

Original

Resistencias del VIH-1 a los antirretrovirales en la Comunidad Valenciana: mutaciones y sensibilidades

J.M. Molina, J. Córdoba y M. Gobernado

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia

RESUMEN

Se estudió la resistencia a los antirretrovirales del VIH procedente de 210 muestras de enfermos remitidas a la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Microbiología del Hospital La Fe, de Valencia (España), durante los dos últimos años. Previa determinación de la carga viral en plasma, las resistencias se detectaron mediante secuenciación del gen completo de la proteasa hasta la posición 3464 del gen de la transcriptasa inversa del VIH-1. El resultado se analizó en los programas Omega 1.2 (Oxford Molecular Group) y HR-ASAP 1.0 (Stanford University). Los inhibidores de la proteasa menos afectados por la presencia de mutaciones que confieren resistencia fueron el amprenavir (actividad 68,96%) y el lopinavir (actividad 70,69%), y entre los inhibidores de la transcriptasa inversa el tenofovir (actividad 94,02%), D4T (actividad 74,62%) y 3TC (actividad 76,12%). La combinación terapéutica con mejor actividad, basándose en las distintas mutaciones, fue la compuesta por D4T + 3TC + NNRTI. Para justificar la persistencia de viremia con resistencia genotípica relativamente baja a los antirretrovirales hay que pensar en otras variables, como el cumplimiento del tratamiento y la farmacocinética de los fármacos.

Palabras clave: VIH - Antirretrovirales - Resistencia - Mutaciones - Secuenciación - Inhibidores proteasa - Inhibidores transcriptasa inversa

Resistance of HIV-1 to antiretroviral drugs in Valencia (Spain): Mutations and susceptibility

SUMMARY

Resistance of HIV to antiretroviral drugs was studied in 210 samples taken in the last two years from patients at the Molecular Biology Unit of the Microbiology Department of the Hospital La Fe in Valencia, Spain. Once the viral load in plasma was determined, resistance was detected using complete gene sequencing for protease until position 3464 of the HIV-1 inverse transcriptase gene. The results were analyzed using the programs Omega 1.2 (Oxford Molecular Group) and HR-ASAP 1.0 (Stanford University). The protease inhibitors the least affected by the presence of mutations leading to resistance were amprenavir (68.96% activity), and lipinavir (70.69% activity), and of the inverse transcriptase inhibitors, tenofovir (94.02% activity), D4T (74.62% activity) and 3TC (76.12% activity). The treatment combination with the greatest activity, based on the different mutations, was D4T + 3TC + NNRTI. To justify the persistence of viremia with relatively low genotypic resistance to antiretroviral drugs other variables must be considered, such as treatment compliance and the pharmacokinetics of the drugs.

Key words: HIV - Antiretrovirals - Resistance - Mutations - Sequencing - Protease inhibitors - Inverse transcriptase inhibitors

INTRODUCCIÓN

Para controlar la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) contamos actualmente con distintos inhibidores de la transcriptasa inversa del virus: zidovudina (AZT), didanosina (ddI), zalcitavina (ddC), estavudina (d4T), abacavir (ABC), lamivudina (3TC), tenofovir (TDF), efavirenz (EFV), delavirdina (DLV) y nevirapina (NVP); y otros inhibidores de la proteasa: amprenavir (APV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV) y lopinavir (LPV). Estos fármacos, tanto en monoterapia como en asociación, suelen producir en los enfermos un descenso de la cantidad de virus en plasma, pero la eficacia de la mayoría de los regímenes terapéuticos sólo es parcial. El descenso del número de células infectadas y de cantidad de virus suele ir acompañado de un aumento en el número de linfocitos CD4+ y de células vírgenes, y de un aumento transitorio, poco importante, de células T de memoria (1, 2). Tras varios meses de tratamiento antirretroviral combinado de gran actividad (TARGA), la cantidad de células funcionales del sistema inmunitario dista mucho de alcanzar valores normales. Se ha comprobado que a las pocas semanas de la instauración de terapias agresivas se entelece el descenso de la cantidad de virus, lo que sugiere que existen reservorios estables de células infectadas. Estos reservorios, poco accesibles para los fármacos, incluso con la terapia agresiva, constituyen la principal dificultad para erradicar el virus (3). De este modo, la incompleta supresión de la replicación viral genera la aparición de cepas de virus con mutaciones que confieren resistencia a uno o más fármacos, siendo ésta una de las principales causas del fracaso terapéutico.

