

ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis genético del polimorfismo del virus de la inmunodeficiencia humana en pacientes colombianos

ALBERTO GÓMEZ^{1,2}, LEIDY FRANCO¹, ELISABETH VARGAS¹, OLGA LUCÍA SOPÓ¹,
CAROLINA FAJARDO¹, MARIO ORDÓÑEZ³, MARÍA CONSUELO CASAS¹

Resumen

Objetivo. La resistencia a los medicamentos antirretrovirales se ha asociado con mutaciones características en los genes que codifican las enzimas que son el blanco de la terapia antirretroviral. En el presente trabajo se busca evaluar, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, las diferentes mutaciones reveladas por la tipificación molecular de virus procedentes de diferentes pacientes remitidos al Instituto de Referencia Andino, en Bogotá, para la genotipificación con fines terapéuticos.

Diseño: Se hizo la tipificación de un total de 1.064 mutaciones diferentes en virus procedentes de 16 pacientes no relacionados entre sí, con solicitud de genotipificación del VIH para análisis de sensibilidad a antirretrovirales. Se procedió a la tabulación de las mutaciones encontradas en cuatro categorías principales: a- mutaciones asociadas a resistencia, b- mutaciones silenciosas, c- polimorfismos genéticos por fuera de los sitios asociados a resistencia, y de mutaciones en sitios de resistencia que hasta el momento no han sido asociadas a resistencia.

Metodología. Se seleccionaron, en estricto orden de llegada, 16 muestras de sangre en EDTA de pacientes con solicitud de genotipificación del VIH para análisis de sensibilidad a antirretrovirales. Se extrajo el ARN viral de cada muestra por el método QIAamp® y se procedió a su amplificación por medio de la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR). Una vez amplificado el ácido nucleico viral, se procedió a su tipificación molecular en el secuenciador LongReadTower-Opengene®, utilizando el estuche Trugene HIV-1®. Las secuencias obtenidas se transcribieron a hoja electrónica Excel®, y se hizo un cálculo de frecuencias de mutaciones por conteo directo.

1 Instituto de Referencia Andino, Bogotá, D.C., Colombia.

2 Profesor Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

3 Siemens Healthcare Diagnostics Ltda., Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: 10-05-2011

Revisado: 13-06-2011

Aceptado: 10-08-2011

Resultados. Se revelaron por el método de secuenciación viral 1.064 mutaciones diferentes entre las que solamente 164 (15,4%) estaban asociadas a resistencia a los antirretrovirales (68 en el gen de la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa y 96 en el gen de la proteasa). El 84,5% restante corresponde a polimorfismos (n=301), mutaciones silenciosas (n=564) y a otras mutaciones (n=35) que hasta el momento no han sido asociadas con resistencia, pero que pueden ser fuente de fracasos recurrentes en los tratamientos antirretrovirales.

Se encontraron tres genotipos virales idénticos en tres pacientes de diferente procedencia en el país, lo cual puede constituir un indicador de utilidad ejemplar para la trazabilidad epidemiológica de esta virosis, en la medida en que la coincidencia de perfiles de mutación en virus aislados a partir de diferentes pacientes se puede asociar a la infección con una misma cepa circulante en una región determinada. Se presenta la cartografía molecular de las 1.064 mutaciones diferentes identificadas en 16 pacientes estudiados, en la cual se revelan codones cuya secuencia muta con mayor frecuencia. Entre los que están asociados con resistencia al tratamiento antirretroviral, se encontró que el codón 63 de la proteasa, con 18 mutaciones, y el codón 184 de la retrotranscriptasa, con 14 mutaciones, alojaron la mayor cantidad de variantes en los virus secuenciados en este estudio preliminar.

Conclusiones. La tipificación genética del VIH puede servir de fundamento molecular a investigaciones epidemiológicas, más allá de su evidente utilidad en el estudio de la resistencia a antirretrovirales, para lo cual se están utilizando exclusivamente estos análisis hoy en día.

Palabras clave: VIH, carga viral, genotipo, polimorfismo genético.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por el Instituto de Referencia Andino.

Title

Mutational analysis of HIV in Colombian patients

Abstract

Objective: Resistance to antiretroviral drugs has been associated with characteristic mutations in the genes that encode enzymes which are the target of anti-retroviral therapy. In this paper we evaluate the different mutations revealed by molecular typing of viruses from different patients who were referred to be genotyped at the Instituto de Referencia Andino in Bogotá for therapeutic purposes.

Design: A total number of 1064 mutations in viruses from 16 HIV infected unrelated patients were initially genotyped for the analysis of sensitivity to antiretrovirals. Afterwards, we proceeded to the tabulation of the mutations found in four main categories: a- resistance mutations, b- silent mutations, c-genetic polymorphisms outside of sites associated with resistance, and d- mutations at sites not yet associated with resistance.

Materials and methods: Sixteen EDTA blood samples drawn from patients with HIV genotyping application for analysis of sensitivity to antiretroviral drugs were selected in strict order of arrival. Viral RNA was extracted from each sample by the QIAamp® method, and we then proceeded to its amplification by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Once the viral nucleic acid was successfully amplified, we proceeded to molecular typing in the sequencer LongRead-Tower-Opengene®, using the Trugene® HIV-1 kit. The sequences obtained were transcribed to an Excel® spreadsheet, to calculate the frequencies of mutations by direct counting.

Results: We revealed 1064 viral mutations among which only 164 (15,4%) were associated with resistance to antiretroviral drugs (68 in the retrotranscriptase or reverse transcriptase gene and 96 in the protease). The remaining 84,5%

corresponds to polymorphisms (n=301), silent mutations (n=564), and other mutations (n=35) that have not been associated with resistance so far, but can be a source of recurring failures on antiretroviral treatment. We also found three identical viral genotypes in 3 unrelated patients coming from different geographic areas in the country. This finding implies that viral genotyping can be a useful indicator for epidemiological tracking of this viral disease.

