

LA HIPERMUTACIÓN EN LA SECCIÓN GAG-POL Y SU RELACIÓN CON LA FALLA EN LA GENOTIPIFICACIÓN DEL VIH

HYPERMUTATION IN THE "GAG-POL" SECTION AND ITS RELATION TO THE FAILURE IN HIV GENOTYPING

Jesús Rojas-Jaimes^{1,2}

RESUMEN

La genotipificación es un proceso de suma importancia en la terapéutica de los pacientes con VIH. Para llevarlo a cabo, se necesita amplificar correctamente la secuencia a estudiar. Se estudió la sección gag-pol del VIH en 12 muestras clínicas usando PCR-Pro viral, los cebadores de esta etapa fueron evaluados por bioinformática. Adicionalmente, se amplificó la región env y la beta-globina, para evaluar diferentes cebadores y la extracción de ácidos nucleicos, respectivamente. Usando los cebadores para amplificar la sección gag-pol, no se obtuvieron amplicones, y usando la bioinformática se observó deficiencia de los cebadores para unirse a la sección blanco, en contraste con las secciones conservadas env y beta-globina, donde sí hubo amplificación. Por tanto, se determinó que los cebadores para genotipificar la sección gag-pol no estarían uniéndose correctamente a la sección blanco, por presentar mutaciones.

Palabras clave: transcriptasa reversa, cebadores, antiretrovirales, VIH

ABSTRACT

Genotyping is an important process in the therapy of HIV patients; for this process we need to properly amplify the sequence to be studied. The "gag-pol" HIV section was studied in 12 clinical samples using proviral -PCR amplification, the primers of this stage were evaluated by bioinformatics. Additionally the "env" and "Beta-globin" region were amplified to evaluate different primers and nucleic acids respectively. Using primers to amplify the "gag-pol" section, not amplicons were obtained and using bioinformatics primers deficiency to bind to the target section was observed, in contrast to "env" and "beta-globin" conserved sections were amplified. Therefore primers for genotyping the "gag-pol" section properly binding to the target section due to the presence of mutations.

Keywords: reverse transcriptase, primers, antiretroviral, HIV

¹ LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

² LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR VIH/ETS, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. LIMA, PERÚ.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se han venido haciendo denodados esfuerzos en la lucha contra la infección del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH). En este camino, se han diseñado varias drogas que, en ciertas circunstancias, garantizan un alargamiento del tiempo de vida y prevenir la infección en los embarazos. Un tema vital, en este sentido, es la evaluación en el tiempo del efecto de estas drogas, contra el VIH. En este sentido, un factor clave ha sido la genotipificación del VIH en el interés de conocer la variabilidad, la sensibilidad o la resistencia a los retrovirales (1).

Existen diversas formas en las que el VIH cambia su genoma, incluyendo inserciones, deleciones, recombinaciones y mutaciones puntuales que llevan a diversas consecuencias, como inactivar el virus, volverlo más o menos virulento, y hacerlo resistente o sensible a las drogas. Es importante señalar que, desde la aplicación de la terapéutica de retrovirales, la evolución de la enfermedad del VIH cambió en forma notable su historia, debido a que la terapia puede llevar al paciente a presentar cargas indetectables en el transcurso de su vida (2, 3).

En el esquema terapéutico se utiliza, en forma básica, un coctel de fármacos compuestos por inhibidores de proteasa, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa e inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa. La forma usual para poder identificar tanto la sensibilidad como la resistencia a los fármacos es la genotipificación, que puede ser realizada mediante métodos automatizados, como el TRUGENE-VIH 1, con buenos resultados, y en los que los reactivos y las concentraciones están estandarizadas, lo que inhibe factores perjudiciales para la reacción por el uso de inhibidores de RNAasas; sin embargo, estos métodos son caros.