La aparición de cepas mutantes resistentes al tratamiento es un proceso dinámico, con diversas variantes que coexisten en un mismo individuo. Se han detectado mutaciones que confieren resistencia a varios inhibidores de la transcriptasa inversa y de la proteasa; no obstante, se admite que la baja o moderada prevalencia de las cuasiespecies mutantes, en la fase previa al tratamiento antiviral, responde a su menor capacidad replicativa respecto a las variantes silvestres.

En el seguimiento clínico de los enfermos, determinar la cantidad de virus en plasma permite constatar el inicio de un fracaso terapéutico. La detección de variantes resistentes nos puede permitir correlacionar dicho fracaso con los distintos fármacos administrados y tratar de optimizar la terapia.

Diversos autores han encontrado una elevada prevalencia de resistencia a los fármacos antirretrovirales entre los enfermos con infección por el VIH en situación de fracaso terapéutico, aun habiendo recibido tratamiento antirretroviral de gran actividad (4-7). Se ha demostrado que existe

una estrecha relación entre la presencia de resistencia y el desarrollo de fracaso terapéutico (8-10). Aunque la actitud generalmente recomendada ante un paciente con fracaso del TARGA consiste en cambiar todos los antirretrovirales incluidos en la pauta terapéutica, no todos los enfermos con fracaso presentan resistencias a todos los fármacos incluidos en su esquema de tratamiento. En el caso particular de las pautas TARGA con inhibidores de la proteasa, diversos ensayos clínicos han puesto de manifiesto que existen muchos enfermos en que el fracaso del tratamiento no se acompaña de resistencia a estos fármacos.

El conocimiento de los factores que determinan el desarrollo de resistencia a los distintos fármacos antirretrovirales podría ser de gran utilidad para comprender los fracasos terapéuticos del TARGA, y podría ayudar en la planificación de las pautas terapéuticas, apoyándose, a ser posible, en resultados de cada situación local (11).

El presente estudio es un trabajo descriptivo con el cual sólo se pretende informar de la tasa de mutaciones conferidoras de resistencia en los genes de la proteasa y la transcriptasa inversa del VIH-1 encontrados en muestras de enfermos de nuestro medio, sin entrar en otras consideraciones o detalles concretos como la fuente de infección, los datos demográficos, la evolución de los enfermos y otros, salvo alguna referencia a tratamientos previos.

ENFERMOS Y MÉTODOS

Se estudiaron muestras procedentes de 210 enfermos remitidas a la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Microbiología del Hospital La Fe (Valencia, España) durante los dos últimos años. Las muestras de plasma fueron separadas en un plazo inferior a tres horas desde su extracción y conservadas en alícuotas a -85°C . Para confirmar la existencia y cantidad suficiente de virus, en todas las muestras se determinó la carga viral mediante el sistema *Amplicor HIV Monitor* (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA), obteniéndose en todas ellas valores superiores a 1000 copias/ml. Para la secuenciación del genoma del VIH-1 se utilizó 1 ml de cada muestra para la extracción de RNA mediante el método *Nuclisens* (Organon-Teknica Ltd., Cambridge, UK). Posteriormente se sometieron a RT-PCR 10 μl del RNA extraído, amplificando el gen completo de la proteasa hasta la posición 3464 del gen de la transcriptasa inversa del VIH-1. La secuenciación de los productos amplificados se realizó en un secuenciador automático *ALF Express II* (Amersham-Pharmacia), y el análisis de las secuencias generadas en los programas *Omiga 1.2* (Oxford Molecular Group) y *HR-ASAP 1.0* (Stanford University).

RESULTADOS

El análisis de las secuencias obtenidas con el programa *Omiga 1.2* (Oxford Molecular Group), contrastadas en la base de datos *HR-ASAP 1.0* (Stanford University), nos proporciona información sobre el subtipo del VIH-1, así como sobre las mutaciones existentes en la región de la proteasa y la transcriptasa inversa del virus, relacionándolas con la sensibilidad a los antirretrovirales inhibidores de la proteasa y de la transcriptasa inversa, diferenciando en este último caso entre análogos de nucleósidos (NRTI: AZT, ddI, ddC, d4T, ABC, 3TC, TDF) y no análogos de nucleósidos (NNRTI: EFV, DLV, NVP). Todas las secuencias obtenidas correspondieron al subtipo B del VIH-1.

