

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES PUNTUALES RELACIONADAS CON RESISTENCIA A DROGAS EN VIH-1 DE PACIENTES PERUANOS

Carlos Yábar V¹, Pedro Chávez H², Zoila Varas H³, Rafael Rodríguez B³

RESUMEN

Objetivo: Identificar mutaciones puntuales relacionadas con resistencia a drogas en VIH-1 de pacientes peruanos. **Materiales y métodos:** Se seleccionaron 11 muestras de VIH provenientes de sangre total de sujetos con tratamiento antirretroviral (ARV). Posteriormente se realizó la optimización de la amplificación de 337 pb del gen de la transcriptasa reversa (*tr*) y 377 pb de todo el gen de la proteasa (*prt*). Los productos de PCR fueron secuenciados directamente para el análisis de mutaciones de resistencia. Las secuencias finales fueron analizadas en programas de análisis de mutaciones de la *HIV Drug Resistance Database* de la Universidad de Stanford. **Resultados:** La optimización de la concentración de ADN (2,5 ng / μ L) así como la concentración de magnesio (4 mM) fueron factores críticos para la amplificación de la *tr* y la *prt* respectivamente. De otro lado, el análisis de secuencia reveló la presencia de las mutaciones T215Y y la M184V en *tr*, implicadas en conferir resistencia a zidovudina (AZT) y estavudina (D4T) así como a lamivudina (3TC) y emtricitabina (FTC) respectivamente. En *prt* se observaron las mutaciones D30N y N88D implicadas en conferir resistencia a nelfinavir (NFV). Es importante señalar que sólo tres muestras de VIH-1 presentaron mutaciones de resistencia, las demás mostraron mutaciones compensatorias. **Conclusiones:** Se demuestra la existencia de mutaciones de resistencia a ARV a nivel de *tr* y *prt* de VIH-1 en sujetos peruanos que reciben terapia TARGA. Se requieren de mayores estudios para establecer un perfil de resistencia a ARV en la población peruana.

Palabras clave: VIH; Mutación puntual; Transcriptasa reversa; Proteasa; Genotipificación (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: Identify point mutations related to HIV-1 drug resistance in Peruvian patients. **Materials and methods:** A total of 11 HIV-1 positive samples were selected, all were obtained from the whole blood of subjects undergoing anti-retroviral (ARV) treatment. 337 gene base pairs (bp) from reverse transcriptase (*rt*) and 377 bp from the whole protease gene (*prt*) were optimized. PCR products were sequenced directly for the analysis of resistance mutations. Final sequences were analyzed in the University of Stanford HIV Drug Resistance Database programs. **Results:** Optimization of DNA concentration (2,5 ng / μ L), as well as magnesium concentration (4mM) were critical factors for *rt* and *prt* amplification, respectively. On the other hand, the sequence analysis showed the presence of T215Y and M184V mutations in *rt*, implicated in zidovudine (AZT), stavudine (D4T), lamivudina (3TC) and emtricitabine (FTC) resistance, respectively. In *prt*, mutations D30N and N88D were observed. These mutations have been implicated in nelfinavir (NFV) resistance. It must be highlighted that only three HIV-1 positive samples showed resistance mutations. The remaining samples showed compensatory mutations. **Conclusions:** This study demonstrated the existence of ARV resistance mutations at the HIV-1 *rt* and *prt* levels in Peruvian patients undergoing HAART therapy. Further studies are required to establish an ARV resistance pattern in the Peruvian population.

Key words: HIV; Point mutation; Reverse transcriptase; Protease; Genotyping (source: DeCS BIREME).

¹. Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

². Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

³. Programa Militar de Enfermedades de Transmisión Sexual y SIDA (PROMETSS), Hospital Militar Central. Lima, Perú.

INTRODUCCIÓN

El SIDA ha cobrado millones de víctima humanas en la última década. Los últimos informes afirman que sólo en el 2005, cerca de 3,1 millones de personas alrededor del mundo han muerto de SIDA, de los cuales aproximadamente 570 mil fueron menores de 15 años. Los casos nuevos hasta diciembre de 2005 llegaron casi a los cinco millones de personas entre adultos y niños¹.

En nuestro país, se han notificado hasta la fecha más de 24 mil casos confirmados de VIH y 17 mil por SIDA, de los cuales cinco mil ya fallecieron. Hasta diciembre de 2005 se reportaron más de dos mil casos nuevos de VIH¹⁻³.

Aunque no existe hasta el momento un tratamiento que elimine totalmente la presencia del VIH en sangre, la administración de terapia antirretroviral permite disminuir la carga viral incrementando la población de células CD4/CD8 y en consecuencia restablece el estado de salud del paciente. Sin embargo, también selecciona en sangre especies de VIH que son básicamente mutantes resistentes a una o varias drogas generando con el tiempo resistencia a la terapia⁴. Para resolver ese problema es necesario realizar un cambio de terapia con conocimiento del tipo de resistencia que presenta el VIH-1 del paciente a fin de administrarle el medicamento apropiado.