También se aplican los métodos “en casa”, como el Stanford, en que los reactivos son comprados en forma individual y agregados por pasos. Este proceso parece ser relativamente más barato, aunque demanda mayor tiempo y es susceptible de más errores por la posible degradación de las biomoléculas en sus múltiples pasos. Una fase clave en la detección de las variantes es el primer paso que desarrolla la amplificación proviral en una región entre la secuencia gag y pol, en la que el factor de mayor importancia es el uso correcto de cebadores (*primers*) en secciones en las que estas moléculas se puedan pegar en forma complementaria y correcta. De ser así, se podrá llegar a la etapa de secuenciamiento y lectura de la secuencia respectiva mediante un programa informático (que en el caso del método Stanford es de uso libre), con lo que se pueden relacionar las mutaciones encontradas con la resistencia a los fármacos (4).

El presente estudio pretende analizar las mutaciones en las secciones complementarias a los cebadores, en la primera ronda de amplificación, y su implicancia en la genotipificación del VIH.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio, se utilizaron muestras de 12 pacientes que recibieron tratamiento antirretroviral para genotipificar y evaluar su sensibilidad o resistencia a drogas, utilizando dos rondas de amplificación del genoma proviral. Posteriormente, se procedió a la evaluación de la carga viral de las muestras en estudio, seguida de la evaluación del ADN proviral de una región más conservada del VIH, como la sección de envoltura env, usando otros cebadores específicos para la sección conservada. Finalmente, se evaluó la calidad de la extracción del genoma de los pacientes amplificando la beta globina, para conocer la integridad del ácido nucleico extraído.

Se utilizaron los programas bioinformáticos ClustalW y WebLogo para localizar mutaciones en las secuencias gag-pol de genomas del VIH, e identificar mutaciones en las secciones blanco, donde se pegan los cebadores de primera línea.

Cebadores primera ronda de la genotipificación

Cebador 1: ttgaaatgtggaaggaaggac

Cebador 2: ctgtattctgctattaagtcttttgatggg

Cebador 3: actaagggaggggtattgacaaactc

RESULTADOS

En la genotipificación proviral, utilizando dos rondas de amplificación, no se lograron resultados favorables en comparación con otros grupos anteriores. Se constató que algunas muestras no amplificaban, a pesar de tener cargas virales altas (>1000 copias de RNA viral/ml).

En el caso de la sección env, a pesar de presumir que se encuentra en menor cantidad, muchas de las muestras

amplificaron, y se presume que las que no lo hicieron responden a una baja carga viral (<1000 copias de RNA viral/ml), que se puede correlacionar con la carga proviral (figura 2). Además, se pudo verificar que la extracción de ADN fue correcta, con una buena amplificación de la beta globina en las muestras que se traduce en un ADN íntegro (figura 3).

Por ser el subtipo B del VIH el que más predomina en el Perú y en muchos países de Sudamérica, realizamos un análisis bioinformático usando el programa ClustalW con 14 secuencias de la región gag-pol, secuencias del subtipo B de países sudamericanos, y las enfrentamos a la región complementaria de los 3 cebadores que se utilizan en la primera ronda de la amplificación proviral y que son los de mayor importancia en el proceso de la genotipificación Stanford. Se hallaron variaciones en las regiones complementarias de los cebadores, lo que fue corroborado usando el programa WebLogo, y se observó adicionalmente una variación topológica de ARN del VIH, lo que supone una dificultad en la complementariedad de los cebadores al genoma viral (figuras 4 y 5).