En las Tablas 1 y 2 se recogen los resultados de la diferente frecuencia encontrada en las mutaciones primarias y secundarias de la proteasa y de la transcriptasa inversa.

La base de datos de la Universidad de Stanford nos proporciona los datos sobre la sensibilidad a los distintos antirretrovirales arriba mencionados, indicando los siguientes grados de sensibilidad: sensible, posiblemente baja resistencia, baja resistencia, resistencia intermedia y alta resistencia. Nosotros, para mayor facilidad en la interpretación de los datos, hemos agrupado estos grados siguiendo otro criterio: agrupamos los sensibles con los posiblemente de bajo grado de resistencia (sensibles), los de baja resistencia con los de resistencia intermedia (intermedio), y en un grupo distinto los de alta resistencia (resistentes) (Figs. 1, 2 y 3).

Por otro lado, se estudiaron las asociaciones de antirretrovirales utilizadas con mayor frecuencia (d4T + 3TC + NNRTI, d4T + ddI + IP/NNRTI y AZT + 3TC + IP), con la finalidad de ver las sensibilidades y resistencias que presentaban en conjunto. Todas las asociaciones tenían dos fármacos comunes en todas las muestras, presentando alguna de ellas un tercer fármaco no común en todas las demás, por lo que hemos puesto el grupo al que pertenecía el fármaco va-

riable en la combinación. Además se calculó la carga viral media presente para cada tratamiento y el porcentaje de muestras sensibles y resistentes (resistencia alta y resistencia intermedia) (Tabla 3).

Tabla 1. Mutaciones primarias y secundarias detectadas en la región de la proteasa.

Mutaciones en la proteasa			
Primarias	%	Secundarias	%
M46I/L	8,6	L10I	15,7
D30N	7,4	M36I/L/V	8,2
G48V	6,2	I54V	11,9
V82A/I/S	19,8	L63P	26,1
L90M	4,9	A71V	9,7
		I93L	5,2
		I15V	8,2
		N37S/D	14,9

Tabla 2. Mutaciones primarias y secundarias detectadas en la región de la transcriptasa inversa.

Mutaciones en la transcriptasa inversa			
Primarias	%	Secundarias	%
K70R	8,6	M41L	9,0
L74V/I	7,4	D67N	16,8
V75A/M/T	6,2	T69D	2,6
K103N	19,8	L74V	3,9
V106I	4,9	L100I	1,9
V108I	3,7	I115S	1,3
Q151M	2,5	R83K	6,5
Y181C	8,6	K122E	20,6
M184V	19,8	T200A	8,4
G190A	2,5	Q207E	8,4
T215Y	16,0	R211K	11,0
		F214L	9,7

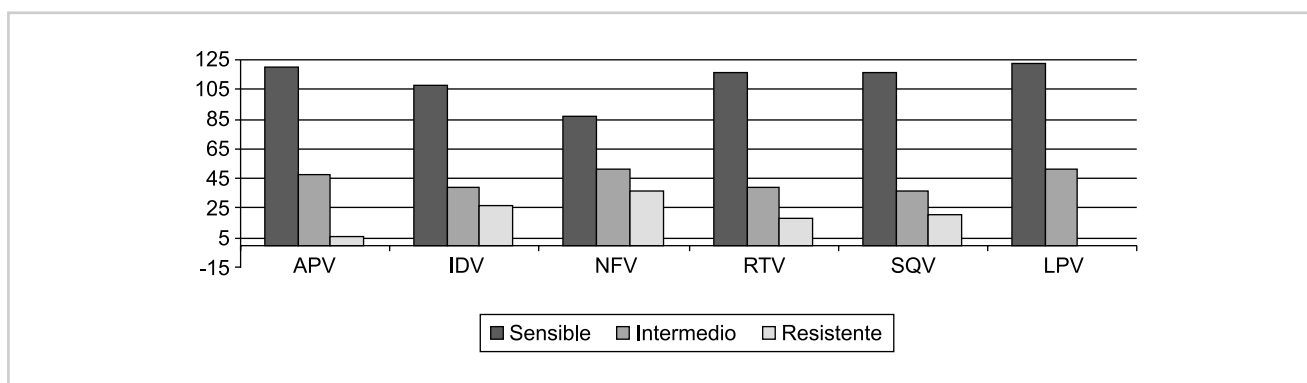


Figura 1. Sensibilidad del VIH-1 a los fármacos inhibidores de la proteasa.