El análisis de cepas de VIH resistentes a los antirretrovirales (ARV) mediante cultivo viral en células (técnica conocida como fenotipificación) se presenta como una solución a dicho problema, pero se requiere de laboratorios de bioseguridad 3 y 4, un adecuado entrenamiento y alto presupuesto para el mantenimiento de la técnica. Además, involucra la conservación de cepas estándares de VIH resistentes y sensibles así como también líneas celulares y manejo de equipos sofisticados⁵.

Recientemente la detección de mutaciones puntuales de resistencia a los ARV en VIH mediante la técnica de genotipificación ha aparecido como una nueva alternativa para la detección rápida y específica de resistencia a los ARV, siendo su uso muy frecuente en la práctica clínica^{4,5}.

La genotipificación presenta la capacidad de detectar la resistencia a múltiples drogas a través del análisis de mutaciones que en muchos casos los ensayos de fenotipificación quedan limitados. A ello añadimos las ventajas económicas de estas pruebas moleculares en comparación con la fenotipificación y el tiempo relativamente corto que se emplea⁶.

Actualmente la técnica se viene usando en países desarrollados como rutina; sin embargo, en países de Sudamérica el uso de la genotipificación es limitado. Argentina fue el primer país en emprender un estudio para la detección molecular de resistencia a los ARV en VIH-1 mediante el uso del kit comercial *ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2* con la aprobación del Ministerio de Salud de su país (Applied Biosystems, 2000)^{7,8}. Brasil también implementó este sistema en el 2001 con aprobación del Ministerio de Salud estableciendo la Red Nacional de Genotipificación de VIH o RENAGENO^{9,10}. En Chile se viene trabajando con un sistema de genotipificación "hecho en casa" con resultados muy similares a los obtenidos usando kits comerciales (comunicación personal del Dr. Jorge Fernández Ordenes, Instituto Nacional de Salud Pública de Chile, 2003).

En el Perú aún no se ha informado sobre estudios destinados a la identificación de mutaciones puntuales relacionados con resistencia a los ARV en VIH-1. Sin embargo, existen algunas entidades que vienen aplicando la genotipificación de VIH mediante kits comerciales, aunque de manera muy restringida, debido al alto costo de los reactivos. En la generalidad de los casos, muchos hospitales, instituciones y clínicas particulares realizan envíos de muestras al extranjero para ser analizadas mediante genotipificación.

Debido a la falta de un sistema que permita identificar a nivel molecular cepas de VIH-1 resistentes a los ARV en nuestro medio, planteamos el desarrollo de este estudio con el objetivo de identificar los cambios genéticos o mutaciones puntuales del VIH-1 asociados con la resistencia a los ARV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrolló un estudio tipo serie de casos entre los pacientes atendidos en el Programa Militar de Enfermedades de Transmisión Sexual y SIDA (PROMETSS) del Hospital Militar Central (HMC) durante octubre de 2003 y marzo de 2004.

Se incluyeron pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años que muestran carga viral con tendencia estable y superior a 400 copias/mL (valor que representa el límite mínimo de copias que detecta el Kit Amplicor HIV-1) con esquema de tratamiento ARV definido; se excluyeron a los sujetos inmunosuprimidos sin causa conocida y los que no aceptaron participar del estudio.

La población de estudio fue de 25 pacientes, sin embargo se seleccionó una muestra de once sujetos, por conveniencia. Estos pacientes después de aceptar su

participación en el estudio firmaron un consentimiento informado y llenaron una ficha asistida para recabar información respecto a sus datos personales (iniciales de sus nombres y códigos para su identificación) y el tipo de tratamiento ARV.

Para la toma de muestra, se realizó la extracción de 3 mL de sangre venosa en tubos al vacío con anticoagulante EDTA K₃ mediante punción en el pliegue del codo derecho. Las muestras fueron colectadas en cuatro tubos para: 1) análisis del hemograma, 2) recuento de linfocitos CD4, 3) carga viral para VIH y 4) PCR y secuenciamiento de ADN.

Para la extracción de ADN total se utilizó el kit Qiamp DNA Mini (QIAGEN). El procedimiento fue llevado a cabo según recomendaciones del fabricante mezclando 200 µL de sangre con 20 µL de proteasa en un tubo de 1,5 mL. Posteriormente, la mezcla fue incubada a 56 °C por diez minutos en baño María y luego sometida a procesos de lavado y centrifugación a 8000 rpm por un minuto, para remover las impurezas. Finalmente el ADN genómico fue purificado con 150 µL de agua desionizada en tubos de 1,5 mL, y almacenados a -20 °C para su posterior utilización.

