

Original

Epidemiología de las resistencias genotípicas del VIH-1 en Valencia. Estudio de cuatro años

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

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

RESUMEN

Se estudió la resistencia a los antirretrovirales del VIH-1 en 348 muestras de enfermos remitidas a la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Microbiología del Hospital La Fe, desde enero de 2003 hasta julio de 2007. 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 HIV db program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm Version 4.3.0 (Stanford University). Los inhibidores de la proteasa menos afectados por la presencia de mutaciones que les confieren resistencia fueron el darunavir, el tripanavir y el lopinavir (sensibilidad >80%), y entre los inhibidores de la transcriptasa inversa destacan el tenofovir y la lamivudina dentro de los análogos de nucleósidos (sensibilidad >90%), y el TMC125 entre los no análogos de nucleósidos (sensibilidad >80%).

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

Epidemiology of genotypic resistance of HIV-1 in Valencia. A 4-year study

SUMMARY

HIV resistance to antiretroviral drugs was studied in 348 samples taken from patients at the Molecular Biology Unit of the Microbiology Department of the Hospital La Fe, from January 2003 to July 2007. Once the viral load in plasma was determined, resistance was detected using complete gene sequencing for protease up to position 3464 of the HIV-1 reverse transcriptase gene. The results were analyzed using the Omega 1.2 (Oxford Molecular Group) and HIV db Genotypic Resistance Interpretation Algorithm Version 4.3.0 (Stanford University) programs. The drugs least affected by the presence of mutations leading to resistance were the protease inhibitors darunavir, tripanavir and lopinavir (sensitivity >80%), the nucleoside reverse transcriptase inhibitors tenofovir and lamivudine (sensitivity >90%) and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor TMC125 (sensitivity >80%).

Key words: HIV - Antiretroviral - Resistance - Mutations - Protease inhibitors - Reverse transcriptase inhibitors

INTRODUCCIÓN

La aparición de cepas mutantes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) resistentes al tratamiento antirretroviral es un proceso dinámico en el cual las distintas variantes coexisten en un mismo individuo. Se han detectado mutaciones que confieren resistencia a diversos 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 a la terapia antiviral responde a su menor capacidad replicativa respecto a las variantes silvestres (*wild type*).

En el seguimiento clínico de los enfermos, la carga viral plasmática 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 el tratamiento.

Varios autores han encontrado una elevada prevalencia de resistencia a los fármacos antirretrovirales entre los enfermos con infección por el VIH en situación de fracaso virológico, aun habiendo recibido tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) (1-4). Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la presencia de resistencia y el fracaso terapéutico (5-7). Aunque la actitud generalmente recomendada ante un paciente con fracaso del TARGA consiste en cambiar todos los antirretrovirales incluidos en la pauta, no todos los enfermos en que fracasa presentan resistencia a todos los fármacos incluidos en el esquema de tratamiento. En el caso particular de las pautas de TARGA con inhibidores de la proteasa, diversos ensayos clínicos han puesto de manifiesto que existen muchos enfermos en los cuales 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, a ser posible apoyado en resultados de cada situación local (8).

En los últimos años se han incorporado nuevos antirretrovirales al tratamiento de la infección por el VIH. Entre ellos se encuentran nuevos inhibidores de la proteasa (atazanavir [ATV], darunavir [DRV], fosamprenavir [FPV], tripanavir [TRV]), análogos de nucleósidos (emtricitavina [FTC], tenofovir [TDF]) y no análogos de nucleósidos (etravirina [TMC125]), al mismo tiempo que han dejado de administrarse inhibidores de la proteasa como el amprenavir (APV) y el ritonavir (RTV), y el análogo de nucleósido zalcitavina (ddC).

Simultáneamente, en los estudios de resistencias genotípicas del VIH-1 también se han ido incorporando las mu-

taciones en el genoma del virus relacionadas con estos fármacos (por ejemplo el *HIV db program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm Version 4.3.0 Stanford University*).

En publicaciones anteriores (9) describimos nuestra experiencia en estudios de resistencias genotípicas del VIH durante varios años con una finalidad epidemiológica. En el presente trabajo realizamos un nuevo estudio epidemiológico con los datos obtenidos desde el año 2003, estudiando la evolución de las mutaciones y sus implicaciones en la respuesta a los tratamientos durante este periodo. Es un trabajo descriptivo que sólo pretende 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 los cuatro últimos años, sin entrar en otras consideraciones ni detalles concretos como la fuente de la infección, los datos demográficos, la evolución de los enfermos y otros aspectos.

ENFERMOS Y MÉTODOS

Se estudiaron 348 muestras de 254 enfermos remitidas a la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Microbiología del Hospital La Fe, de Valencia, obtenidas desde enero de 2003 hasta julio de 2007. Las muestras de sangre, para obtener el 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, se determinó en todas las muestras la carga viral mediante el sistema *COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HIV-1 Test* (Roche Molecular System, Inc., Branchburg, NJ, USA), necesitándose de todas ellas, al menos, 1000 copias/ml de RNA del VIH-1 para realizar la prueba de resistencias. Para la secuenciación del genoma viral, de 0,5 ml de plasma se extrajeron ácidos nucleicos con el método *Nuclisens[®] NASBA Diagnostic* (BioMérieux, Netherlands), y 25 μl de RNA extraído se utilizaron en una RT-PCR que amplifica 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 utilizando el *Thermosequenase Cy5 Dye Terminador Cycle Sequencing Kit* (Amersham Bioscience, England), realizando la electroforesis de secuenciación en el secuenciador automático *ALF Express II* (Amersham Bioscience, England) y el análisis de las secuencias con los programas *Omega 1.2* (Oxford Molecular Group) y *HIV db program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm Version 4.3.0* (Stanford University).

El algoritmo de Stanford utilizado nos proporciona diferentes grados de resistencia a los antirretrovirales: sensible, posiblemente baja resistencia, baja resistencia, resis-

tencia intermedia y alta resistencia. Al igual que en nuestras publicaciones anteriores (9), agrupamos las secuencias catalogadas como sensibles con aquéllas de posiblemente baja resistencia, las de baja resistencia con las de resistencia intermedia (intermedio), y en el grupo restante las de alta resistencia (resistentes). El algoritmo también nos proporciona información sobre el subtipo del VIH-1, y relaciona las mutaciones de la proteasa y la transcriptasa inversa viral con la resistencia a los antirretrovirales utilizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las secuencias correspondieron al subtipo B del VIH-1, excepto una cuyo subtipo fue CRF02AG, perteneciente a una enferma de Guinea Ecuatorial.

En las Tablas 1 y 2 se recogen los resultados de las frecuencias encontradas para las distintas mutaciones de las regiones codificantes de la proteasa y la transcriptasa inversa del genoma viral en los años estudiados, así como la media aritmética de los porcentajes de cada periodo.

En las Figs. 1 a 3 pueden verse los distintos porcentajes de resistencia distribuidos por tiempo y categoría de fármacos específicos.

En la región de la proteasa viral, la mutación primaria más frecuente es la I54L/V (20,3%). La mutación I54V contribuye a la resistencia frente a cada uno de los inhibidores de la proteasa cuando se presenta con otras mutaciones. La mutación I54M/L aparece predominantemente en aislamientos de VIH-1 de enfermos que han recibido tratamiento con APV y DRV (11). A continuación, y con una proporción muy similar, aparecen las mutaciones M46I/L (15%), V82A/F/S/T (16,5%) y L90M (16,9%). Las mutaciones en el codón 46 contribuyen a la resistencia a todos los inhibidores de la proteasa excepto al saquinavir, y se han informado habitualmente durante la terapia con indinavir, ritonavir, amprenavir y nelfinavir (11). La mutación V82A/F/S/T reduce la sensibilidad al indinavir, al ritonavir y al lopinavir; en presencia de otras mutaciones también reduce la sensibilidad al amprenavir, al nelfinavir, al saquinavir, al atazanavir y al tripanavir. El efecto sobre el darunavir no se conoce con certeza. La mutación V82L emerge durante el tratamiento con tripanavir, reduciendo la sensibilidad a éste. La mutación L90M produce resistencia al saquinavir y al nelfinavir; y en presencia de otras mutaciones también afecta a la sensibilidad al indinavir, al ritonavir, al amprenavir, al lopinavir, al atazanavir y al tripanavir; se desconoce el efecto sobre el darunavir.

Entre las mutaciones secundarias encontradas en la región de la proteasa destacan la L101/F/N/V (41,4%) y la A71I/T/V (27,2%). La mutación L101/F/R/V se asocia con

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

Primarias	2003	2004	2005	2006	2007	Media	Secundarias	2003	2004	2005	2006	2007	Media
L24F/I	3,1	4,7	6,8	2	0	3,3	L101/F/N/V	37,8	38,7	39,1	36,4	55,2	41,4
D30N/S	1	3,1	5	4,2	18,2	6,3	K20I/M/R/T/V	19,4	17,7	19,5	10,9	0	13,5
V32I/L	3	3,1	0	2	0	1,6	L23I	0	0	0	1,8	0	0,4
M46I/L	15,3	12,5	23,8	14,3	9,1	15,0	L33I/S	0	3,2	0	1,8	0	1,0
I47A/V	2	3	1,7	8,2	0	3,0	M36L/V	1,3	3,2	2,2	5,4	0	2,4
G48A/V/X	2	1,6	5	2	0	2,1	K43T	0	0	0	1,8	0	0,4
I50M/V	3	0	0	0	0	0,6	F53L	1,3	0	4,4	5,6	11,3	4,5
I54L/V	17,4	20,4	15,3	12,2	36,3	20,3	L63A/C/H/Q/S	7,3	12,9	13,1	10,8	0	8,8
A71S	1	0	0	0	0	0,2	A71I/T/V	32,9	24,3	21,7	23,7	33,5	27,2
G73S/T	6,2	3,2	1,7	6,2	0	3,5	L89V	0	0	0	1,8	0	0,4
V82A/F/S/T	18,3	18,8	22	14,2	9,1	16,5							
I84V	6,2	1,6	5,1	8,2	9,1	6,0							
N88D	3,2	3	0	6,1	9,1	4,3							
L90M	16,3	25	13,6	20,4	9,1	16,9							
I93M	2	0	0	0	0	0,4							

Tabla 2. Mutaciones (en porcentaje) detectadas en la región de la transcriptasa inversa que afectan a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos y no análogos de nucleósidos.

Análogos nucleósidos	No análogos nucleósidos										Media	
	2003	2004	2005	2006	2007	Media	2003	2004	2005	2006		2007
M41I/L/M/R/V	11,7	5,3	7,2	8,4	4,4	7,4	2,6	6,4	0	7,8	5	4,4
E44A/D/G/K	3,6	3,2	4,5	6,5	2,2	4,0	10,5	4,3	3,3	5,1	0	4,6
A62P/V	2,7	2,1	2,9	0	4	2,3	13,1	12,8	6,6	7,8	15	11,1
K65E/R/T	0	2,1	1,4	0,9	0	0,9	36,9	40,4	33,3	43,3	30	36,8
D67A/E/G/K/N/S/T/X	15,3	17,7	16,1	23,2	13,1	17,1	0	0	3,4	2,6	0	1,2
T69A/D/E/I/N/S	6,3	6,3	5,8	2,8	13	6,8	7,9	17	10	5,1	5	9,0
K70R	7,2	8,4	13	10,4	10,9	10,0	5,4	2,1	3,4	2,6	10	4,7
L74I/S/V	4,5	7,2	5,8	4,7	8,7	6,2	10,5	6,4	16,7	10,30	8,8	2,0
V75A/I/M/Q/S/T	3,6	3,2	5,8	2,7	4,4	3,9	2,6	4,2	3,3	0	0	15,6
F77G/L	0	2	0	0,9	0	0,6	7,9	6,4	13,3	15,4	35	1,9
A98S	0,9	0	0	0	0	0,2	2,6	0	6,7	0	0	
K103R	0,9	0	0	0	0	0,2						
V106I	2,5	0	0	0	0	0,5						
Y115F	0	1,1	0	0	2,2	0,7						
F116Y	0	2,1	0	0	0	0,4						
V118F/I	9,7	9,5	7,2	9,4	8,7	8,9						
Q151K/M	0	2,2	1,4	0,9	0	0,9						
V179G/I	1,8	0	0	0	0	0,4						
M184M/I	12,4	10,5	18,8	15,1	10,9	13,5						
L210F/W	7,9	6,4	2,9	5,7	2,2	5,0						
T215F/I/N/P/S/V/X/Y	5,4	5,3	5,8	5,6	6,6	5,7						
K219E/N/Q/R	2,7	3,2	1,4	3,7	8,7	3,9						
P225X	0	1,1	0	0	0	0,2						
F227L/S	0,9	1,1	0	0	0	0,4						

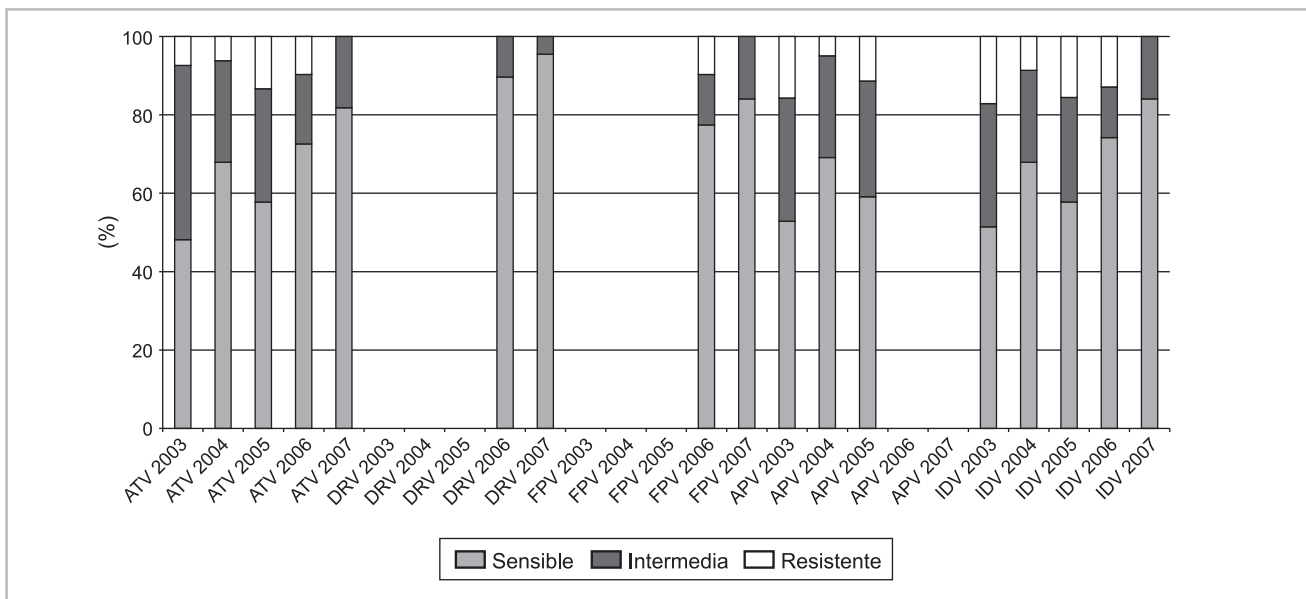


Figura 1. Sensibilidad del VIH-1 a los fármacos inhibidores de la proteasa: ATV, DRV, FPV, APV, IDV.

resistencia a cada uno de los inhibidores de la proteasa en presencia de otras mutaciones. La mutación L10F puede ser todavía más significativa porque rara vez aparece en ausencia de tratamiento con inhibidores de la proteasa. La mutación A71T/V es un polimorfismo que aparece en el 1% a 2% de los pacientes no tratados, pero que es mucho más frecuente en las personas que reciben tratamiento con inhibidores de la proteasa.

En cuanto a las mutaciones que afectan a los análogos de nucleósidos, encontramos que las más frecuentes son

D67A/E/G/K/N/S/T/X (17,1%), M184M/I (13,5%) y K70R (10%). La mutación D67N contribuye con algún grado de resistencia a todos los análogos de nucleósidos excepto a la lamivudina, y a la emtricitavina normalmente aparece con mutaciones en las posiciones 70 o 215. La mutación D67E/G aparece en pacientes muy tratados y tiene un efecto muy similar a la D67N. La mutación M184V produce un alto grado de resistencia a la lamivudina y la emtricitavina, y aparece rápidamente en los enfermos que la reciben en monoterapia (12). También causa un bajo

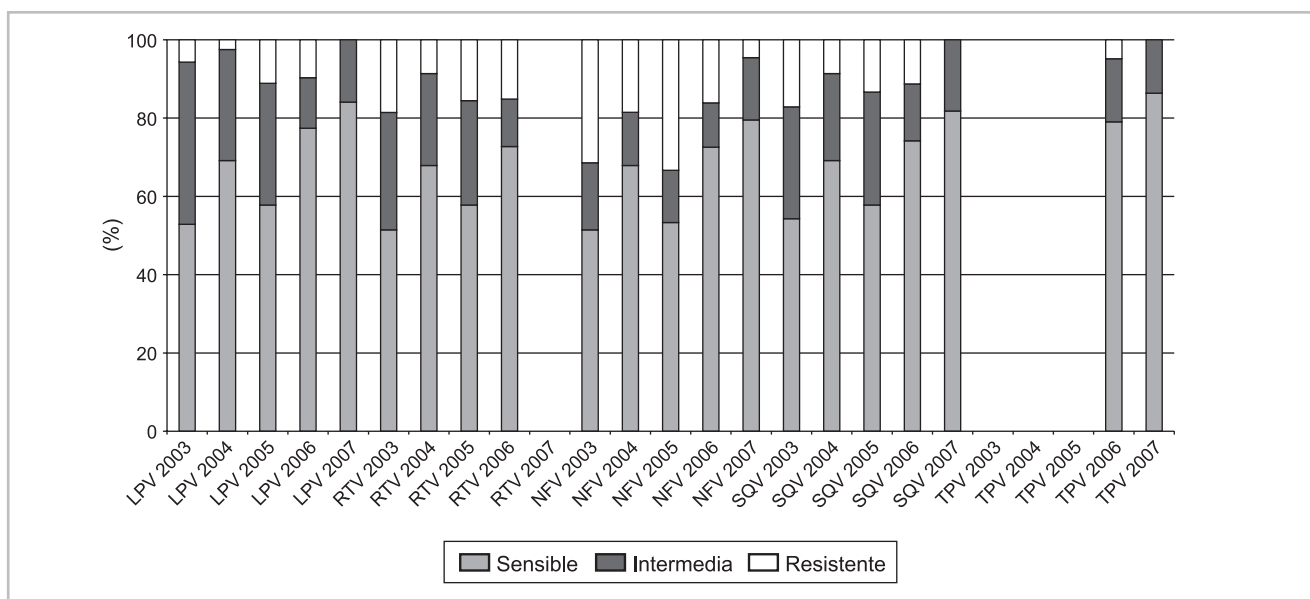


Figura 2. Sensibilidad del VIH-1 a los fármacos inhibidores de la proteasa: LPV, RTV, NFV, SQV, TPV.

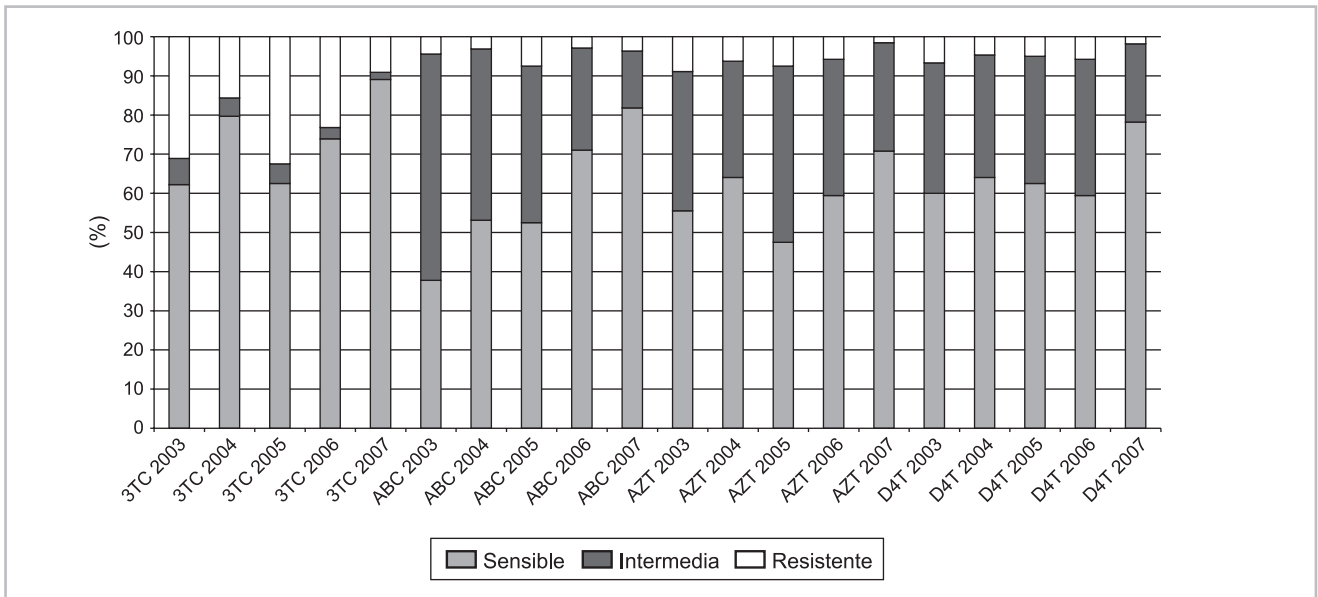


Figura 3. Sensibilidad del VIH-1 a los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos: 3TC, ABC, AZT, D4T.

grado de resistencia *in vitro* a la didanosina y al abacavir, y revierte parcialmente el efecto de la mutación T215Y, la cual produce resistencia a la zidovudina, el tenofovir y la estavudina. La mutación K70R causa bajo grado de resistencia a la zidovudina, y probable resistencia a la estavudina, con muy poco efecto sobre otros análogos.

Las mutaciones más frecuentes encontradas que afectan a los no análogos de nucleósidos son K103E/N/S (36,8%), G190A/E/R/S (15,6%) y K101E/H/P/Q (11,1%). La mutación K103R es la que aparece con más frecuencia

en los enfermos tratados con inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, produciendo una resistencia entre 20 y 50 veces a todos los disponibles (13).

Desde el año 2003, el algoritmo de Stanford ha retirado de su información fármacos como el amprenavir y el ritonavir, por lo que ya no se indican en los correspondientes diagramas de barras. A la vez, se han ido incorporando otros fármacos, expresados en su fecha de aparición (Figs. 1 a 4).

En cuanto a los inhibidores de la proteasa (Figs. 1 y 2), los fármacos que parecen más eficaces son el darunavir, el

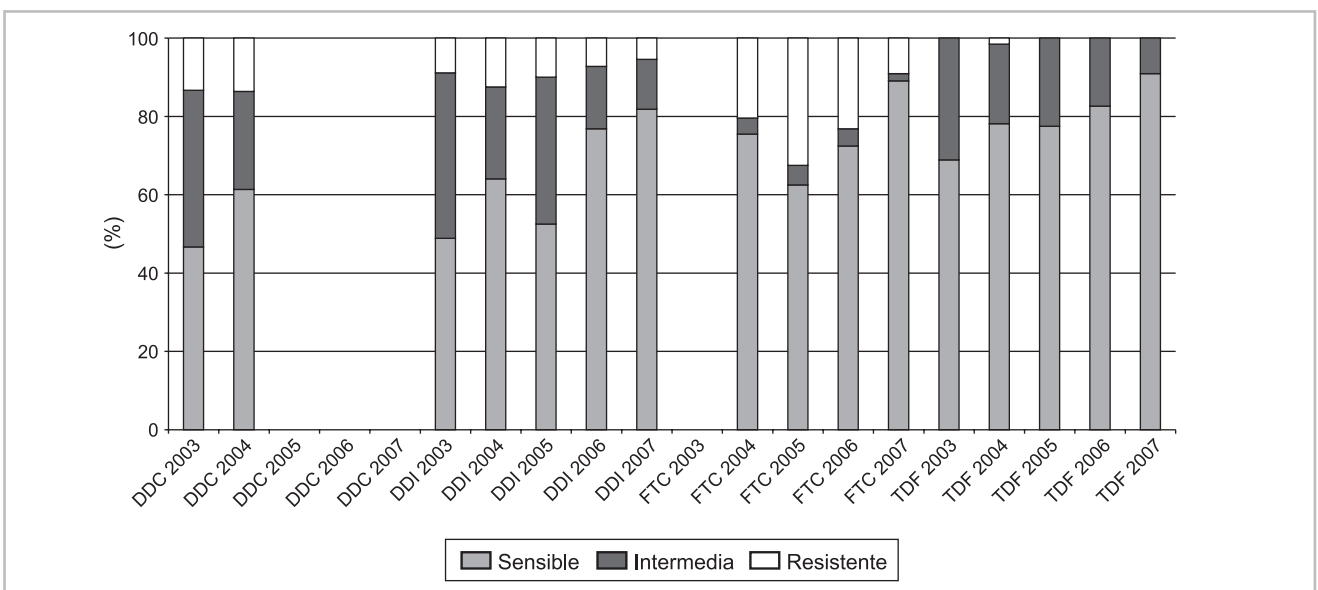


Figura 4. Sensibilidad del VIH-1 a los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos: DDC, DDI, FTC, TDF.

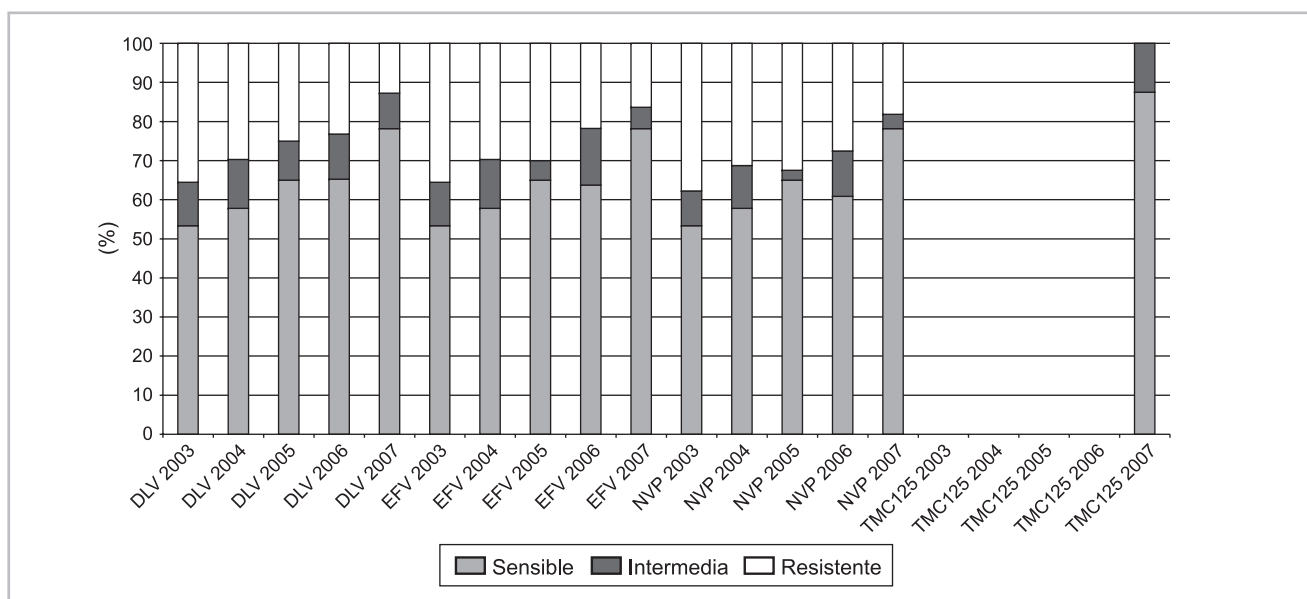


Figura 5. Sensibilidad del VIH-1 a los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos: DLV, EFV, NVP, TMC125.

triptanavir y el lopinavir, frente a los que encontramos una elevada proporción de virus sensibles (>80%), con una muy baja tasa de resistentes y en algún caso casi nula. En el polo opuesto se encuentra el nelfinavir, con la mayor proporción de virus resistentes.

En casi todos los fármacos se observa un aumento del porcentaje de virus sensibles desde 2003 hasta 2007. Es de destacar que en el año 2004 se produjo un incremento del número de muestras con virus sensibles, mayor que en 2005, aunque el porcentaje de sensibles de este último año sigue siendo mayor que en 2003. Posteriores estudios podrían determinar si durante ese año algún factor pudiera explicar estas variaciones.

Por lo que respecta a los análogos de nucleósidos, el más eficaz parece ser el tenofovir con cerca del 90% de virus sensibles en 2007, seguido por la lamivudina, aunque con más casos de alta resistencia, y terminando con la emtricitabina (Figs. 3 y 4). El resto de los fármacos presentan datos similares. También encontramos variaciones semejantes a los inhibidores de la proteasa durante el año 2004.

Por último, en el grupo de los no análogos de nucleósidos las resistencias encontradas son muy similares (Fig. 5). Así, para los tres más clásicos (delavirdina, efavirenz y nevirapina) encontramos entre un 50% y un 80% de muestras con virus sensibles, según el año. Destaca la alta tasa de virus sensibles a la última adquisición del arsenal terapéutico, el TMC125, que lógicamente no se ha "quemado" todavía con el uso. Al igual que ocurriría con los inhibidores de la proteasa y los análogos de nucleósidos, se observa una mejora de la sensibilidad desde el año 2003 en adelan-

te, aunque aquí no se ve el efecto que aparecía en 2004; en este caso parece que entre los años 2005 y 2006 la sensibilidad a la nevirapina y al efavirenz prácticamente no varía.

Como ya hemos dicho, en este breve trabajo descriptivo únicamente hemos pretendido informar sobre 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, estudiando la evolución desde el año 2003 tanto en las mutaciones como en su influencia en el fenómeno de la resistencia o la sensibilidad de los virus a los fármacos en uso en estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lorenzi, P., Milos, O., Hirschel, B. y cols. *Impact of drug resistance on virologic response to salvage therapy*. AIDS 1999; 13: 17-21.

7. 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.
8. Córdoba J., Otero M.C., Láinez B. y cols. *Virus de la inmunodeficiencia humana y resistencias*. Rev Esp Quimioterap 1998; 11: 152-156.
9. Molina, J.M., Córdoba, J., Gobernado, M. *Resistencias de VIH-1 a los antirretrovirales en la Comunidad Valenciana: Mutaciones y sensibilidades*. Rev Esp Quimioterap 2003; 16: 308-312.
10. Baxter, J.D., Schapiro, J.M., Boucher, C.A. y cols. *Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir*. J Virol 2006; 80: 1794-1801.
11. 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.
12. 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.
13. Young, S.D., Britcher, S.F., Tran, L.O. y cols. *L-743, 726 (DMP-266): A novel, highly potent nonnucleoside inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2602.