We also report the molecular mapping of the 1064 mutations identified in all 16 patients studied, which show which codons mutate more frequently. Among these, the codon 63 of the protease, with 18 mutations, and codon 184 of the retrotranscriptase, with 14 mutations, housed the higher number of variants in the viruses that were sequenced in this preliminary study.

Conclusions: Genetic typing of HIV can be the basis of molecular epidemiological investigations, beyond their obvious utility in the study of resistance to antiretroviral drugs for which these tests are used exclusively today.

Key words: HIV viral load, genotype, genetic polymorphism.

Introducción

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*, se caracteriza por presentar su genoma en forma de cadena sencilla de ácido ribonucleico (ARN) y produce una infección crónica que deteriora el sistema inmunológico del huésped. Este virus es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), afectando principalmente a las células del sistema inmunitario que portan la

molécula CD4 en su membrana. Esta proteína se ha caracterizado como punto de anclaje del virus que inicia un proceso de interiorización celular, el cual resulta en la retrotranscripción de su ARN en ADN, mediante la acción de la enzima retrotranscriptasa. El ADN proviral es integrado posteriormente al genoma de la célula infectada mediante la acción de la enzima integrasa, y este podrá ser posteriormente transcrito a ARN viral nuevo que será traducido con la participación de la proteasa. Estas tres enzimas de origen viral, la retrotranscriptasa, la integrasa y la proteasa, son entonces críticas en la replicación del VIH en el huésped humano y constituyen los principales blancos de acción de los medicamentos antirretrovirales[1].

Las cepas del VIH son variadas desde el punto de vista genotípico[2, 3] y hoy en día predomina el VIH-1 en la mayor parte del mundo, mientras que el VIH-2 se encuentra principalmente en ciertas regiones de África[4]. La heterogeneidad genética del VIH-1 y del VIH-2, resulta de una gran frecuencia de errores de la replicación viral debida a la ausencia de la función de corrección o *proofreading* por parte de la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT). El VIH-1 tiene un genoma compuesto por 9.200 nucleótidos y, en promedio, se comete un error de transcripción por cada 10.000 nucleótidos copiados. En consecuencia, cuando el virus se replica, puede producir variantes genéticas que

pueden ser compatibles con el desarrollo y supervivencia viral, pero también, fuente de genotipos virales resistentes a los fármacos antirretrovirales[5].

La frecuencia con la que se producen variantes genéticas del VIH en los pacientes, depende de la capacidad de replicación o *fitness* del virus infeccioso y de la naturaleza de las presiones selectivas que actúan sobre la población viral en cada paciente, incluyendo el tipo de respuesta inmunitaria individual y el uso continuado de fármacos antirretrovirales. La aparición de nuevas variantes genéticas en el curso de la infección, puede determinar lo que se ha denominado “fracaso terapéutico”, definido operativamente como una supresión viral insuficiente cuando, a pesar de un adecuado cumplimiento del tratamiento (>95%), una adecuada tolerancia y sin razones clínicas o farmacológicas o farmacocinéticas definidas, un paciente presenta: a- dos cargas virales consecutivas por encima de 400 copias/ml, después de seis meses de tratamiento, o b- dos cargas virales consecutivas sin reducción de al menos dos logaritmos, después de dos meses de iniciado el tratamiento[6]. Las guías americanas publicadas actualmente, incluyen la siguiente definición operativa de “fracaso terapéutico” desde el punto de vista viral: “The inability to achieve or maintain suppression of viral replication to an HIV RNA level <200 copies/ml” (La

inhabilidad de lograr o mantener la supresión de la replicación viral a un nivel inferior a 200 copias/mL)[7].

El tratamiento con antirretrovirales puede seleccionar poblaciones mutantes minoritarias resistentes, que predominarán con el tiempo. En las personas infectadas se pueden presentar mutaciones del VIH-1 que confieren resistencia a fármacos antirretrovirales, antes de iniciar el tratamiento farmacológico, debido a la transmisión de la cepa infecciosa de un sujeto que haya recibido previamente tratamiento antirretroviral, o bien, debido a mutaciones espontáneas en codones asociados con resistencia a los fármacos comúnmente en uso. Una vez iniciado el tratamiento, la población existente de virus resistentes puede predominar rápidamente debido a una ventaja selectiva. En algunos casos, como sucede con medicamentos inhibidores no nucleosídicos de la enzima transcriptasa inversa, un cambio de un solo nucleótido en el gen *RT* del VIH-1 puede conferir una reducción de 100 a 1.000 veces en su sensibilidad farmacológica. Algunas mutaciones seleccionadas por los fármacos antirretrovirales afectan directamente a las enzimas virales y causan resistencia por medio de la disminución directa de la unión del fármaco a estas, mientras que otras tienen efectos indirectos.

La genotipificación de los virus aislados de cada paciente ha demostrado

utilidad clínica en estudios prospectivos como el *Genotypic Antiretroviral Resistance Testing* (GART)[8]. La mayor reducción de la carga viral, cuando se utiliza la identificación preliminar de mutaciones asociadas con resistencia en cada paciente, ha demostrado de manera contundente el beneficio clínico del uso auxiliar de la genotipificación para orientar las decisiones terapéuticas. En consecuencia, tanto las guías americanas como las europeas, recomiendan la genotipificación desde la infección primaria o aguda, hasta la fase crónica, o bien en cualquier caso de falla terapéutica. En contraste, las guías de manejo publicadas en Colombia por el Ministerio de la Protección Social, las cuales incluyen consideraciones de costo-beneficio para nuestro país, proponen evaluar la solicitud de la genotipificación en cada caso para un primer fracaso terapéutico y recomiendan la genotipificación del VIH con fines terapéuticos, solamente en presencia de un segundo o tercer fracaso[6].

Más allá del estudio de la asociación de mutaciones particulares con la resistencia o sensibilidad a medicamentos antirretrovirales, la secuenciación de las cepas infecciosas puede proveer información determinante desde el punto de vista epidemiológico, en la medida en que se detecten genotipos virales idénticos o estrechamente relacionados en determinados grupos de pacientes.

En el presente trabajo se busca evaluar, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, las diferentes mutaciones reveladas por la tipificación molecular de virus procedentes de diferentes pacientes remitidos al Instituto de Referencia Andino en Bogotá para genotipificación con fines terapéuticos.

Metodología

Muestras. Se seleccionaron, en estricto orden de llegada y bajo la modalidad de muestreo por conveniencia, 16 muestras de sangre en EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético) de pacientes colombianos con solicitud de genotipificación del VIH para análisis de sensibilidad a antirretrovirales. Las muestras se recibieron de los laboratorios remitentes en diferentes ciudades del país, sin información clínica complementaria en razón a la modalidad de referencia muestral inter-laboratorios, con las usuales precauciones de la fase preanalítica requeridas por el Instituto de Referencia Andino.

Genotipificación viral. Se extrajo el ARN viral de cada muestra por el método *QIAamp*[®] (Quiagene, USA) y se procedió a su amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa (RT-PCR). Una vez amplificado el ácido nucleico viral, se procedió a su tipificación molecular en el secuenciador *LongReadTower-Opengene*[®] (Siemens,

USA), utilizando el estuche *Trugene HIV-1*[®] (Siemens, USA), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. En síntesis, se utilizó una mezcla de varios cebadores o *primers* complementarios a las regiones que presentan las variantes virales más frecuentes. Las muestras de ARN extraídas se añadieron a tubos de reacción en los que tiene lugar la transcripción inversa y la posterior amplificación por PCR. La reacción de transcripción inversa se realizó con una versión de la transcriptasa inversa del virus Moloney de la leucemia de ratón, la cual se obtuvo mediante ingeniería genética, para transcribir el ARN del VIH-1 en su copia correspondiente de ADN complementario (ADNc). A continuación, se amplificó con un ADN polimerasa termoestable.

Para cada reacción PCR, se utilizaron 6 µl de cebador, 1,5 µl de dNTP, 1,0 µl de solución tampón, 0,5 µl de inhibidor de ARNasa y 17 µl de ARN extraído, con un volumen final de reacción de 26 µl. A esta solución se le añadió una mezcla de enzimas: a) retrotranscriptasa, 1,0 µl, y b) ADN polimerasa, 2,5 ul, añadiendo nuevamente 0,5 µl de inhibidor de ARNasa y 10 µl de solución tampón. Esta mezcla de enzimas se agregó a la mezcla inicial en el segundo paso del protocolo de la PCR. Todos los tiempos de pendientes decrecientes de temperatura se programaron en un termociclador PTC-100[®] (Thermal, USA) y disminuyen a razón

de 1°C por segundo. El protocolo subsiguiente consta de un primer ciclo de 90°C por dos minutos y luego 50°C durante 60 minutos. Al cabo de cinco minutos de alcanzar esta temperatura, se adicionaron 14 µl de la mezcla de enzimas a y b. En este paso se hizo la retrotranscripción y, posteriormente, se realizó un paso de 94 °C por dos minutos. Al cabo de este primer ciclo, se realizaron 20 ciclos consistentes en tres pasos, así: 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos y 68°C por dos minutos; posteriormente, 17 ciclos consistentes en tres pasos, de: 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 68°C por 2,5 minutos; por último, un ciclo de dos pasos: 68°C por siete minutos y enfriamiento continuo a 4°C, hasta la utilización del producto amplificado.

La reacción de secuenciación se hizo en microplaca por la metodología de Sanger, empleando 7 µl de terminadores dideoxinucleótidos (dDNA_T, dDNA_C, dDNA_G, dDNA_T) para cada región analizada de la proteasa y de la retrotranscriptasa, añadiendo a cada micropozo 1,0 µl de solución tampón, 0,2 µl de enzima ADN polimerasa, 4,2 µl de agua de grado biología molecular y 0,31 µl del producto amplificado en la PCR en presencia de transcriptasa inversa.

Las condiciones de esta amplificación previa a la secuenciación consisten

en: un ciclo de denaturación a 94°C durante cinco minutos y 30 ciclos sucesivos consistentes en tres pasos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 20 segundos y 70°C por 1,5 minutos, terminando con un último ciclo de 70°C durante cinco minutos y un paso de enfriamiento a 4°C. Al finalizar este protocolo de amplificación para secuenciación, se adicionan 14 µl de formamida como solución de parada y se hace una denaturación por choque de temperatura, calentando inicialmente a 85°C y enfriando inmediatamente después en hielo.

A continuación, con el fin de proceder a la reacción de secuenciación, se practica una electroforesis en gel de poli-acrilamida al 6%, en la que se detectan los nucleótidos marcados en la reacción previa a la secuenciación, gracias a la estrategia de añadir dideoxynucleótidos, o sea, los nucleótidos que carecen de un grupo hidroxilo, indispensable para que la polimerasa adicione el siguiente nucleótido complementario a la cadena blanco. Estos dideoxynucleótidos suspenden la polimerización en el extremo 3' cuando se incorporan a la cadena de ADN en el orden que les corresponde en la secuencia original y, por lo tanto, esta cadena no puede continuar su elongación. Los fragmentos más pequeños migran más rápidamente que los grandes en la electroforesis y el nucleótido marcado del extremo 3' de cada frag-

mento será el que revele el orden de los nucleótidos. La lectura correspondiente se hace en el secuenciador Long Read Tower[®], de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Siemens Healthcare Diagnostics) y las mutaciones y polimorfismos se establecen con referencia a las bases de datos o librerías actualizadas, surgidas de consensos internacionales puestas a disposición por la casa matriz (Siemens).

Análisis estadístico. Las secuencias obtenidas se transcribieron a una hoja electrónica Excel[®] (Microsoft, USA) y se calcularon las frecuencias de mutaciones por conteo directo.

Resultados

Se encontraron 1.064 mutaciones virales, entre las que solamente 164 (15,4%) estaban asociadas a resistencia a los antirretrovirales: 68 en el gen de la retrotranscriptasa y 96 en el de la proteasa. El 84,5% restante corresponde a polimorfismos (n=301), mutaciones silenciosas (n=564) y a otras mutaciones (n=35) que hasta el momento no se han asociado con resistencia, pero que pueden ser fuente de fracasos recurrentes en los tratamientos antirretrovirales. Dependiendo del tipo de mutación, se encontraron en la misma posición polimorfismos, mutaciones silenciosas o mutaciones de resistencia (tablas 1 y 2).

Tabla 1
Perfil de mutaciones en el gen de la proteasa del VIH-1 en 16 pacientes colombianos

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
PR		T4T/A	P	4	3
PR		L5H/L	P-S	5	2
PR		W6G/W/L	P-S	6	2
PR		Q7Q/R	P-S	7	2
PR		R8R/L	P	8	1
PR		P9P	S	9	1
PR	MCR	L10I/L/V	R-S	10	11
PR	MCR	V11V	S	11	2
PR		T12Q/S/T	P-S	12	6
PR	MCR	I13G/I/M/S/V	O-R	13	8
PR		K14K/N/R	P-S	14	10
PR	MCR	I15V	R	15	5
PR	MCR	G16E/G	R	16	6
PR		G17G	S	17	7
PR		Q18Q	S	18	7
PR	MCR	L19I/L	P-R-S	19	6
PR	MCR	K20I/K/M	R-S	20	8
PR		A22A	S	22	1
PR	MCR	L24F/L	O-S	24	5
PR		D25D/V	P-S	25	3
PR		A28A	S	28	2
PR	MCR	D30D	S	30	2
PR	MCR	V32A/V	O-S	32	6
PR	MCR	L33F/L/T/V	O-R	33	6
PR	MCR	E34E	S	34	2
PR		E35E/D	O-S	35	4
PR	MCR	M36I/L	R	36	4
PR		S37N/P/Q/S	P-S	37	14
PR		L38L	S	38	8
PR		P39P/Q/S/X	P	39	2
PR		R41K/R	P	41	8
PR	MCR	K43K/T	R-S	43	3
PR		P44P	S	44	1
PR		K45R	P	45	1
PR	MCR	M46I/L/M	R	46	3
PR	MCR	G48A/G	O-S	48	3
PR	MCR	I50L	R	50	1
PR		G51G/X	P	51	1

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
PR		G52G	S	52	2
PR	<i>MCR</i>	I54I/S/V	R-S	54	4
PR	<i>MCR</i>	K55K/R	R	55	2
PR		R57K/R	P	57	1
PR	<i>MCR</i>	Q58E/Q	R-S	58	9
PR	<i>MCR</i>	D60E/M	R	60	7
PR		Q61Q/E	P-S	61	9
PR	<i>MCR</i>	I62I/V	R	62	8
PR	<i>MCR</i>	L63G/H/L/P/R/S/V	O-R-S	63	18
PR		I64I/V	P-S	64	9
PR		E65E	S	65	1
PR		I66I	S	66	9
PR		C67C/F	P-S	67	5
PR		G68G	S	68	2
PR	<i>MCR</i>	H69H/R	O-S	69	2
PR		K70A/K/T	P-S	70	7
PR	<i>MCR</i>	A71A/L/V	R	71	6
PR		I72I/K/R/T/V	P-S	72	6
PR	<i>MCR</i>	G73S/T	R	73	3
PR		V75V	S	75	10
PR	<i>MCR</i>	V77I/V	R	77	7
PR		P79S/P	P-S	79	2
PR	<i>MCR</i>	V82A	R	82	2
PR		G86E/G	P	86	1
PR	<i>MCR</i>	N88N	S	88	1
PR	<i>MCR</i>	L89L	S	89	2
PR	<i>MCR</i>	L90M/L	R	90	2
PR		T91T	S	91	2
PR		Q92Q/E	P-S	92	3
PR	<i>MCR</i>	I93L	R	93	5
PR		G94G/R/V	P-S	94	9
PR		C95C/S	P-S	95	6
PR		T96T	S	96	3
PR		L97L	S	97	6
PR		N98N	S	98	2
PR		F99F	S	99	4

MCR: mutación en codón de resistencia

Total de mutaciones en el gen de la proteasa: 344

P: polimorfismos; S: mutaciones silenciosas; R: mutaciones de resistencia; O: otras mutaciones sin evidencia de resistencia.

Tabla 2
Perfil de mutaciones en el gen de la retrotranscriptasa del VIH-1 en 16 pacientes colombianos

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
RT		C38X/C	P	38	1
RT		T39A/I/T/V	P	39	5
RT		E40A/D/E	P-S	40	4
RT	<i>MCR</i>	M41M/L	R	41	3
RT		E42E	S	42	1
RT	<i>MCR</i>	K43K/N	P-S	43	4
RT	<i>MCR</i>	E44D	R	44	1
RT		G45G/V	P-S	45	10
RT		K46K/N	P-S	46	2
RT		I47I/F	P-S	47	2
RT		S48T/S	P	48	2
RT		K49K/N/X	P	49	3
RT		I50I	S	50	2
RT		P52L/P/S	P-S	52	3
RT		N54N/I	P-S	54	4
RT		P55P/S	P-S	55	2
RT		Y56Y/F	P	56	1
RT		N57N/H	P	57	1
RT		P59P	S	59	1
RT		V60I/V	P	60	5
RT		I63I/V	P	63	1
RT		K64R	P	64	1
RT	<i>MCR</i>	K65K	S	65	2
RT		K66K/N/R	P-S	66	7
RT	<i>MCR</i>	D67D/N	R-S	67	4
RT		S68S/G	P-S	68	4
RT	<i>MCR</i>	T69D/T	R-S	69	5
RT	<i>MCR</i>	K70R/K	R-S	70	5
RT		K73K	S	73	1
RT	<i>MCR</i>	L74I/L/V	O-R-S	74	13
RT	<i>MCR</i>	V75M	R	75	1
RT		D76D/G	P-S	76	2
RT	<i>MCR</i>	F77L	R	77	1
RT		R78R/I	P	78	1
RT		E79E/G	P-S	79	2
RT		L80L	S	80	6
RT		N81N	S	81	1

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
RT		K82K/X	P-S	82	5
RT		R83R	S	83	1
RT		T84T	S	84	2
RT		Q85Q/P/S/X	P-S	85	2
RT		D86D/E	P-S	86	5
RT		F87F	S	87	1
RT	<i>MCR</i>	W88C	O	88	1
RT		V90G/I/V	P-S	90	4
RT		Q91Q	S	91	6
RT		I94I	S	94	1
RT		P95P	S	95	1
RT		H96H/P/Q	P-S	96	2
RT		P97P/Q	S	97	8
RT		A98A/S	O-S	98	3
RT		G99R/G	P	99	1
RT	<i>MCR</i>	L100V/L	O-S	100	6
RT	<i>MCR</i>	K101E/K	R-S	101	3
RT		K102K/Q	P	102	4
RT		K103K/N/R	O-R	103	7
RT	<i>MCR</i>	S105S	S	105	1
RT	<i>MCR</i>	V106I/V	O-S	106	3
RT	<i>MCR</i>	V108I	R	108	1
RT		L109L	S	109	9
RT		V111V	S	111	1
RT		D113N/D	P	113	1
RT	<i>MCR</i>	Y155Y/F	R	115	5
RT	<i>MCR</i>	F116F	S	116	2
RT	<i>MCR</i>	V118I/V	S	118	5
RT		P119P	S	119	1
RT		L120X/L	P-S	120	2
RT		D121D/H	P-S	121	4
RT		E122E/KTQP/R	P-S	122	15
RT		D123D/E/N	P-S	123	6
RT		F124F	S	124	2
RT		R125R	S	125	4
RT		K126K	S	126	3
RT		Y127D/Y	P-S	127	3
RT		T128T	S	128	2
RT		A129A/V	P	129	1
RT		F130F/L/Y	P-S	130	5
RT		T131T/P	P-S	131	14

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
RT		P133H/P	P	133	1
RT		S134I/R/S	P	134	3
RT		I135GILMPRTVY	P	135	15
RT		N136D/H/N	P-S	136	7
RT		N137N	S	137	1
RT		E138E	S	138	1
RT		T139I/T	P-S	139	2
RT		P140Q/P	P	140	1
RT		G141E/G	P-S	141	14
RT		I142F/I/D/N/T/V/Y	P-S	142	10
RT		R143I/R/T	P-S	143	4
RT		Y144Y	S	144	6
RT		Q145Q/X	P-S	145	4
RT		Y146Y	S	146	2
RT		N147N	S	147	1
RT		V148A/E/L/V	P-S	148	4
RT		L149L	S	149	12
RT		P150P	S	150	2
RT	<i>MCR</i>	Q151K/Q/X	O-S	151	6
RT		W153L/W/X	P	153	2
RT		K154K/E	P	154	1
RT		G155G	S	155	6
RT		P157P/S	P	157	1
RT		A158A	S	158	1
RT		I159I	S	159	1
RT		F160F	S	160	7
RT	<i>MCR</i>	Q161Q	S	161	2
RT		S162A/C/S/Y	P-S	162	5
RT		S163S	S	163	8
RT		T165I/L/M/P/T	P	165	2
RT		K166K/R	S	166	2
RT		I167I	S	167	6
RT		L168D/E/L	P-S	168	4
RT		E169D/E	P-S	169	3
RT		F171F	S	171	7
RT		R172R	S	172	1
RT		K173K	S	173	6
RT		Q174K/Q/R	P-S	174	6
RT		N175N	S	175	3
RT		P176P/S	P-S	176	5
RT		D177D/E	P-S	177	4

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
RT		I178M	P	178	1
RT	MCR	V179I/V	S	179	5
RT		I180I/V	P-S	180	2
RT	MCR	Y181C/Y	R-S	181	6
RT		Q182Q	S	182	1
RT		Y183Y	S	183	2
RT	MCR	M184I/M/V	R	184	14
RT		D186D	S	186	2
RT		L187L	S	187	2
RT	MCR	Y188H/Y	R	188	1
RT		V189I/V	S	189	2
RT	MCR	G190A/G	R-S	190	10
RT		S191S	S	191	2
RT		D192D	S	192	2
RT		L193L	S	193	1
RT		G196E/G/Q/R	P-S	196	5
RT		Q197Q/E	P-S	197	6
RT		H198H	S	198	1
RT		R199R	S	199	1
RT		T200A/I/T/R	P	200	5
RT		I202I/V	P	202	6
RT		E203E/K	P-S	203	3
RT		E204D/E	P-S	204	19
RT		L205L	S	205	3
RT		R206R/I	P	206	1
RT		Q207A/D/E/Q	P-S	207	13
RT	MCR	H208H	S	208	1
RT	MCR	L209L	S	209	11
RT	MCR	L210L/W	R-S	210	11
RT		R211K/N/R/S	P	211	15
RT		G213G	S	213	8
RT		L214L/F	P	214	19
RT	MCR	T215F/N/S/T/V/Y	O-R-S	215	7
RT		D218D/E	P-S	218	11
RT	MCR	K219E/K/Q	R-S	219	3
RT		K220K	S	220	3
RT		H221H/Y	P	221	5
RT		Q222Q	S	222	1
RT		K223E/K	P-S	223	4
RT		E224E/K/V	P	224	2
RT	MCR	P225H/P	R-S	225	2

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
RT		P226P	S	226	5
RT	<i>MCR</i>	F227F	S	227	9
RT		L228H/L/R	P-S	228	6
RT		W229W/C	P	229	1
RT	<i>MCR</i>	M230L	R	230	1
RT		G231G	S	231	3
RT		Y232D/Y	P	232	1
RT		E233E/V	P	233	1
RT		L234L	S	234	1
RT		H235H	S	235	1
RT		P236P/R	P	236	1
RT		D237D	S	237	3
RT		K238K/Q/T	P	238	2
RT		W239W/L	P	239	1
RT		T240T	S	240	1
RT		V241G/V	P-S	241	5
RT		Q242H/L/Q	P	242	4
RT		I244I	S	244	1
RT		V245K/M/R/V	P-S	245	4
RT		L246L	S	246	1
RT		P247PS/T	P-S	247	3

MCR: mutación en codón de resistencia

Total mutaciones en el gen de la retrotranscriptasa: 720

En las figuras 1 y 2 se presentan, respectivamente, la cartografía molecular de las 1.064 mutaciones identificadas en los genes de la proteasa y de la retrotranscriptasa en los 16 pacientes estudiados. En estas se revelan codones cuya secuencia muta con mayor frecuencia. El codón 63 de la proteasa, con 18 mutaciones posibles, y los codones 204 y 214 de la retrotranscriptasa, con 19 mutaciones posibles cada uno, alojaron la mayor cantidad de variantes en los virus secuenciados.

Al analizar una a una las mutaciones asociadas por consenso internacional con resistencia a los inhibidores de la proteasa o de la retrotranscriptasa, se encontró que en el caso del gen de la proteasa la mayor cantidad de mutaciones también se encuentran representadas en el codón 63 (tabla 3). Por el contrario, en el gen de la retrotranscriptasa, la mayor cantidad de polimorfismos deletéreos se encuentra en el codón 184, con 14 mutaciones posibles

reveladas en los virus analizados (tabla 4). En cada una de las tablas se registra el tipo de sustituciones posibles en cada codón, con las opciones resultantes del

electroferograma de secuenciación, con su correspondiente aminoácido resultante en los casos, aun si se trata de mutaciones silenciosas.

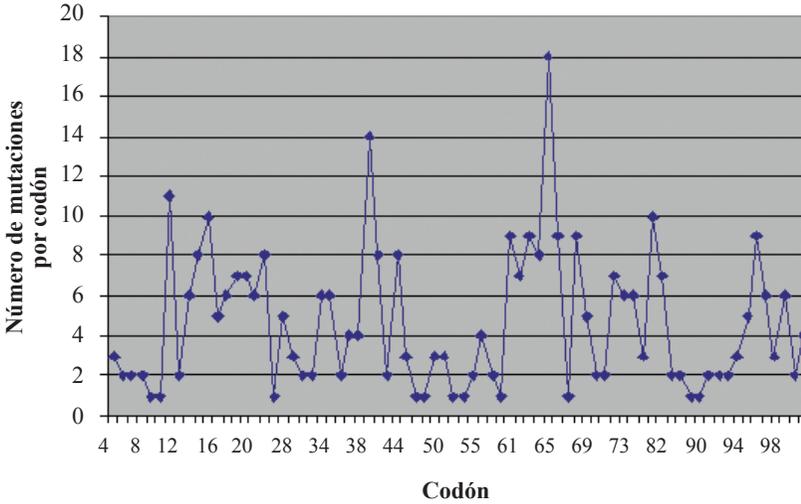


Figura 1. Perfil de mutaciones en el gen de la proteasa del VIH-1 en 16 pacientes colombianos.

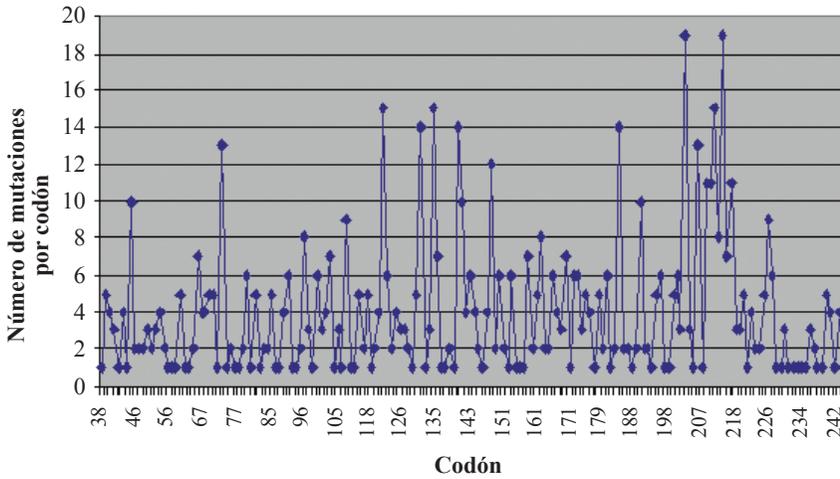


Figura 2. Perfil de mutaciones en el gen de la retrotranscriptasa del VIH-1 en 16 pacientes colombianos.

Tabla 3
Perfil de mutaciones en codones de resistencia del gen proteasa del VIH-1

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
PR	MCR	L10I/L/V	R-S	10	11
PR	MCR	V11V	S	11	2
PR	MCR	I13G/I/M/S/V	O-R	13	8
PR	MCR	I15V	R	15	5
PR	MCR	G16E/G	R	16	6
PR	MCR	L19I/L	P-R-S	19	6
PR	MCR	K20I/K/M	R-S	20	8
PR	MCR	L24F/L	O-S	24	5
PR	MCR	D30D	S	30	2
PR	MCR	V32A/V	O-S	32	6
PR	MCR	L33F/L/T/V	O-R	33	6
PR	MCR	E34E	S	34	2
PR	MCR	M36I/L	R	36	4
PR	MCR	K43K/T	R-S	43	3
PR	MCR	M46I/L/M	R	46	3
PR	MCR	G48A/G	O-S	48	3
PR	MCR	I50L	R	50	1
PR	MCR	I54I/S/V	R-S	54	4
PR	MCR	K55K/R	R	55	2
PR	MCR	Q58E/Q	R-S	58	9
PR	MCR	D60E/M	R	60	7
PR	MCR	I62I/V	R	62	8
PR	MCR	L63G/H/L/P/R/S/V	O-R-S	63	18
PR	MCR	H69H/R	O-S	69	2
PR	MCR	A71A/L/V	R	71	6
PR	MCR	G73S/T	R	73	3
PR	MCR	V77I/V	R	77	7
PR	MCR	V82A	R	82	2
PR	MCR	N88N	S	88	1
PR	MCR	L89L	S	89	2
PR	MCR	L90M/L	R	90	2
PR	MCR	I93L	R	93	5

MCR: mutación en codón de resistencia

Total de mutaciones en el gen de la proteasa: 159

Tabla 4
Perfil de mutaciones en codones de resistencia del gen retrotranscriptasa del VIH-1

Gen	Observaciones	Mutaciones/ Polimorfismos	Tipo de las mutaciones	Posición en orden cartográfico	Número de mutaciones por posición
RT	MCR	M41M/L	R	41	3
RT	MCR	K43K/N	P-S	43	4
RT	MCR	E44D	R	44	1
RT	MCR	K65K	S	65	2
RT	MCR	D67D/N	R-S	67	4
RT	MCR	T69D/T	R-S	69	5
RT	MCR	K70R/K	R-S	70	5
RT	MCR	L74I/L/V	O-R-S	74	13
RT	MCR	V75M	R	75	1
RT	MCR	F77L	R	77	1
RT	MCR	W88C	O	88	1
RT	MCR	L100V/L	O-S	100	6
RT	MCR	K101E/K	R-S	101	3
RT	MCR	S105S	S	105	1
RT	MCR	V106I/V	O-S	106	3
RT	MCR	V108I	R	108	1
RT	MCR	Y155Y/F	R	115	5
RT	MCR	F116F	S	116	2
RT	MCR	V118I/V	S	118	5
RT	MCR	Q151K/Q/X	O-S	151	6
RT	MCR	Q161Q	S	161	2
RT	MCR	V179I/V	S	179	5
RT	MCR	Y181C/Y	R-S	181	6
RT	MCR	M184I/M/V	R	184	14
RT	MCR	Y188H/Y	R	188	1
RT	MCR	G190A/G	R-S	190	10
RT	MCR	H208H	S	208	1
RT	MCR	L209L	S	209	11
RT	MCR	L210L/W	R-S	210	11
RT	MCR	T215F/N/S/T/V/Y	O-R-S	215	7
RT	MCR	K219E/K/Q	R-S	219	3
RT	MCR	P225H/P	R-S	225	2
RT	MCR	F227F	S	227	9
RT	MCR	M230L	R	230	1

MCR: mutación en codón de resistencia

Total mutaciones en el gen de la retrotranscriptasa: 155

Además, se encontraron tres genotipos virales idénticos en tres pacientes de diferente procedencia en el país. Estos tres virus presentaron las mismas siete mutaciones asociadas a resistencia (dos

en el gen de la proteasa y cinco en el gen de la retrotranscriptasa), así como las mismas 41 mutaciones adicionales, de carácter silencioso o polimórfico, en los dos genes analizados (tabla 5).

Tabla 5
Mutaciones en cada uno de los virus aislados a partir de los tres pacientes (P13, P14 y P16) que presentan correspondencia estricta en su perfil genotípico

Perfil de mutaciones en pacientes 13 - 14 - 16

Gen	Mutación	Tipo	P13	P14	P16	Secuencia de aminoácidos mutantes PROTEASA
PR	T12S	Polimorfismos	T12S	T12S	T12S	S
PR	K14R	Polimorfismos	K14R	K14R	K14R	R
PR	G17G	Silenciosas	G17G	G17G	G17G	G
PR	Q18Q	Silenciosas	Q18Q	Q18Q	Q18Q	Q
PR	K20K	Silenciosas	K20K	K20K	K20K	K
PR	V32V	Silenciosas	V32V	V32V	V32V	V
PR	L33V	Resistencia	L33V	L33V	L33V	V
PR	S37S	Silenciosas	S37S	S37S	S37S	S
PR	Q58Q	Silenciosas	Q58Q	Q58Q	Q58Q	Q
PR	D60E	Resistencia	D60E	D60E	D60E	E
PR	L63L	Silenciosas	L63L	L63L	L63L	L
PR	I64V	Polimorfismos	I64V	I64V	I64V	V
PR	I66I	Silenciosas	I66I	I66I	I66I	I
PR	V75V	Silenciosas	V75V	V75V	V75V	V
PR	L97L	Silenciosas	L97L	L97L	L97L	L
PR	F99F	Silenciosas	F99F	F99F	F99F	F

Gen	Mutación	Tipo	P13	P14	P16	Secuencia de aminoácidos mutantes RETROTRANSCRIPTASA
RT	K70K	Silenciosas	K70K	K70K	K70K	K
RT	L74V	Resistencia	L74V	L74V	L74V	V
RT	L80L	Silenciosas	L80L	L80L	L80L	L
RT	K102Q	Polimorfismos	K102Q	K102Q	K102Q	Q
RT	Y115F	Resistencia	Y115F	Y115F	Y115F	F
RT	E122E	Silenciosas	E122E	E122E	E122E	E
RT	I135R	Polimorfismos	I135R	I135R	I135R	R
RT	N136N	Silenciosas	N136N	N136N	N136N	N

Gen	Mutación	Tipo	P13	P14	P16	Secuencia de aminoácidos mutantes RETROTRANSCRIPTASA
RT	G141G	Silenciosas	G141G	G141G	G141G	G
RT	G155G	Silenciosas	G155G	G155G	G155G	G
RT	F160F	Silenciosas	F160F	F160F	F160F	F
RT	S163S	Silenciosas	S163S	S163S	S163S	S
RT	F171F	Silenciosas	F171F	F171F	F171F	F
RT	P176S	Polimorfismos	P176S	P176S	P176S	S
RT	Y181C	Resistencia	Y181C	Y181C	Y181C	C
RT	M184V	Resistencia	M184V	M184V	M184V	V
RT	G190A	Resistencia	G190A	G190A	G190A	A
RT	I202V	Polimorfismos	I202V	I202V	I202V	V
RT	E204E	Silenciosas	E204E	E204E	E204E	E
RT	Q207Q	Silenciosas	Q207Q	Q207Q	Q207Q	Q
RT	L209L	Silenciosas	L209L	L209L	L209L	L
RT	L210L	Silenciosas	L210L	L210L	L210L	L
RT	R211N	Polimorfismos	R211N	R211N	R211N	N
RT	G213G	Silenciosas	G213G	G213G	G213G	G
RT	L214F	Polimorfismos	L214F	L214F	L214F	F
RT	D218D	Silenciosas	D218D	D218D	D218D	D
RT	H221Y	Polimorfismos	H221Y	H221Y	H221Y	Y
RT	P226P	Silenciosas	P226P	P226P	P226P	P
RT	F227F	Silenciosas	F227F	F227F	F227F	F