El material genético resuspendido en agua fue cuantificado usando un espectrofotómetro de luz ultravioleta Spectronic 21D. Para tal efecto se hizo una dilución final de material genético en NaCl 0,1 M (proporción 1:50) colocando la mezcla total en una cubeta de cuarzo (Shimadru). La lectura fue realizada a 260 nm en presencia de luz UV considerando que una densidad óptica (DO) es equivalente a 50 µg / mL de ADN.

Todos los procedimientos de PCR fueron realizados usando el termociclador *Perkin Elmer Applied Biosystems* modelo 9600. Para la amplificación de cada gen se realizó un *Heminested-PCR* el cual consistió en el uso de los iniciadores o *primers* específicos NE1 y *pol A* (primer *round*), y B y *pol A* (segundo *round*) para la amplificación final de una región de 339 pb del gen *tr* según las condiciones reportadas por Wilson *et al.*¹¹ con algunas modificaciones. Asimismo se amplificó una región de 377 pb que incluyó todo el gen *prt* (297 pb) usando los *primers* PT-1 y PT-2 (primer *round*) y PT-3 y PT-2 (segundo *round*) de acuerdo con las condiciones reportadas por Boden *et al.*¹² con algunas modificaciones.

Para optimizar la amplificación de los genes de VIH-1 de interés, se realizaron curvas de concentración de cada componente de la reacción. Estas curvas se llevaron a cabo considerando los componentes más críticos del PCR, entre los cuales se mencionan:

Curva de magnesio. Se utilizaron concentraciones de 0, 1, 2, 3 y 4 mM de magnesio para cada reacción de PCR.

Curva de material genético (ADN y ARN total). Para lo cual fue importante calcular la concentración de material genético de cada muestra y posteriormente realizar curvas de concentración considerando valores de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ng.

Curva de volumen de ADN de PCR del primer round. Fue usado como molde en el segundo *round* (*Heminested PCR*) usando diluciones desde 1:10 hasta cantidades concentradas de producto de PCR de 5 µL.

Curva de temperatura de alineamiento. Por la cual se probaron distintos valores de temperatura de alineamiento (TA) desde 50 °C hasta 60 °C.

Para realizar el secuenciamiento de los genes *rt* y *prt* de VIH se usó un volumen de 4 µL (aproximadamente 200 ng / µL) de producto de PCR purificado por columna (kit *Wizard PCR Prep*, Promega) el cual fue sometido a una reacción de secuenciamiento por el método de Sanger *et al.*¹³ siguiendo el protocolo establecido por los fabricantes del kit de secuenciamiento termo secuense *Cy5 Dye Terminador Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences)*. La reacción de secuenciamiento tanto para la *tr* como para la *prt* se llevó a cabo usando el termociclador *PE Applied Biosystems*. Las condiciones de secuenciamiento de la *tr* y *prt* fueron las mismas que durante el PCR con excepción de la temperatura de alineamiento para la amplificación de la *prt* donde se usó una temperatura de 55 °C por un minuto durante 35 ciclos. Una vez finalizada la reacción, el producto de PCR fue resuspendido en 6 µL de formamida desionizada. La mezcla final fue sometida a electroforesis en un secuenciador automático *ALF Express* usando 1500 voltios por 700 minutos. Los datos de secuenciamiento fueron almacenados directamente en la base de datos del programa *ALFwin™ Sequense Analyser 2.10*.

Para el análisis de secuencias de ADN, se realizó la alineación de secuencias mediante el programa *Alignment* (www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/alignpage.cgi) el cual comparó las secuencias de nucleótidos de cada una de las muestras con genomas completos de cepas de referencia de VIH reportadas en el banco de genes. Cada una de las ambigüedades o nucleótidos indefinidos fueron corregidos de acuerdo con secuencias de referencia y a los valores de las curvas de cada nucleótido usando el programa *ALFwin™ Sequense Analyser 2,10*. Las secuencias de cada una de las muestras fueron posteriormente realineadas con las secuencias de

referencia de VIH previamente caracterizadas y reportadas en el banco de genes usando el programa *ClustalW* versión 1,8 (www.ebi.ac.uk/clustalw/).

Para confirmar el correcto marco de lectura de las secuencias obtenidas se realizó la traducción de nucleótidos a aminoácidos usando seis marcos de lectura diferentes mediante el programa *Translate* del servidor *Expasy tool* (www.expasy.org/tools/).

Previo al análisis de mutaciones se procedió a realizar la evaluación de control de calidad de todas las secuencias con el fin de descartar alguna contaminación durante la edición, presencia de ambigüedades, codones de detención o contaminación cruzada entre las muestras. Para tal fin se recurrió a las especificaciones de control de calidad de secuencia recomendada por Los Álamos (www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CONTAM/contam_main.html) para lo cual se realizó una alineación de secuencias con el programa *ClustalW* versión 1,8 y el análisis filogenético mediante el programa *Mega* versión 3,1 por el método *Neighbor-Joining* usando el modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura con un *bootstrap* de 1000 réplicas y una distribución gamma de 0,5.