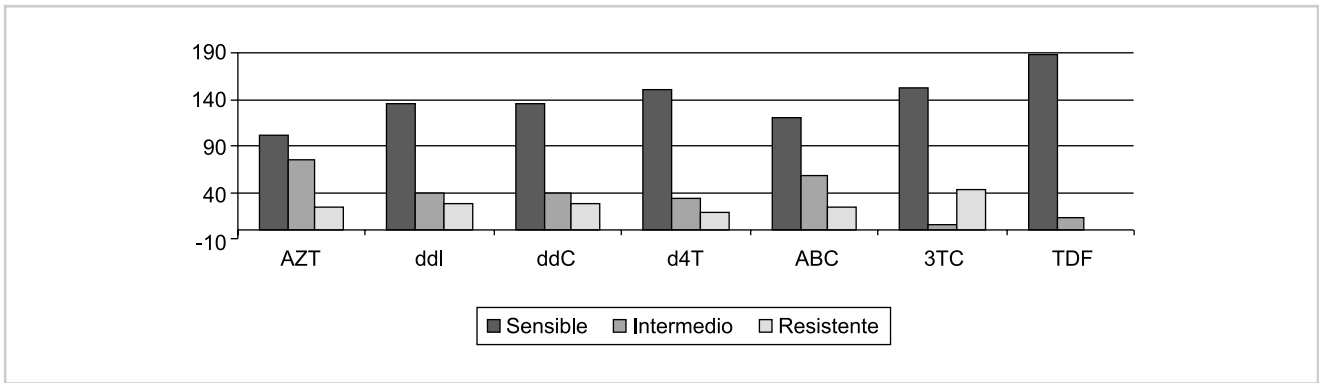


Figura 2. Sensibilidad del VIH-1 a los fármacos NRTI.

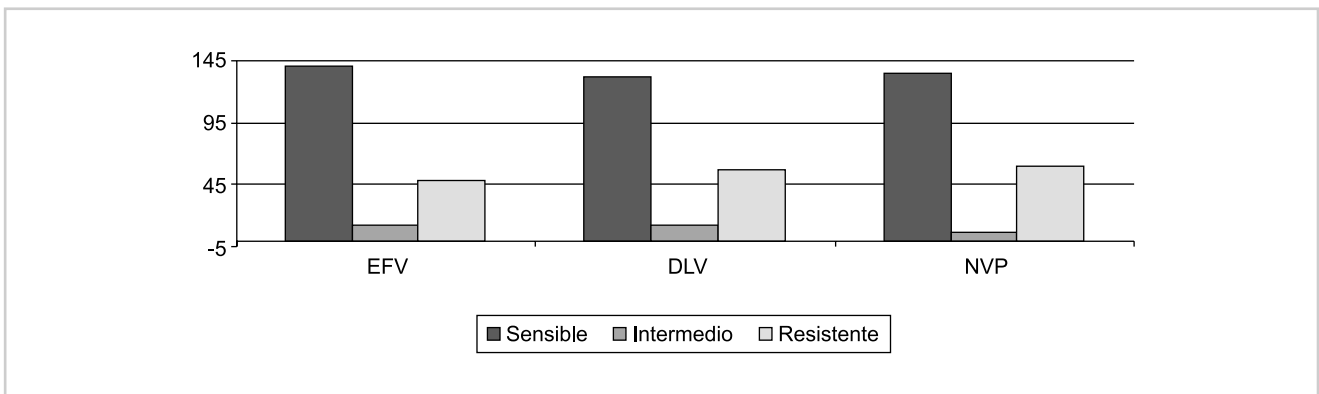


Figura 3. Sensibilidad del VIH-1 a los fármacos NNRTI.

Tabla 3. Carga viral media y sensibilidad/resistencia de las diferentes combinaciones terapéuticas.