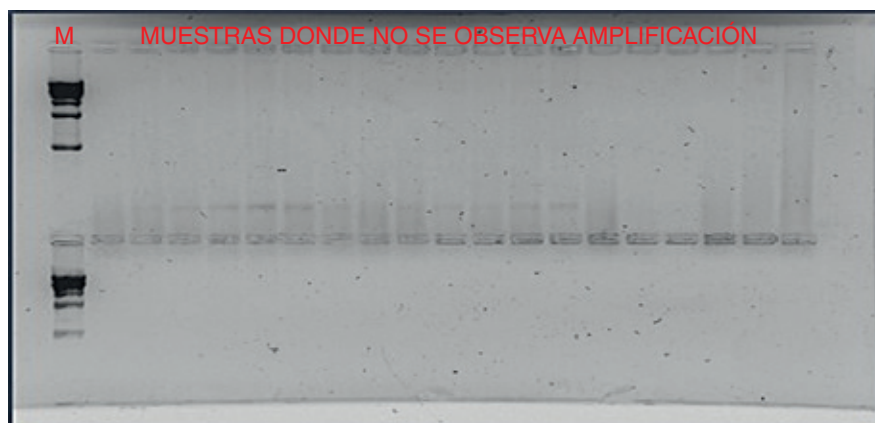


FIGURA 1. ELECTROFORESIS DEL PCR PRIMERA RONDA PARA AMPLIFICACIÓN DEL GAG-POL EN LA GENOTIPIFICACIÓN PROVIRAL DEL VIH, EN LA QUE NO SE OBSERVÓ AMPLIFICACIÓN. CARRIL 1. M: MARCADOR MOLECULAR. LOS CARRILES DEL 2 A 13 SON LAS MUESTRAS DEL 1 AL 12, Y LOS CARRILES DEL 14 AL 19 SON REPETICIONES DE LAS MUESTRAS DEL 1 AL 5.

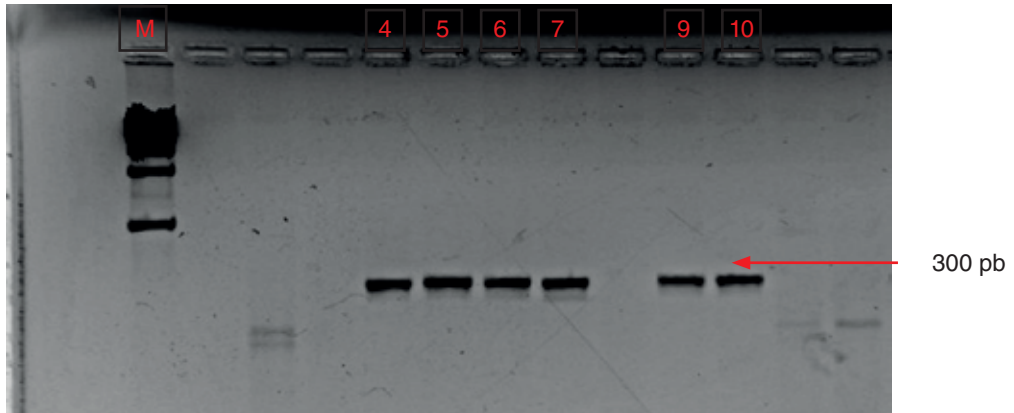


FIGURA 2. ELECTROFORESIS DEL PCR DE LAS 12 MUESTRAS CLÍNICAS PARA EL GEN CONSERVADO ENV PROVIRAL DE LA ENVOLTURA DEL VIH, CON UN AMPLICÓN ESPERADO DE 330 PARES DE BASES. M: MARCADOR MOLECULAR. NÚMEROS 4, 5, 6, 7, 9 Y 10: AMPLICONES.



FIGURA 3. AMPLIFICACIÓN DE LA BETA GLOBINA DE LAS 13 MUESTRAS CLÍNICAS. M: MARCADOR. N: NEGATIVO. P: CONTROL POSITIVO. NÚMEROS DEL 1 AL 12: AMPLICONES.

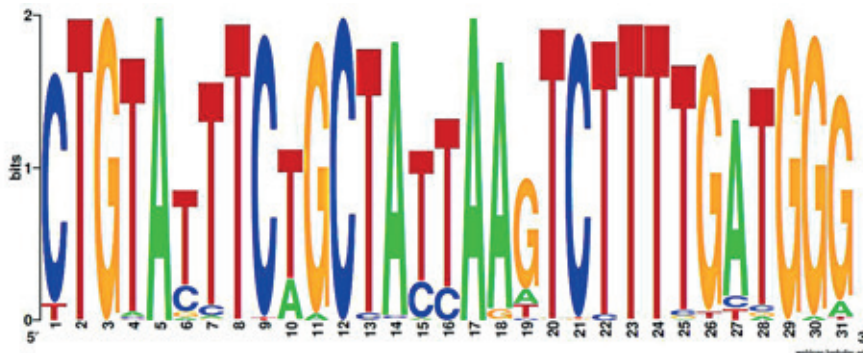


FIGURA 4. MUTACIONES IDENTIFICADAS EN LAS QUE SE MUESTRA MÁS DE UNA LETRA EN LAS SECUENCIAS GENÓMICAS, DONDE SE PEGA EL CEBADOR 2 UTILIZADO EN LA PRIMERA RONDA DE AMPLIFICACIÓN. SE UTILIZÓ EL PROGRAMA WEBLOGO. FUENTE: WEBLOGO.BERKELEY.EDU