Para el análisis de las mutaciones de resistencia se utilizó el servidor *HIV Drug Resistance Database* de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>), del cual se usó el programa *HIV db Drug Resistance Algorithm beta test* (http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb). Este programa permite encontrar mutaciones relacionadas a más de 17 ARV diferentes.

También se usó el programa *HIV seq* (http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivseq&action=showSequenceForm), el cual permite comparar nuevas secuencias con una base de datos de mutaciones de resistencia. El análisis de mutaciones fue completado y confirmado mediante el programa *Geno2pheno* (<http://www.geno2pheno.org/cgi-bin/geno2pheno.pl>) y el programa *ADRA* (*Antiviral Drug Resistance Analysis tool*) incluido en la base de datos de Los Álamos (www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/ADRA/adra.html).

RESULTADOS

RECUESTO DE CD4 Y CARGA VIRAL

En los once sujetos seleccionados se evidenció una aparente resistencia al tratamiento ARV con más de cuatro mil copias/mL durante un tratamiento prolongado entre dos meses hasta seis años. De manera importante se observó una persistente carga viral (11 mil copias/mL) en un paciente con antecedentes de hasta dos esquemas diferentes de tratamiento ARV (Tabla 1).

AMPLIFICACIÓN DE *tr* Y *prt*

De acuerdo con los resultados obtenidos, el tamaño del producto de amplificación de la *tr* fue de 339 pb, mientras que en el caso de la *prt* se logró visualizar una banda de 377 pb (Figuras 1 y 2). Durante el proceso de estandarización de PCR se observó que la concentración de ADN (2,5 ng / μ L) fue uno de los factores más importantes para lograr la amplificación de la *tr*.

Tabla 1. Características de tratamiento ARV, recuento celular y carga viral de la población en estudio.

Código	Carga viral (copias/mL)	Conteo CD4	Tiempo de tratamiento ARV	Esquema de tratamiento ARV [†]
CO2	20638	128	2 años	AZT/3TC + NFV
CO5	4232	181	6 años	AZT/3TC + NFV
CO7	70949	146	2 años	AZT/3TC + EFV
CO9	7041	134	1 año	AZT/3TC + EFV
CO14	16050	152	2 meses	LPV/RTV + EFV
CO15	189251	21	4 meses	LPV/RTV + EFV
CO18	9368	336	4 años	AZT/3TC + NFV
CO19	110118	154	2 años	AZT/3TC + EFV
CO21	750000	40	2 meses	LPV/RTV + AZT + 3TC
CO22	11543	181	6 meses	EFV + DDI + AZT
			ND*	AZT/3TC+NFV*
			ND*	ABC + D4T + DDI*
CO25	381246	34	3 meses	AZT/3TC+ LPV/RTV

* ND: tiempo no determinado de tratamiento. † AZT: zidovudina, 3TC: lamivudina, NFV: nelfinavir, EFV: efavirenz, LPV: lopinavir, RTV: ritonavir, DDI: didanosina, ABC: abacavir, D4T: estavudina.

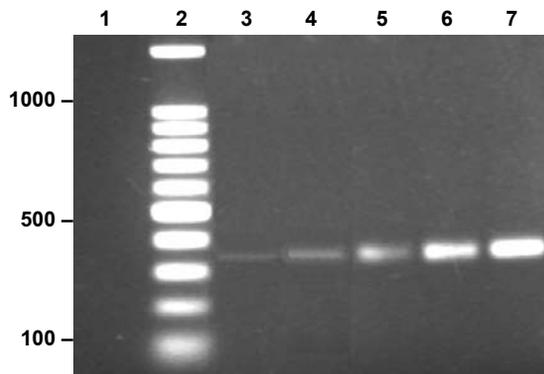


Figura 1. Amplificación de 339 pb del gen de la transcriptasa reversa mediante curva de concentración de material genético total. Carril 1: control de sistema (sin ADN), carril 2: marcador de peso molecular 100 pb ladder, carriles 3, 4, 5, 6 y 7: 0,5, 1, 2, 2,5 y 5 ng / μ l de concentración final de material genético en la reacción.