	Carga viral media (copias/ml)	Sensibles (%)	Intermedias + resistentes (%)
d4T + 3TC + NNRTI	34.800	80,95	19,05
d4T + ddl + (IP/NNRTI)	46.064	69,23	30,77
AZT + 3TC + (IP)	48.860	67,85	32,15

DISCUSIÓN

En la región de la proteasa, la mutación primaria que aparece con más frecuencia es con diferencia la V82A/I/S (19,8%). La mutación V82A/T/F/S aparece predominantemente en aislamientos de VIH-1 de enfermos que han recibido tratamiento con indinavir y ritonavir (12, 13). V82A también aparece en enfermos que han recibido un tratamiento prolongado con saquinavir, siguiendo la aparición de la mutación G48V (14), presente en nuestro estudio en un 6,2%. A continuación y con una proporción muy similar aparecen las mutaciones M46I/L y D30N. Las mutaciones en el codón 46 contribuyen en la resistencia a todos los

inhibidores de la proteasa excepto al saquinavir, y se han encontrado habitualmente durante la terapia con indinavir, ritonavir, amprenavir y nelfinavir (13). La mutación D30N aparece solamente en enfermos tratados con nelfinavir y confiere resistencia cruzada con otros inhibidores de la proteasa (15).

Entre las mutaciones secundarias destaca la frecuencia de L63P, L10I, N37S/D y I54V.

En cuanto a las mutaciones primarias en la transcriptasa inversa, encontramos que las más frecuentes son K103N, M184V y T215Y. La mutación K103R es la que aparece con más frecuencia en los enfermos tratados con NNRTI, produciendo una resistencia entre 20 y 50 veces a todos los NNRTI disponibles (16). La mutación M184V produce un alto grado de resistencia a la lamivudina, apareciendo rápidamente en enfermos que la reciben en monoterapia (17). La mutación T215Y/F se produce por un cambio de dos pares de bases y causa resistencia intermedia a la zidovudina; aparece en enfermos con doble terapia con NRTI o en los que recibieron zidovudina como monoterapia (18).

Las resistencias secundarias más frecuentes en la transcriptasa inversa fueron D67N, K122E y R211K.

En cuanto a los inhibidores de la proteasa, teniendo en cuenta los resultados de sensibilidad genotípica obtenidos en el algoritmo de Standford (Fig. 1), se observa que los más eficaces son el amprenavir y el lopinavir, con una elevada proporción de muestras sensibles y una muy baja tasa de resistencia. En el polo opuesto se encuentran el nelfinavir y el indinavir, con menor proporción de muestras sensibles y más alta de resistencia. Los grados intermedios de resistencia son muy similares para todos los fármacos.

Por lo que respecta a los NRTI, el más eficaz parece ser el tenofovir seguido por la estavudina y, en último lugar, la lamivudina. El resto presenta una actividad muy similar.

Por último, en el grupo de los NNRTI la sensibilidad es muy similar para los tres, siendo ligeramente superior para el efavirenz.

Como hemos indicado, en este breve trabajo descriptivo sólo hemos pretendido informar de la tasa de mutaciones de resistencia en los genes de la proteasa y la transcriptasa inversa del VIH-1 encontrados en muestras de enfermos de nuestro medio, en donde la información a este respecto no es muy abundante, dejando para próximos trabajos otras consideraciones como tratamientos previos, evolución de los enfermos y otros datos, de manera semejante a estudios previos (18).

