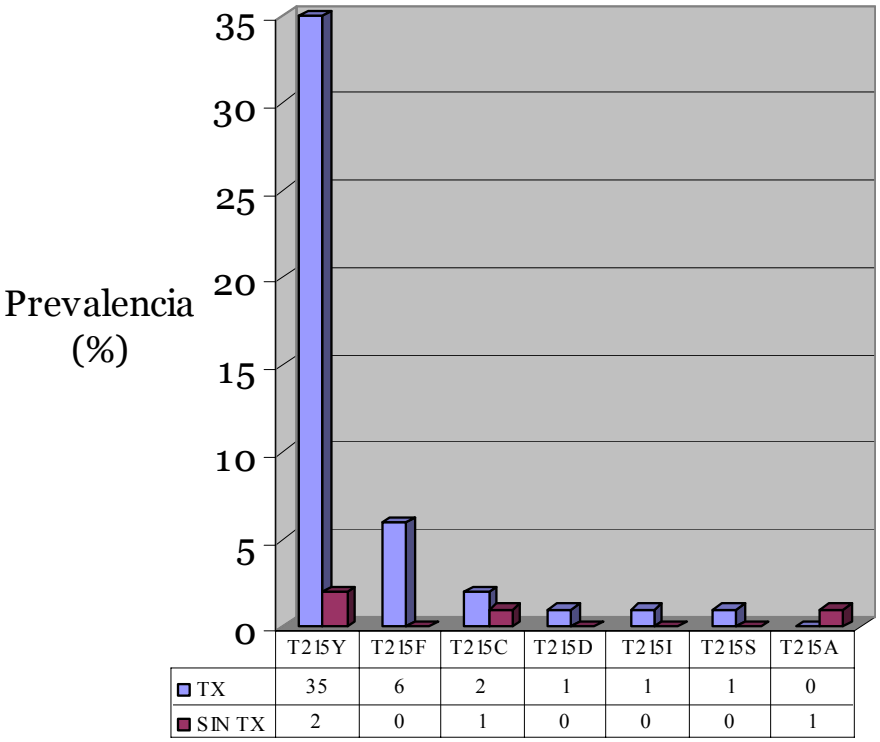


Figura 3. Prevalencia de la mutación asociada a resistencia a los ARV Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de los Nucleósidos T215Y y las mutaciones revertantes T215F, C, D, I, S y A.

Conclusiones

Las mutaciones encontradas en el Virus de la Inmunodeficiencia Humana de la población analizada son resultado de la presión selectiva de los fármacos y los mecanismos de adaptación del virus a las condiciones ambientales particulares de cada individuo infectado.

Al menos el 6% de los individuos sin tratamiento estudiados presenta alguna forma de mutación revertante en la que se sustituye el aminoácido Treonina en la posición 215 de la Transcriptasa Reversa por Cistenina, Ácido aspártico, Fenilalanina, Isoleucina o Serina y el 1% de los individuos sin tratamiento presenta una sustitución revertante por Alanina o Cistenina.

Por lo anterior, en la población mexicana existe evidencia de la resistencia transmitada a los fármacos, cuestión de particular importancia epidemiológica, ya que este tipo de resistencia limita las opciones de tratamiento en individuos que no han sido nunca expuestos a la presión selectiva del fármaco.

Si queremos determinar los patrones evolutivos del VIH en nuestra población será necesario analizar a los individuos VIH+ a lo largo del tiempo.

Bibliografía

Clavel F., A. Hance. 2004. Medical progress: HIV drug resistance. *N Eng J Med*. **350:** 1023-35.

Lal, R.B., S. Chakrabarti, C. Yang. 2005**.** Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy and vaccine development. *Indian J Med Res*. **136:**1069-1075.

Martínez-Picado J. Martínez M.A. 2008. HIV-1 reverse trnscriptase inhibitor resistance mutations and fitness: A view from the clinic and ex vivo. *Virus Research*. **134:** 104-123.

Nisole S., A. Saib. 2004. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. **1**: 9-28

Saag M. S. 2001. HIV resistance testing in clinical practice: A QALY-fied success. Ann Intern Med. **134:** 475-477.

Shafer R. W., J. M. Schapiro. 2008. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. *AIDS Rev*. **10:** 67-84.

Van de Vijver D. A., A. M. Wensing, G. Angarano, C.A. Boucher. 2006. The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV subtypes. J Acquir Immune Defic Syndr. **41:** 352-360.