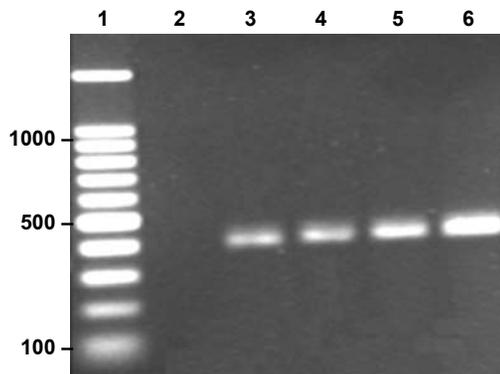


Figura 2. Amplificación de 377 pb del gen de la proteasa mostrando la curva de magnesio para la amplificación del gen. Carril 1: marcador de peso molecular 100pb ladder. Carril 2: control sin Mg. Carriles del 3 al 6: 1, 2, 3 y 4 mM de concentración final de magnesio respectivamente en la reacción.

En el caso de la *prt*, se observó que la concentración de magnesio (4mM) y la utilización de los *primers* alternativos vasRVP3 y sAV84 (1pmol / μ L) fueron factores relevantes para lograr la amplificación del fragmento esperado. Finalmente es importante señalar que la sensibilidad del PCR varió para cada uno de los genes, para el caso de la *tr* fue de 100% mientras que para la *prt* fue de 91%.

derar secuencias de los *primers*. De acuerdo con los resultados, se observó que ninguna de las secuencias analizadas formó linajes filogenéticos estrechamente relacionados tal como ocurre entre secuencias de una misma especie (Figura 3).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINACIÓN CRUZADA ENTRE CEPAS DE VIH

ANÁLISIS PARA LA DISCRIMINACIÓN DE MUTACIONES ASOCIADAS CON DROGAS

Para descartar la presencia de contaminación cruzada entre las cepas analizadas se realizó el análisis filogenético usando 281 pb de *tr* y 306 pb de *prt* sin consi-

Respecto a la *tr* los datos revelaron que las muestras CO2 y CO25 presentaron mutaciones importantes de resistencia a ARV. En el caso de CO2 se observaron las mutaciones T215Y y la M184V. La primera (T215Y) está altamente implicada en conferir resistencia a zidovudina (AZT) y estavudina (D4T) y en un nivel bajo de resistencia a didanosina (DDI), tenofovir (TDF) y abacavir (ABC).

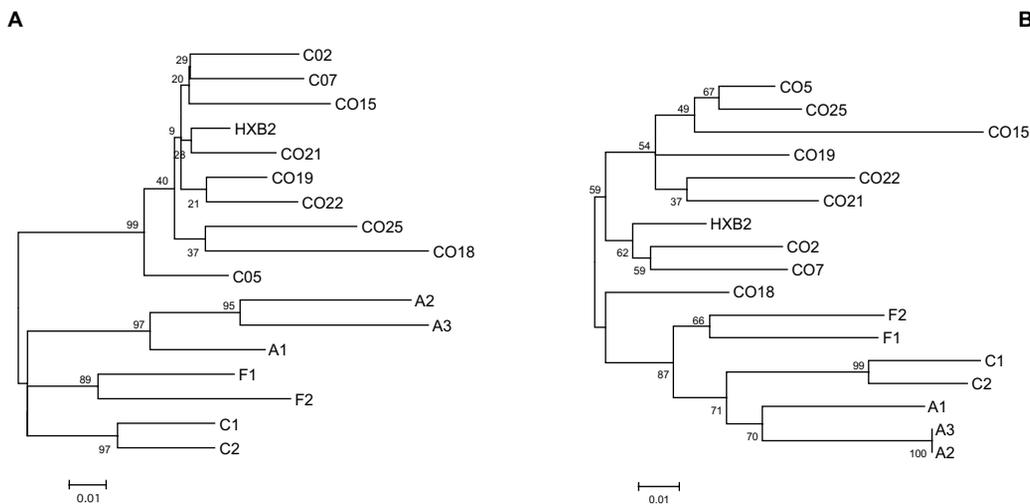


Figura 3. Análisis filogenético del gen *rt* (panel A) y del gen *prt* (panel B). Las secuencias de referencia corresponden a los siguientes subtipos de VIH (en paréntesis se señala el número de acceso): HXB2 (K03455), A1 (AF286237), A2(AF004885), A3 (AF286241), F1 (AJ249238), F2 (AJ249236), C1 (U52953) y C2 (U46016).

Tabla 2. Mutaciones de VIH-1 encontradas en sujetos peruanos con tratamiento TARGA.

Código	Mutaciones en <i>tr</i>			Mutaciones en <i>prt</i>			Tratamiento TARGA actual		
	INTR	INNTR	Otras	Mayores	Menores	Otras	INTR	INNTR	IP
HXB2	-	-	-	-	-	I3V, N37S	-	-	-
CO2	T215Y, M184V, L214F		V245K, D250E	D30N, N88D	K20I, L63A, A71V, V77I	I13V, K14R P79A	AZT + 3TC	-	NFV
CO5	L214F	K173E, T200E, 207E, R211K	-	-	M36I, L63P, A71V, I93L	I3T, E35D, N37D, L38F, P39S, R41E, D60E, Q61E, I62V	AZT + 3TC		NFV
CO7	R211K		G196E, T200R, R211K, F214L, V245M, D250E	V32I	L63T, V77I	L24P, T31S, E35K, Q61P, I72E	AZT + 3TC	EFV	-
CO9	R211K, L214F		I178M, V245E	ND	ND	ND	AZT + 3TC	-	NFV
CO14	L214F		R211K	ND	ND	ND	-	EFV	LPV + RTV
CO15	L214F		D177E, G196E V245I	-	-	-		EFV	LPV + RTV
CO18	-	-	-	-	L10V, M36I, L63A, I93L	-	AZT + 3TC	-	NFV
CO19	-	K201R, I202V, R211K	-	-	M36I, D60E, L63P, V77I, I93L	-	AZT + 3TC	EFV	-
CO21	-	I178L, V245E	-	-	D60E, L63P, V77I, I93L	-	AZT + 3TC	-	LPV + RTV
CO22	-	T200I, R211K, V245M	-	-	L10I, L63P, A71V V77I, I93L	V11A, L90F	AZT + DDI	EFV	-
CO25	M184I	S162C, I195L, T200E, I202V, R211K, Q197K	-	-	M36I, D60E, L63P, A71V, I93L	-	AZT + 3TC	-	LPV + RTV

Nota: en negrita se resaltan las mutaciones relacionadas directamente con resistencia. **ND:** muestras en las que no se pudo determinar las mutaciones. **HXB2:** cepa de VIH de referencia proveniente de un sujeto africano sin tratamiento. **INTR:** inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa; **INNTR:** inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa; **IP:** inhibidores de la proteasa.

La segunda mutación M184V confiere un alto nivel de resistencia a lamivudina (3TC) y emtricitabina (FTC), y una probable resistencia en bajo nivel a DDI y ABC.

De otro lado, CO25 mostró la mutación M184I, la cual actúa de manera similar a M184V confiriendo resistencia a los mismos ARV. Todas las demás muestras mostraron cambios no directamente asociados con resistencia a ARV para la *tr* (Tabla 2).

Para el caso de la *prt*, la muestra CO2 presentó las mutaciones D30N y N88D las cuales están directamente relacionadas con resistencia a nelfinavir (NFV) un inhibidor de proteasa (IP). En el caso de CO7 se observó la mutación V32I la cual confiere resistencia en asociación con otras mutaciones a indinavir (IDV), ritonavir (RTV), amprenavir (APV) y lopinavir (LPV). Es de resaltar que la muestra CO7 proviene de un paciente

que nunca recibió alguna droga frente a IP. Un caso similar también se observó en CO19 donde se observaron diferentes mutaciones menores relacionadas con resistencia frente a IP.

Es importante señalar que al igual que en *tr*, otras mutaciones inusuales también han sido observadas en esta región de la *prt* principalmente en CO2, CO5, CO7 y CO22.

Por último cabe resaltar que tanto para *rt* como para *prt* los datos de secuencia de las muestras CO18, CO19 y CO21 no mostraron mutaciones directamente implicadas en resistencia a ARV; sin embargo, los datos de carga viral de los pacientes fueron relativamente altos (entre 11000 a 750000 copias / mL) con aparente resistencia a su esquema de terapia ARV.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos analizado dos regiones genéticas correspondientes a los genes *rt* y *prt* con el fin de identificar mutaciones de resistencia en muestras de VIH de sujetos con tratamiento previo. Aunque las condiciones de amplificación de ambos genes ya han sido reportadas^{11,12}, fue necesario realizar la optimización del *heminested* PCR de acuerdo con las condiciones de nuestro laboratorio. La estandarización de la concentración de parámetros críticos como ADN y magnesio permitió la amplificación de todas las muestras excepto la porción de *prt* de CO14. Al respecto es importante señalar que una de las causas más probables que evitó la amplificación de *prt* fue la presencia de mutaciones en el sitio de alineación de los *primers* que alteraron la secuencia de reconocimiento. Aunque también es probable que la falla de amplificación haya ocurrido por la presencia de algún inhibidor del sistema de PCR, la amplificación de *tr* de CO14 demuestra que no existió ningún tipo de inhibidor. En ese sentido, el uso de *primers* alternativos con bases modificadas podría solucionar el problema de amplificación en esta muestra y de manera general para nuevas muestras de VIH en futuros ensayos.

De otro lado, hemos identificado mutaciones puntuales relacionadas con resistencia a los ARV en sujetos que reciben terapia ARV. Muchas de estas mutaciones tuvieron relación directa con el tratamiento ARV del paciente. Tal es el caso de las mutaciones T215Y y M184V las cuales fueron encontradas en la cepa CO2 proveniente de un paciente tratado con AZT y 3TC. De manera interesante, ambas mutaciones han sido relacionadas con una alta resistencia a AZT y 3TC¹⁴. Es importante señalar que este mismo paciente de acuerdo con su historial clínico recibió tratamiento con NFV, un potente IP. Al hacer el análisis de *prt* de CO2, se encontraron las mutaciones D30N y N88D las cuales están directamente relacionadas con alta resistencia a NFV¹⁵. Estos datos en conjunto indican que la cepa CO2 que infecta al paciente en mención presenta mutaciones de resistencia frente a todo el esquema de terapia ARV, lo cual concuerda con la alta carga viral (20638 copias / mL) que presenta pese a los dos años de tratamiento continuo. Estos datos sugieren la necesidad de un cambio de esquema de medicamento apropiado.

También se ha logrado identificar la mutación M184I en el paciente CO25, la cual también ha sido relacionada con una alta resistencia a 3TC. En este caso, el paciente también recibió terapia con 3TC durante tres meses. Sin embargo, al analizar otras sustituciones en la *tr* del VIH-1 del paciente CO25, se detectaron mutaciones se-

cundarias relacionadas con inhibidores no nucleósidos de transcriptasa reversa (INNTR) medicamentos que no figuran en la historia de tratamiento del paciente. De manera similar a este último caso, hubo dos pacientes que nunca recibieron tratamiento frente a IP, sin embargo, se observaron mutaciones de resistencia a nivel de *prt* como es el caso de CO7 y CO19.

La presencia de mutaciones no relacionadas con el tipo de tratamiento ARV que recibieron los pacientes sugieren dos posibilidades: 1) una probable contaminación cruzada entre las muestras durante los procedimientos de amplificación de los genes, ó 2) la presencia de resistencia primaria.

Para descartar la primera posibilidad se realizó un análisis de identidad genética y análisis filogenético, el cual demostró que ninguna de las muestras analizadas tenía más de 80% de identidad ni tampoco similar distancia genética (Figura 3). Estos datos demuestran desde el punto de vista filogenético, que ninguna de las cepas de VIH fue 100% idéntica, lo cual descarta cualquier probabilidad de contaminación cruzada.

Por tanto, las mutaciones de resistencia a un fármaco identificadas en los sujetos que nunca recibieron algún tratamiento relacionado sugiere la existencia de resistencia primaria. Es importante señalar que este tipo de casos ha sido recientemente reportado en sujetos que nunca recibieron terapia ARV¹⁶⁻¹⁸ señalando que la principal causa es la transmisión de cepas de VIH resistentes a los ARV proveniente de otro sujeto infectado. Aunque no se tienen datos relacionados con la conducta sexual de los pacientes, es probable que estos sujetos hayan sido reinfectados con cepas resistentes provenientes de sus parejas sexuales.

De otro lado, se han identificado algunas mutaciones que no están directamente implicadas en conferir resistencia a los ARV conocidas como mutaciones compensatorias. Al respecto, es importante resaltar que las mutaciones compensatorias han sido implicadas en restaurar la capacidad replicativa del virus, la cual es afectada por la presencia de mutaciones mayores que confieren resistencia a los ARV¹⁹. En nuestro estudio hemos observado mutaciones compensatorias en todas las muestras analizadas tanto en *rt* como en *prt*. Sin embargo, en la mayoría de muestras con la excepción de CO2, CO7, CO22 y CO25 no hemos encontrado mutaciones mayores.

Debido a que sólo hemos considerado el análisis de la región codificante del dominio catalítico de la transcriptasa reversa¹¹ no fue posible identificar otras mu-

taciones mayores localizadas en otras regiones de *tr* relacionadas con las mutaciones compensatorias. Por tanto, se requiere el análisis de toda la región que codifica la transcriptasa reversa con el fin de caracterizar posibles mutaciones mayores relacionadas con resistencia a los ARV.

Los datos mostrados en el presente estudio demuestran la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a los ARV en VIH-1 de sujetos con tratamiento. Al respecto, es importante mencionar que este es el primer estudio que se realiza en sujetos peruanos a través de un sistema de genotipificación "hecho en casa", el cual puede ser validado para su implementación en la vigilancia de resistencia a inhibidores de transcriptasa reversa y proteasa en el Perú. De otro lado, este sistema también puede ser usado de manera alternativa para la detección de resistencia primaria en sujetos vírgenes de tratamiento.

Si bien el sistema de genotipificación reportado en este trabajo permite identificar mutaciones mayores de resistencia en VIH de manera rápida y sencilla, sólo se ha considerado el análisis de aproximadamente 28% de la *tr*. En consecuencia, se requiere hacer el análisis del gen completo a fin de contar con toda la información de las diferentes mutaciones que afectan a la transcriptasa reversa.