Discusión

Las mutaciones reveladas por la tipificación molecular de virus procedentes de diferentes pacientes remitidos al Instituto de Referencia Andino en Bogotá para genotipificación con fines terapéuticos, muestran una importante diversidad microbiana en las cepas infecciosas en la población colombiana. En efecto, se encontraron más de mil mutaciones virales solamente en 16 pacientes, entre las cuales 15,4% estaban asociadas a resistencia a los antirretrovirales, la mayoría de ellas en el gen

de la proteasa. El 84,5% restante corresponde a polimorfismos, mutaciones silenciosas y otro tipo de mutaciones que hasta el momento no han sido asociadas con resistencia, pero que pueden ser fuente de fracasos recurrentes en los tratamientos antirretrovirales.

Al analizar la cartografía molecular de las 1.064 mutaciones identificadas en los genes de la proteasa y de la retrotranscriptasa, en los 16 pacientes estudiados, se revelaron codones cuya secuencia muta con mayor frecuencia. De las 34 posiciones que presentaron mutaciones

asociadas con resistencia en el gen de la retrotranscriptasa, las más frecuentes se localizaron en las posiciones 184 y 74 con 18 sustituciones de tipo M184I/M/V y 13 sustituciones de tipo L74I/L/V, respectivamente. Por otra parte, entre las 32 posiciones con mutaciones asociadas a resistencia en el gen de la proteasa, las más frecuentes se localizaron en las posiciones 63 y 10, con 18 sustituciones de tipo L63G/H/L/P/R/S/V y 11 sustituciones de tipo L10I/L/V, respectivamente.

Al comparar estos resultados con los estudios más recientes en Latinoamérica, se encontró que las mutaciones más frecuentes en el Brasil, en pacientes con fracaso terapéutico, se localizaron en los codones 184 (>15%) del gen de la retrotranscriptasa y en el codón 90 (>18%) del gen de la proteasa [9, 10], lo cual coincide con lo encontrado en nuestro estudio preliminar solamente en lo que respecta a la retrotranscriptasa, pues las posiciones más frecuentemente mutadas en el gen de la proteasa de los virus aislados en Colombia se encuentran en los codones 10, 13, 20 y 58-63, cada una en más de 50% de los pacientes. El codón 90 del gen de la proteasa, el cual se encontró mutado en 9/49 pacientes brasileños, solamente aparece mutado en 2/16 pacientes colombianos, lo cual sugiere un vínculo distante entre los virus infecciosos en ambos países.

De acuerdo con el patrón genético de los tres virus tipificados, se puede

concluir que el paciente P16, de sexo masculino, y las pacientes P13 y P14, de sexo femenino, entraron en contacto con el mismo virus, bien de manera directa o bien mediante personas interpuestas. Este análisis complementario puede constituirse un indicador de utilidad para la trazabilidad epidemiológica de esta virosis en Colombia, aun si se considera que un paciente dado puede estar infectado por varias cepas a la vez y que están en actividad de mutación permanente en cada ciclo de replicación.

En total, 13 de los 16 pacientes presentaron virus diferentes, lo cual reafirma el amplio polimorfismo natural de estos virus, eventualmente potenciado a causa de posibles fenómenos de coinfección de diferentes cepas virales, así como el enorme riesgo de aparición de mutaciones insolubles desde el punto de vista terapéutico. Este hecho debe inducir a un mayor registro y control de las variantes del VIH que circulan en nuestro territorio.

Bibliografía

1. Caliendo AM, Yen-Lieberman B. Viral genotyping, in: Persing DH (ed.) *Molecular microbiology. Diagnostic principles and practice*. Washington: ASM Press. 2004;489-500.
2. Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Lader B, Dehertogh P, Machado E, *et al*. Drug-resistance reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes

- (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology*. 2000;15:107-15.
3. Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Chia JE, Edoul EM, Delaporte E, Peeters M. High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a Country with broad HIV-1 genetic diversity. *J Clin Microb*. 2011;49:1635-41.
 4. ONUSIDA. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA. Fecha de consulta: 15 de abril de 2011. Disponible en: <http://search2.unaids.org/custom/search.asp>.
 5. Brindeiro R, Díaz, R, Sabino E, Morgado M, Pires I, Brígido L, Dantas M, Barreira D, Teixeira P, Tanuri A and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIVBResNet): A survey of chronically infected individuals. *AIDS*. 2003;17:1063-9.
 6. AIDSINFO. Virologic and immunologic failure (updated January 10, 2011). Fecha de consulta: 18 de agosto de 2011. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov>.
 7. Díaz-Granados CA, Álvarez C, Prada G, Sarmiento C, Martínez F, Pulido A, *et al*. Guía para el manejo de VIH/SIDA basada en la evidencia - Colombia. Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia y Fundación para la Investigación y Desarrollo de la Salud y la Seguridad Social, Bogotá, 2005.
 8. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, *et al*. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS*. 2000;14:83-93.
 9. Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RSG, Chequer-Fernandez SL, *et al*. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: Assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:73-8.
 10. Soares Medeiros M, Gomes Arruda EA, Littleton Guerrant R, Brown C, Hammarckjold ML, Rekosh D, *et al*. Genotype testing and antiretroviral resistance profiles from HIV-1 patients experiencing therapeutic failure in northeast Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2007;11:390-4.