Por lo que respecta a las diferentes terapias administradas con mayor frecuencia, podemos decir que los datos de carga viral media obtenidos con las diferentes asociaciones son muy parecidos (Tabla 3), si bien d4T + 3TC + NNRTI presenta un valor algo inferior. En cuanto a sensibilidades y resistencia se refiere, d4T + 3TC + NNRTI parece ser la asociación que presenta mejores porcentajes (sensibilidad del 89,95% y resistencia del 19,05%). Las asociaciones d4T + ddI + (IP/NNRTI) y AZT + 3TC + (IP) presentan unos resultados muy parecidos, tanto en la cantidad media de virus como en el grado de sensibilidad y resistencia, peores que los encontrados con d4T + 3TC + NNRTI en ambos casos, siendo un poco mejores los datos con d4T + ddI + (IP/NNRTI) que con AZT + 3TC + (IP). Estos hallazgos coinciden con los datos individuales de resistencia indicados arriba, según los cuales los NNRTI (estavudina y lamivudina) eran los fármacos con mejor sensibilidad, junto con el tenofovir, siendo este último variable y poco frecuente en las asociaciones utilizadas. Vistos los resultados obtenidos, no parece que la persistencia de virus detectables se deba sólo a la aparición de resistencia a los fármacos, ya que el grado de resistencia genotípica no parece ser excesivamente alto, y por ello se debe pensar en otros factores, como el cumplimiento del tratamiento prescrito y quizás la farmacocinética, en los que habría que incidir para obtener la desaparición de los virus del plasma de los pacientes tratados, con lo cual también disminuiría la aparición de resistencias genotípicas a los fármacos utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Autran, B., Carcelain, G., Li, T.S. y cols. *Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease*. Science 1997; 277: 112-116.
2. Zhang, Z.Q., Notermans, D.W., Sedgewick, G. y cols. *Kinetics of CD4+T cell population of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection*. Proc Acad Sci 1998; 95: 1154-1159.
3. Ho, D.D. *Toward HIV eradication or remission: The task ahead*. Science 1998; 280: 1866-1867.
4. Young, B., Johnson, S., Bahktiari, M. y cols. *Resistance mutations in protease and reverse transcriptase genes of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients with combination antiretroviral therapy failure*. J Infect Dis 1998; 178: 1497-1501.
5. Puig, T., Pérez-Olmeda, M., Rubio, A. y cols. *Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues and protease inhibitors in Spain*. AIDS 2000; 14: 727-732.
6. Gutiérrez, F., Moltó, J., Escolano, C. y cols. *Genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients with therapeutic failure to highly active antiretroviral therapy*. Med Clin 2000; 115: 401-404.
7. Cozzi Lepri A., Sabin, C.A., Staszewski, S. y cols. *Resistance profiles in patients with viral rebound on potent antiretroviral therapy*. J Infect Dis 2000; 181: 1143-1147.
8. De Grotola, V., Dix, L., D'Aquila, R. y cols. *The relation between antiretroviral therapy: Re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan*. Antivir Ther 2000; 5: 41-48.
9. Lorenzi, P., Milos, O., Hirschel, B. y cols. *Impact of drug resistance on virologic response to salvage therapy*. AIDS 1999; 13: 17-21.
10. Harrigan, P.R., Hertogs, K., Verbiest, W. y cols. *Baseline HIV drug resistance profile predicts response to ritonavir-saquinavir protease inhibitor therapy in a community setting*. AIDS 1999; 13: 1863-1871.
11. Córdoba, J., Otero, M.C., Laínez B. y cols. *Virus de inmunodeficiencia humana y resistencias*. Rev Esp Quimioterap 1998; 11: 152-156.
12. Condra, J.H., Holder, D.J., Schleif, W.A. y cols. *Genetics correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor*. J Virol 1996; 70: 8270-8276.
13. Molla, A., Korneyeva, M., Gao, Q. y cols. *Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir*. Nat Med 1996; 2: 760-766.
14. Winters, M.A., Schapiro, J.M., Lawrence, J., Merigan, T.C. *Human immunodeficiency virus type 1 protease genotypes and in vitro protease inhibitor susceptibilities of isolates from individuals who were switched to other protease inhibitors after long-term saquinavir treatment*. J Virol 1998; 72: 5303-5306.
15. Patick, A.K., Mo, H., Markowitz, M. y cols. *Antiviral and resistance studies of AG1343, an orally biovariable inhibitor of human immunodeficiency virus protease*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 292-297.
16. Young, S.D., Britcher, S.F., Tran, L.O. y cols. *L-743, 726 (DMP-266): A novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2602-2605.
17. Boucher, C.A., Cammack, N., Schipper, P. y cols. *High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 2231-2234.
18. Kuritzkes, D.R., Quinn, J.B., Benoit, S.L. y cols. *Drug resistance and virologic response in NUCA 3001, a randomized trial of lamivudine (3TC) versus zidovudine (ZDV) versus ZDV plus 3TC in previously untreated patients*. AIDS 1996; 10: 975-981.