Finalmente, es importante señalar que la población seleccionada en el estudio es pequeño y no representa a la población en general; sin embargo, los datos informados servirán de base para posteriores estudios en los cuales se considere una población mayor que permita establecer el perfil de resistencia a los ARV en la población peruana.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la participación de los técnicos de laboratorio Juana Choque Portilla y David García Neyra en la realización de las pruebas moleculares. Agradecemos también el apoyo científico del Blgo. Omar Cáceres Rey durante la amplificación y caracterización del gen de la transcriptasa reversa del VIH-1. Finalmente agradecemos a las biólogas Rose Mary Sagastegui y Ada Vivanco del Laboratorio de Referencia del COPRECOS por su apoyo en la determinación de células CD4 y carga viral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Joint United Nation Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).** AIDS epidemic update: December 2005. Geneva: UNAIDS/WHO; 2005. UNAIDS/05.19E
2. **Oficina General de Epidemiología.** Boletín Epidemiológico Mensual, Diciembre 2005: Situación del VIH-SIDA en el Perú [documento en internet]. Fecha de acceso: marzo 2006. Disponible en: http://www.oge.sld.pe/vigilancia/vih/Boletin_2005/diciembre.pdf.
3. **Cabello R.** La situación del VIH / SIDA en el Perú al año 2005 [documento en internet]. Lima: VIA LIBRE; 2005. fecha de acceso: marzo 2006. Disponible en: <http://www.vialibre.org.pe/noticias/diamudia/Situvihsidadic2005.pdf>.
4. **García-Lerma JG, Heneine W.** Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to reverse transcriptase and protease inhibitors: genotypic and phenotypic testing. *J Clin Virol* 2001; 21(3): 197-212.
5. **Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al.** Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection. Implications for clinical management. *JAMA* 1998; 279(24): 1984-91.
6. **Simsock M, Sendi P, Ledergerber B, Keller T, Schupbach J, Battegay M, et al.** A longitudinal analysis of healthcare costs after treatment optimization following genotypic antiretroviral resistance testing: does resistance testing pay off? *Antivir Ther* 2006; 11(3): 305-14.
7. **Applied Biosystems.** Argentina approves applied Biosystems ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2 for diagnostic procedures. First country to approve ViroSeq kit for clinical use [página de internet]. California: Applied Biosystems; 2000. Fecha de acceso: marzo 2006. Disponible en www.appliedbiosystems.com/press_releases/argentina/.
8. **Avila MM, Pando MA, Carrion G, Peralta LM, Salomón H, Carrillo MG, et al.** Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29(4): 422-26.
9. **Dantas MC, Lima JN, Vitoria MA, Teixeira PR, Costa-Filho RB, Grangeiro AL.** Building up a national network for HIV genotyping test in Brazil. *Int Conf AIDS* 2002; 14: abstract N°. B10188.
10. **Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso-dos-Santos WG, Rachid M, Morgado MG.** HIV-1 genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: accessing HIV-1 subtyping and drug resistance mutations. *Int Conf AIDS* 2004; 15: abstract N°. WePeB5749.
11. **Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH.** Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-GenotypR Method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8):3022-28.
12. **Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, et al.** HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999; 282(12):1135-41.
13. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74(12): 5463-67.
14. **Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, van Leeuwen R, Lange J, Danner S, et al.** Lamivudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants (184V) require multiple amino acid changes to become co-resistant to zidovudine in vivo. *J Infect Dis* 1997; 176(2): 398-405.

15. **Rhee SY, Fessel WJ, Zolopa AR, Hurley L, Liu T, Taylor J, et al.** HIV-1 protease and reverse-transcriptase mutations: correlations with antiretroviral therapy in subtype B isolates and implications for drug-resistance surveillance. *J Infect Dis* 2005; 192(3): 456-65.
16. **Tozzi V, Corpolongo A, Bellagamba R, Narciso P.** Managing patients with sexual transmission of drug-resistant HIV. *Sex Health* 2005; 2(3): 135-42.
17. **Cane PA.** Stability of transmitted drug-resistant HIV-1 species. *Curr Opin Infect Dis.* 2005; 18(6): 537-42.
18. **Hicks C.** Impact of HIV protease inhibitor resistance in treatment-naive populations in the United States. *AIDS Read.* 2005; 15(12):683-6, 689-90.
19. **Chen Z, Li Y, Schock HB, Hall D, Chen E, Kuo LC.** Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. *J Biol Chem* 1995; 270(37): 21433-36.

Correspondencia: Carlos Yábar Varas. Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

Dirección: Av. Defensores del Morro (ex Avenida Huaylas) 2268, Chorrillos. Lima 9.

Teléfono: (511) 251-6151 anexos 424 y 546.

Correo electrónico: cyabar@ins.gob.pe, bioyabar@yahoo.es