DISCUSIÓN

Se observó en el análisis de los cebadores de la primera ronda utilizados en la amplificación del genoma proviral, mediante el uso del programa WebLogo, que el cebador 1 presentó problemas de apareamiento en la sección gag, por algunas mutaciones en las secciones blanco, donde se une el cebador; sin embargo, el que presentó mayores problemas de este tipo con la sección complementaria en el genoma proviral fue el cebador número 2 reverso, debido a que se identificó una mayor cantidad de mutaciones en secciones cruciales de apareamiento. Los problemas de complementariedad se deben a que los cebadores que se han diseñado para secciones donde existe variación en el genoma han generado una deficiencia en la complementariedad, y esto ya fue reportado en el caso de la región gag-pol del VIH subtipo B, que es el predominante en Sudamérica, aunque para nuestro país no se ha validado tal afirmación (5, 6).

La ubicación específica de los cebadores se puede observar como un directo y dos reversos, usando información de HIV Databases. Aparte de la mutación en la zona complementaria de los cebadores, es importante remarcar la estructura terciaria del ARN del VIH, que es de difícil acceso y está relacionada con el genoma proviral.

La topología del ácido nucleico viral genera una estructura terciaria difícil para el acceso de cebadores en el momento de la amplificación (7); por tanto, todos estos determinantes provocan una deficiente amplificación del genoma viral.

Respecto a la amplificación del genoma de la sección env, que pertenece a la sección que transcribe la envoltura del virus del VIH, se observó una amplificación en la

mayoría de las muestras y se presume que este resultado se debe a que esta región viral está altamente conservada.

Asimismo, todas las muestras amplificaron para la sección conservada beta globina humana, que evalúa la integridad del ADN. En consecuencia, se infiere que no existieron dificultades para amplificar regiones conservadas del VIH y que el genoma extraído era de buena calidad, por lo que la dificultad para la amplificación proviral del VIH se debería a la hipermutación de la sección gag-pol.

Se concluye que es necesario cambiar a cebadores nuevos, que puedan ser complementarios a lugares más conservados del VIH en el proceso de la genotipificación, apoyándose por la bioinformática, que es una herramienta útil para observar la complementariedad de los cebadores a usar y para la inducción de mutaciones en el futuro respecto a las secuencias blanco.

AGRADECIMIENTOS

A los biólogos del Instituto Nacional de Salud, Mg. Carlos Yábar Vara, Dr. Rony Gavilán y Biól. Omar Cáceres.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ananworanich J, Mellors JW. A cure for HIV : what will it take? *Curr Opin HIV AIDS* 2015; 10(1): 1-3.
2. Sabin C, Lundgren JD. The natural history of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 2013; 8(4): 311-7.
3. Telenti A. Genomics of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 2015; 10(2): 77-8.
4. Montes B, Vergne L, Peeters M et al. Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004; 35(4): 329-36.
5. Yabar CA, Acuña M, Gazzo C, et al. New subtypes and genetic recombination in HIV type 1-infecting patients with highly active antiretroviral therapy in Peru (2008-2010). *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012; 28(12): 1712-22.
6. Yabar CA, Salvatierra J, Quijano E. Polymorphism, recombination, and mutations in HIV type 1 gag-infecting Peruvian male sex workers. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; 24(11): 1405-13.
7. Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 2009; 460(7256): 711-6.

RECIBIDO: 31/03/2016

ACEPTADO: 20/04/2016

AUTOR: JESÚS ROJAS-JAIMES

CORRESPONDENCIA: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX