

Virus de inmunodeficiencia humana y resistencia a antirretrovirales.

REVISIÓN

Dra. Rosa Flieller, Dra. Susana Cabrera.

Febrero 2019



**Cátedra de
Enfermedades Infecciosas**

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA • FACULTAD DE MEDICINA

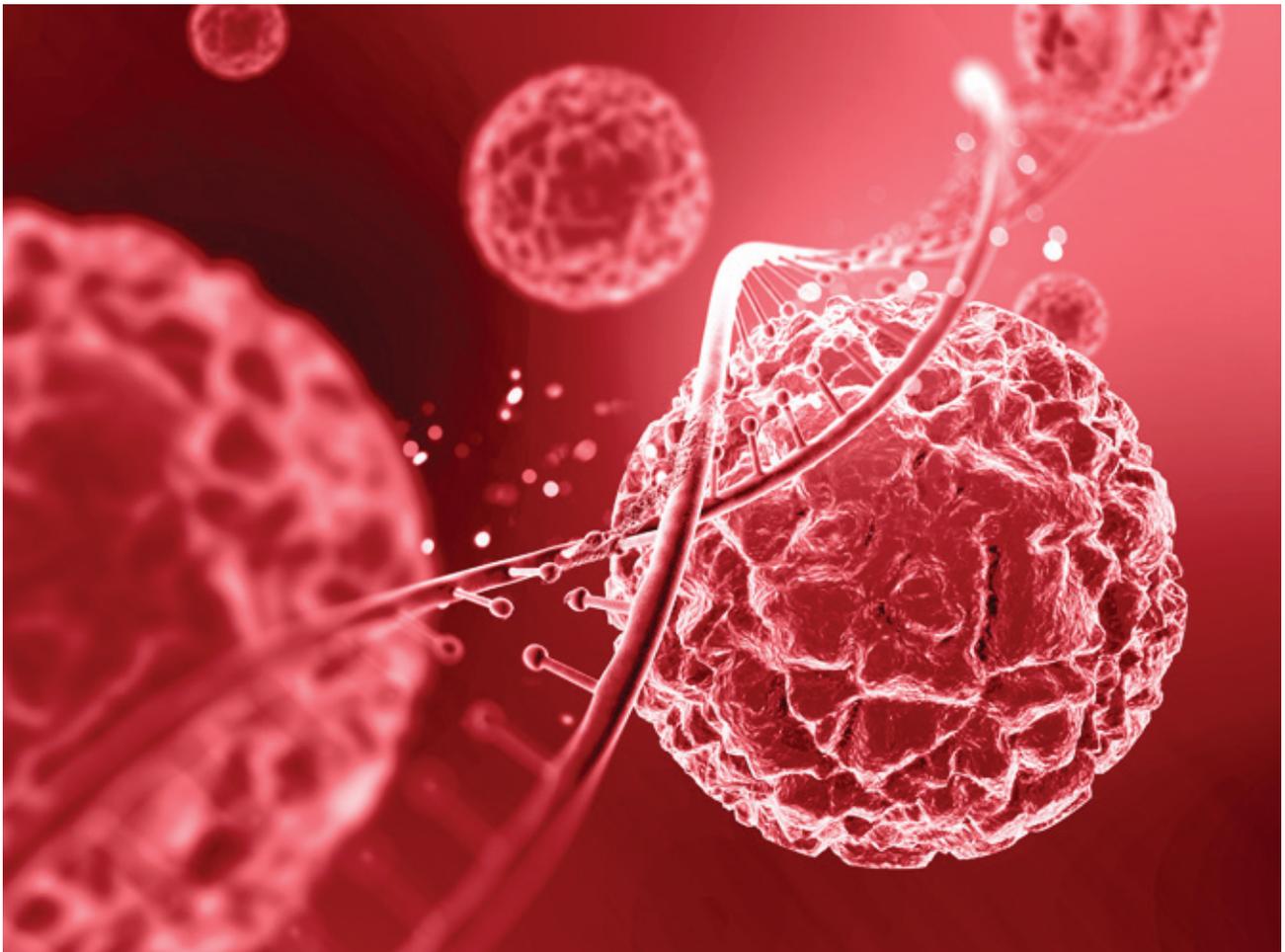
Prof. Dr. Julio Medina

VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES

Revisión

Dra. Rosa Flieller*, Dra. Susana Cabrera**

**Post grado en Enfermedades Infecciosas. **Prof. Agda. Cátedra de Enf. Infecciosas.*



Introducción

El tratamiento antirretroviral (TARV) ha cambiado la historia natural de la infección VIH, al impedir la evolución natural de la enfermedad a través de la recuperación inmune y prolongado la expectativa de vida de los individuos infectados que puede alcanzar edades similares a los no infectados.^{1, 2}

También se ha reportado el efecto protector del TARV sobre la transmisión sexual y desde el año 1996 se conoce su efecto en la prevención de la transmisión perinatal. Por estas razones las indicaciones para el inicio del TARV son cada vez más extensas y actualmente el TARV se indica a todas las personas diagnosticadas, independientemente de su estadio clínico y/o inmunológico.^{3, 4}

Una de las principales consecuencias negativas del TARV es el surgimiento de resistencia a fármacos antirretrovirales (ARVs) que hace perder eficacia al régimen utilizado y obliga al cambio de esquema de TARV a un nuevo esquema que incluya fármacos activos.^{5, 6}

Es así que tanto el surgimiento como la transmisión de cepas virales resistentes impacta desfavorablemente en la eficacia del TARV y condicionan el uso de ARVs. El test genotípico de resistencia de VIH-1, que detecta estas mutaciones, es una valiosa herramienta que contribuye a la selección de un TARV efectiva.^{7, 8}

ESTRUCTURA VIRAL Y CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es un retrovirus que pertenece a la familia

Retroviridae, subfamilia *Orthoretrovirinae* del género *Lentivirus*, encontrándose dos tipos 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2). Siendo el VIH-1 el causante de la pandemia mundial y el VIH-2 con distribución mayoritaria en África subsahariana.⁹

El VIH es un virus envuelto con una morfología esférica, en cuya envoltura lipídica (de origen citoplasmático del hospedero) se encuentran alrededor de 75 espículas formadas por glicoproteínas de superficie y transmembrana que se proyectan desde la superficie del virus maduro. Presentan cápside centrada y una matriz proteica. En el interior de las proteínas del core se encuentra el material genético viral en dos monohebras casi idénticas de ARN de polaridad positiva con un extremo 5' cap y en extremo 3' poliadenilado, un ARN de transferencia y tres enzimas para la replicación viral: retrotranscriptasa, proteasa e integrasa.

El genoma viral está constituido por los genes: *gag*, *pol* y *env* que codifican proteínas precursoras que luego serán clivadas por proteasas en proteínas maduras. El precursor *gag* es clivado en cuatro proteínas, entre ellas p24 (proteína de la cápside marcador de presencia de antígeno en pruebas de Western Blot). El gen *pol* codifica para la proteasa (PR), la retrotranscriptasa (RT) e integrasa. Por último *env* codifica las glicoproteínas de envoltura, que se sintetizan como un gran precursor polipeptídico que es clivado por una proteasa celular formándose la glicoproteína exterior gp120 (contiene dominios responsables de la unión del virus al receptor CD4 de la superficie celular) y la proteína transmembrana gp41.

En el genoma viral además se encuentran los genes: *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr*, *vpu*, que participan en la síntesis y organización de las partículas virales infecciosas. Los

productos de estos genes son fundamentales para la patogenicidad del virus.

Estos virus se caracterizan por una alta tasa de replicación (con gran número de errores debido a la RT) y a un alto grado de recombinación génica, factores que le otorgan al grupo gran variabilidad y diversidad. Es así que se han descrito cuatro grupos para el VIH-1: M, grupo prevalente con 11 subtipos (A1, A2, B, C, D, F1, F2, H, I, J, K), O, N y P. Además gracias a las técnicas de secuenciación molecular de genoma completo se han podido identificar formas recombinantes de VIH-1 como Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) y Formas Recombinantes Únicas (URFs).

En nuestro país se ha identificado cocirculación de subtipos B y C así como un grupo importante de virus recombinantes BF, similares a CRF12_BF (proveniente de Argentina) y se identificó una forma recombinante nueva (CRF38_BF1) confinada a Uruguay.^{10, 11}

Los estudios filogenéticos también permitieron identificar ocho subtipos de VIH-2, designados de la A a la H, siendo los subtipos A y B los predominantes.

TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

El alto grado de replicación viral, la baja fidelidad de la RT y la capacidad de recombinación del VIH-1 (cuasi especies) le otorgan una alta tasa de variabilidad genética. Es esta última la que justifica el tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARV, del inglés highly active antiretroviral therapy - HAART).^{12,13}

Existen 5 tipos principales de drogas:

- *Inhibidores nucleosídicos/ nucleotídicos de la Retrotranscriptasa (INRT):* zidovudi-

na (AZT), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC) abacavir (ABC), tenofovir (TDF), tenofovir alafenamida (TAF): este grupo de ARVs actúan interrumpiendo la síntesis del ADN proviral mediada por la RT. Luego de la fosforilación por quinasas celulares, los nucleótidos son incorporados por la RT dentro de la cadena de ADN viral naciente. Dado la ausencia del grupo terminal 3' hidroxilo en estas drogas, se interrumpe la incorporación de nuevos nucleótidos interrumpiendo la síntesis del ADNc impiden que el virus realice copias de sus propios genes.

Actualmente en desuso: didanosina (ddI), estavudina (D4T), zalcitabina (ddC). No se cuenta aún en nuestro país con TAF.

- *Inhibidores no nucleosídicos de la Retrotranscriptasa (INRT):* efavirenz (EFV), nevirapina (NVP), etravirina (ETR) y rilpivirina (RPV): Estas drogas son pequeñas moléculas con fuerte afinidad por un bolsillo hidrofóbico localizado cercano al dominio catalítico de la RT, actuando directamente sobre la enzima y afectando el proceso de replicación.

- *Inhibidores de proteasas (IP):* atazanavir (ATV), lopinavir (LPV), fosamprenavir (FPV), saquinavir (SQV), ritonavir (R), darunavir (DRV), tipranavir (TPV). Los inhibidores específicos de la proteasa tienen una estructura química que imita la de los péptidos virales que son naturalmente reconocidos y clivados por ella. Estos fármacos tienen una fuerte afinidad por el sitio activo enzimático e inhiben su actividad catalítica de manera altamente selectiva.

- Actualmente en desuso: indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), amprenavir (APV). No se cuenta en nuestro país con TPV. El ritonavir se utiliza en dosis baja como potenciador del resto de los IP.

- *Inhibidores de la integrasa:* raltegravir

(RAL), dolutegravir (DTG), elvitegravir (ETG), bicitegravir (BIC). Evitan que el DNA proviral se inserte en el genoma de las células huésped.

- *Inhibidores de entrada o de fusión:* maraviroc (MVC) y enfuvirtide (T20) estos se adhieren a la glicoproteína de superficie bloqueando la unión de ésta con los receptores CD4. Se evita la fase de adsorción viral sin afectar el funcionamiento normal de la célula.

RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES

La resistencia a los ARV puede ser de tipo celular o viral. En la de tipo celular se encuentran alteraciones en la penetración o en la activación del fármaco. En tal sentido se han postulado diferentes mecanismos como extrusión o cambios a nivel del proceso de activación de fármacos.

En el caso de los inhibidores de proteasa (IPs) una vez absorbidos en el tracto gastrointestinal o en los linfocitos se plantea un mecanismo de extrusión del fármaco mediada por la acción de la glicoproteína *p* expresada en la superficie celular. Teóricamente podría haber un aumento de la expresión de la glicoproteína *p* en la superficie celular proporcional al tiempo de exposición a IPs y en algunos casos, ser la causa de la disminución de la concentración intracelular de estos fármacos. Es sobre esta base teórica que se utilizan estrategias que inhiben la expresión de la glicoproteína *p*, como por ejemplo: uso de otro IP de manera concomitante (ritonavir como potenciador).

Con respecto a los INRT, la resistencia celular estaría relacionada con la alteración de la activación, mediante fosforilación del fármaco. La forma trifosfato de los INRT es la que realmente bloquea la transcripción reversa, por lo que algunos mecanismos

enzimáticos podrían ser modulados para reducir en forma progresiva la fosforilación de los nucleósidos.

La resistencia celular se debe sospechar cuando se presenta falla virológica sin presencia de resistencia genotípica en un paciente con buena adherencia al TARV.¹⁴

La resistencia viral, en sentido amplio se define como cualquier cambio que mejore la replicación de un virus en presencia de un inhibidor.

La generación de resistencia es un mecanismo evolutivo de adaptación, caracterizado por: una alta tasa de error de las enzimas implicadas en la replicación viral; plasticidad de las proteínas virales y elevada cinética de replicación viral en el organismo infectado.

La dinámica viral del VIH es la clave principal para comprender la resistencia de este virus a los fármacos. La población de virus de VIH que constituye el inóculo inicial en la persona infectada es inhomogénea, con respecto a su composición genética, es decir que cada individuo es infectado con diferentes cuasiespecies virales. Estas variantes o cuasiespecies se generan porque los virus ARN carecen de actividad correctora frente a errores de la transcriptasa reversa y es así que cada copia difiere de la original en, al menos, una base nucleotídica.^{12, 15}

En el caso del VIH se estima que al día se generan unas 3300 partículas virales con una mutación en particular. Esta estimación está dada por la asociación de un genoma de unos 9200 nucleótidos, caracterizado por presentar altos niveles de replicación (10^{10} - 10^{11} partículas virales producidas por día), una elevada frecuencia de aparición de mutaciones (3×10^{-5} pares de bases por ciclo de replicación) y una alta producción de partículas virales (10^9). Cuando esta situación se mantiene a lo largo del tiempo

aumenta la probabilidad de múltiples mutaciones y es en definitiva la causa de la gran diversidad genética del virus.¹⁶

Cuando un virus se mantiene en replicación activa bajo la presión de selección de una droga las pocas cepas resistentes preexistentes se convierten en la forma predominante, generándose lo que se conoce como resistencia adquirida. El surgimiento de resistencia adquirida produce una replicación viral no controlada y, en caso de producirse transmisión, las nuevas infecciones se producirán por estas variantes resistentes (resistencia transmitida o resistencia primaria).^{17, 18}

El tiempo en que se seleccionan cepas resistentes varía según las diferentes drogas, lo cual está relacionado a la barrera genética de los diferentes fármacos.^{15, 17} Los fármacos con baja barrera genética son aquellos en los que una única mutación puede seleccionar mutantes resistentes, ejemplos de éstos son lamivudina o los INNRT. Sin embargo, drogas como los IPs requieren la acumulación de varias mutaciones para que el virus se torne resistente.^{19, 20}

Además, la velocidad con que aparecen las cepas resistentes se relaciona con: 1) la proporción de cepas resistentes en la población global al inicio del TARV; 2) la ventaja replicativa que una mutación otorga en presencia de drogas; 3) la extensión de la replicación viral residual.¹⁷

La resistencia a ARVs continúa siendo uno de los factores de fracaso terapéutico de importancia fundamental en el manejo clínico del paciente infectado por VIH.

Las mutaciones asociadas a resistencia pueden ser de dos tipos: primarias y secundarias. Las primarias son las que generan cambios en el genoma que producen variaciones en el sitio activo de la enzima y afectan su afinidad por el sustrato,

surgen como mecanismo de evasión frente a la actividad inhibitoria del fármaco. Las secundarias, sin embargo, surgen más tardíamente para restaurar la alteración de la actividad cinética producida por la resistencia primaria. Por lo tanto las mutaciones secundarias pueden incrementar la replicación viral y la adaptación (*fitness viral*).^{21, 22}

Además por reacción cruzada entre drogas de una misma clase, una mutación determinada puede asociarse a resistencia a uno o más fármacos pertenecientes a un mismo grupo.

Se han asociado más de 220 mutaciones a la resistencia del VIH-1 a los ARVs. La nomenclatura de las mutaciones por convención según la Sociedad de Variaciones del Genoma Humano (HGVS, por sus siglas en inglés) se expresa de la manera siguiente: la letra mayúscula (ya que es una mutación de ADN) correspondiente al aminoácido natural (cepa salvaje por consenso), seguida del número que identifica la posición del codón dentro del gen estudiado y luego, la letra mayúscula correspondiente al aminoácido encontrado en la muestra. Por ej.: el uso de lamivudina o emtricitabina selecciona cepas con una mutación en el codón 184 de la RT, por lo que en este codón que en el virus salvaje codifica para Metionina (*atg*) se encuentra en el virus mutado una Valina (*gta*); lo cual se expresa como M184V.²³

Las mutaciones de resistencia asociadas a INRT pueden ser de dos mecanismos diferentes: mutaciones discriminatorias (permiten a la RT distinguir entre dideoxiterminadores del INRT y los deoxinucleótidos (dNTP) propios de la célula excluyendo al fármaco y mutaciones de desbloqueo de cebadores (facilitan la escisión fosforolítica de un INRT trifosfato del ADN viral). Estas últimas mutaciones

también se conocen como mutaciones de análogos de timidina (TAM) porque son seleccionadas por AZT y d4T.²⁴

Los INNRT se caracterizan por poseer una barrera genética a la resistencia relativamente baja. En el caso de NVP y EFV una única mutación de resistencia bastará para desarrollar resistencia de alto nivel al fármaco y determina resistencia cruzada al otro. RPV también tiene bajo nivel de resistencia. Para ETR cada mutación se le ha asignado un peso específico de acuerdo al impacto que genera en la susceptibilidad, en general se requieren dos mutaciones para generar resistencia de alto nivel.

En los INNRT se observa un alto nivel de resistencia cruzada dentro de la familia, debido a que una misma mutación puede reducir la susceptibilidad a más de un INNRT y a que la baja barrera genética permite la aparición de múltiples linajes

independientes con resistencia a INNRT que incluso pueden estar presentes en forma minoritaria y no ser detectadas por los test de resistencia genotípicos estándar.^{24, 25}

Los IP potenciados (boosteados) con ritonavir (IP/r) tienen altas barreras genéticas a la resistencia por lo que se requieren múltiples mutaciones de resistencia para disminuir la susceptibilidad viral a los fármacos, especialmente LPV/r y DRV/r. Por su parte ATV/r posee una barrera genética menor ya que se genera resistencia in vitro con menos cantidad de mutaciones y se presenta fallo virológico con cambios de susceptibilidad in vitro leves.

Las personas que inicial TARV con IP/r desarrollan menos mutaciones de resistencia que aquellas que inician con planes que contienen INRT e INNRT.²⁶

En las tablas se especifican las mutaciones mayores y menores para INRT, INNRT e IPs.¹

Tabla 1. Mutaciones mayores de resistencia para INRT

	No TAMs					TAMs						MDR	
	184	65	70	74	115	41	67	70	210	215	219	69	151
Consenso	M	K	K	L	Y	M	D	K	L	T	K	T	Q
3TC	V/I	R										Ins	M
FTC	V/I	R										Ins	M
ABC	V/I	R	E	V/I	F	L			W	FY		Ins	M
TDF		R	E		F	L		R	W	FY		Ins	M
ZDV						L	N	R	W	FY	QE	Ins	M

TAMs: Mutaciones asociadas a análogos de timidina. Seleccionadas por AZT y d4T. No TAMs: Evitan incorporación del INRT. MDR: Mutaciones de multidrogo resistencia. La inserción T69 ocurre con TAMs. Q151M se selecciona junto a no TAMs y a las mutaciones accesorias: A62V, V75I, F77L y F116Y. M184VI: La más común de las Mutaciones de Resistencia a INRT. Causa alto nivel de resistencia in vitro a 3TC/FTC pero no constituye contraindicación para el fármaco ya que aumenta la susceptibilidad a TDF y AZT y disminuye el fitness viral. Mutaciones adicionales: K65N es similar a K65R pero más débil. K70GQNT similares a K70E. T215SCDEIVALN (215 revertientes) emergen desde T215YF en ausencia de presión selectiva de INRT.

¹Adaptado de: Stanford University. HIV DRUG RESISTANCE DATABASE. <https://hivdb.stanford.edu/>, <https://hivdb.stanford.edu/s/nrtinotes>. <https://hivdb.stanford.edu/s/nrntinotes>. <https://hivdb.stanford.edu/s/pinotes> Actualizado: dic. 2017

Tabla 2. Mutaciones mayores de resistencia a INNRT

	100	101	103	106	181	188	190	230					
Consenso	L	K	K	V	Y	Y	G	M					
NVP	I	E/P	NS	AM	CIV	LCH	ASEQ	L					
EFV	I	E	P	NS	A	M	CIV	L	C	H	A	SEQ	L
ETR	I	E	P			C	I	V	L		AS	EQ	L
RPV	I	E	P			C	I	V	L		AS	EQ	L

Combinaciones sinérgicas: V179D+K103R reduce más de 10 veces la susceptibilidad a NVP y EFV. Y181C+V179F causa alto nivel de resistencia a ETR y RPV. Mutaciones de E138: E138GQKR son mutaciones no polimórficas que se asocian con nivel intermedio/alto de resistencia a RPV. E138A es una mutación polimórfica asociada con bajo nivel de resistencia a RPV. Mutaciones accesorias: V90I (ETR), A98G (NVP, EFV, ETR, RPV), V108I, V179T (ETR), V179L (RPV), P225H (EFV), K238T (NVP, EFV), L318F.

Tabla 3. Mutaciones de resistencia mayores para IP.

	32	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90
Consenso	V	M	I	G	I	I	L	V	I	N	L
ATV/r	I	I	L	V	V/M	L	V/T/A/ L/M	A/T/ F/S	V	S	M
DRV/r	I		V/A		V	L/M	V	F	V		
LPV/r	I	I	L	V	A	V/M	V	V/T/A/ L/M	V		M

Mutaciones adicionales: L10F, V11I, K20TV, L23I, L33F, K43T, F53L, Q58E, A71I, G73STCA, T74P, N83D, y L89V son mutaciones de resistencia no polimórficas accesorias comunes. L10F, V11I, L33F, T74P, y L89V son mutaciones accesorias que reducen la susceptibilidad a DRV/r. D30N y N88D son mutaciones de resistencia no polimórficas seleccionadas por NFV. L10RY, V11I, L24F, M46V, G48ASTLQ, F53Y, I54S, V82CM, I84AC, N88TG son raras variantes no polimórficas. Hiper susceptibilidad: I50L (para todos los IPs excepto ATV); L76V (ATV).

Referencias de tablas

- Alto nivel de reducción de susceptibilidad o de la respuesta virológica
- Reducción de susceptibilidad o respuesta virológica
- Reducción de susceptibilidad en combinación con otras mutaciones de resistencia
- Aumento de susceptibilidad

Las mutaciones que afectan a los inhibidores de integrasa se ubican en la región que codifica la región catalítica de la enzima y al igual que con los otros ARV se describen mutaciones primarias y secundarias. La mayor información sobre las mutaciones de resistencia a estos fármacos proviene de las seleccionadas por RAL, ya que este fue el primer fármaco del grupo aprobado por la FDA. Se describen tres vías principales de resistencia, frecuentemente superpuestas: N155H ± E92Q; Q148H / R / K ± G140S / A; y Y143C / R. La presencia de dos de estas mutaciones de resistencia generalmente se asocia con una reducción de la susceptibilidad a RAL 150 veces menor. EVG y RAL comparten dos vías mutacionales, teniendo en cuenta dicha superposición de mecanismos genéticos en los pacientes con fallo virológico bajo un tratamiento con uno de estos inhibidores de integrasa el cambio no debe realizarse por el otro. Incluso algunas mutaciones que no parecen presentar resistencia cruzada entre ambos fármacos al producirse de forma aislada (por ej. Y143C / R para RAL) pueden asociarse con niveles más altos de lo esperado de resistencia cruzada si se presentan una o más mutaciones secundarias.

A diferencia de RAL y EVG, se requieren múltiples mutaciones de resistencia para desarrollar resistencia clínicamente significativa a DTG. La mayor parte de la información sobre los mecanismos de resistencia a DTG se ha obtenido de pacientes con fallo bajo planes con RAL en los que se usa DTG como terapia de rescate. Se ha visto que DTG, con mayor barrera genética comparte algunas mutaciones de resistencia con los fármacos del grupo.²⁷

SUBTIPOS Y RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES

La mayor cantidad de evidencia sobre ARVs y resistencia proviene de estudios realizados a partir de virus subtipo B, sin embargo las cepas de subtipo no-B son responsables del 90% de las infecciones por VIH-1 alrededor del mundo.

Es claro que los fármacos son efectivos tanto para subtipos B como no-B y que las mutaciones que causan resistencia en uno también las ocasionan en los otros subtipos.

Sin embargo, varias mutaciones relacionadas a resistencia ocurren preferentemente en ciertos subtipos de VIH-1, lo cual se atribuye al uso diferente de los codones. Por ej: la mutación V106M aparece con mayor frecuencia en virus subtipo C de personas tratadas con INNRT (NVP o EFV) porque en este subtipo requiere cambio de un solo par de bases (C- GTG_ATG) mientras que en los demás requiere el cambio de dos pares de bases para que en vez de valina se codifique metionina (GTA_ATG).²⁸

En los virus de subtipo B, la mutación G140S en la región de integrasa (mutación compensatoria para Q148) se presenta con mayor frecuencia que en los otros subtipos. Esto se debe a que en los virus subtipo B este codón está codificado principalmente por GGT o GGC, por lo que un solo cambio de G por A en la primera posición permite codificar para serina; lo cual no se da en otros subtipos. Estos hallazgos podrían explicar la ocurrencia de la mutación Q148 con mayor frecuencia entre los pacientes con subtipo B en comparación con no-B en fallo virológico bajo TARV con RAL.^{29,30}

Existe evidencia que sugiere que la mutación K65R, que confiere resistencia a TDF, tiene mayor probabilidad de surgir en virus de subtipo C que en otros subtipos. Desde el punto de vista bioquímico, el subtipo C presenta en la secuencia nucleotídica cinco adeninas que preceden a la adenina de la segunda posición del codón K65, lo cual favorece la mutación durante la retrotranscripción.^{31, 32}

Por otro lado, se ha observado al realizar pasajes de virus de subtipo C en cultivos celulares en presencia de TDF la mutación K65R emerge más rápidamente que en pasajes de virus con subtipo B.³³

Estudios retrospectivos sugieren que los pacientes que desarrollan fallo virológico bajo TARV que incluye TDF tienen un riesgo de desarrollar la mutación K65R si están infectados por un virus de subtipo C.^{34, 35} Sin embargo un estudio de cohorte realizado en Reino Unido demostró que ajustando el análisis según factores demográficos y clínicos entre pacientes que recibían TDF, los pacientes con virus subtipo C no tienen mayor riesgo de presentar fallo virológico que aquellos con virus subtipos no-B, no-C.³⁶

MÉTODOS DE LABORATORIO PARA DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A ARV

Pruebas fenotípicas

Los ensayos de susceptibilidad fenotípica *in vitro*, miden la susceptibilidad a los diferentes ARVs en cultivo celular. La susceptibilidad, generalmente, se informa como la concentración de ARV que inhibe la replicación del VIH-1 en un 50% (IC50). La IC50 del virus de un paciente se compara con la de una cepa de referencia susceptible a los medicamentos y se expresa como una relación ("fold change"), de la IC50 del

virus del paciente en relación con el control de referencia.

Debido al costo y al largo tiempo de respuesta, las pruebas fenotípicas generalmente se reservan para el desarrollo de fármacos, la investigación de la resistencia a los medicamentos o casos clínicos complejos.³⁷

Pruebas genotípicas

Las pruebas genotípicas se basan en el análisis de la secuencia nucleotídica viral, obtenida del plasma del paciente y detectan las mutaciones asociadas a drogas antirretrovirales.

La secuenciación se considera el método de referencia de las pruebas de genotipificación y es el que se utiliza en nuestro país.³⁸

Las modernas técnicas de secuenciación derivan del método de Sanger, según el cual se procede a la síntesis de pequeños fragmentos genómicos a partir de la hebra de ADN molde con la incorporación de nucleótidos hasta que de forma aleatoria se incorpora un nucleótido terminador y cesa la síntesis, de manera que se sintetizan hebras de ADN de longitud variable.

Esta metodología detecta todas las mutaciones presentes en las regiones del genoma del VIH que codifican para la transcriptasa reversa y la proteasa viral (gen *pol*). Estas dos regiones genéticas codifican las proteínas enzimáticas que constituyen los principales blancos del tratamiento antirretroviral. El desarrollo de resistencia a estos fármacos se asocia a mutaciones en estas regiones de codificación.

Una vez obtenida la secuencia génica del VIH a partir de la muestra sanguínea del paciente, ésta se compara con la secuencia de referencia del virus natural o salvaje mediante un programa informático acoplado al secuenciador (en los métodos

automatizados) o en bases de datos de resistencia como la de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/DR/>) usada en nuestro país. Por último, los resultados reportan una lista de las mutaciones detectadas para los INRT, INNRT e IP y INI así como una interpretación del efecto de las mutaciones sobre cada uno de los fármacos. Para la realización de este análisis de alta complejidad se requiere de un personal científico experto en biología molecular debidamente certificado para la realización de la prueba.³⁹

El test de resistencia se ha posicionado como una herramienta fundamental para los médicos ya que proporciona beneficios en la respuesta terapéutica. La utilidad clínica de estos test está dada por: permitir identificar fármacos no eficaces y aquellos potencialmente activos; evitar el cambio innecesario de fármacos y la aparición de toxicidad de fármacos inactivos.

Dentro de las limitaciones del test genotípico de resistencia, debemos señalar que las mutaciones que se detectan son aquellas seleccionadas por los fármacos que están presentes al momento de la realización del genotipado, por tanto, en individuos que han recibido varios esquemas de TARV pueden no ser "visibles" mutaciones seleccionadas en planes previos (mutaciones archivadas). Además, para que una cuasi-especie sea detectada por el test, debe estar presente al menos en un 20%, por lo cual existen poblaciones minoritarias que no serán evidenciadas. Por último, la interpretación del test suele ser compleja y es necesaria su realización por profesionales entrenados.⁴⁰

Estudios observacionales han demostrado que la actividad prevista de un régimen de ARV llamado "score de sensibilidad genotípico" (GSS) o "score de sensibilidad fenotípico" donde se asigna a cada droga un valor de 0 (alto nivel de resistencia),

0.5 (resistencia intermedia o parcial) y 1 (susceptible) es un fuerte predictor independiente de la respuesta al TARV. Además algunos sistemas de interpretación toman en cuenta tanto el peso de las mutaciones como conceptos de barrera genética y farmacocinética logrando una evaluación más refinada. Así el GSS se construye de asignando los siguientes valores:

- 1, 0.5 y 0 puntos a los INRT los IP no potenciados y la ETR;
- 1 y 0 puntos para NVP y EFV (no tienen actividad parcial);
- 1.5, 0.5 y 0 puntos para para los IPs potenciados con rtv.

Es en base al GSS obtenido a través de las pruebas de resistencia que las guías de tratamiento antirretroviral actuales sugieren que en los pacientes que inician por primera vez TARV se incluyan tres drogas activas, por lo que se necesita un GSS ≥ 3 , mientras que aquellos expuestos a ARV y en con fallo previo se deben incluir al menos dos drogas activas por lo que se requiere un GSS ≥ 2 .

Debe considerarse que el uso de los "scores" de susceptibilidad tiene su mayor utilidad para predecir fallo virológico pero no se han asociado a una predicción en cuanto a la recuperación inmunológica o clínica.

Actualmente, con el uso extendido en la práctica clínica de las pruebas de resistencia de VIH a ARV en el fallo virológico se busca:

- Evitar cambios innecesarios de ARVs.
- Poner en evidencia la falta de adherencia, cuando existe fallo virológico en ausencia de mutaciones.
- No realizar cambios empíricos.

- El uso de fármacos activos por períodos más prolongados.
- Generar ventajas económicas relacionadas a cambios de drogas.
- No generar toxicidad innecesaria frente a fármacos con poca o nula actividad.
- Lograr una perspectiva más realista del desempeño esperado a futuro de un plan antirretroviral, sobre todo en los casos de resistencia extensa.

Las pruebas de resistencia también están recomendadas previo al inicio del TARV para identificar resistencia transmitida, especialmente en regiones donde la tasa de prevalencia supera el 10%-15%. En nuestro país el estudio se realiza con esta indicación en niños, mujeres embarazadas y personas con primoinfección o infección reciente por VIH (< 12 meses).

Bibliografía

1. ART CC AC. Life expectancy of individual on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008; 372 (9635): 293-99.
2. Marcus JL, Chao CR, Leyden WA, Xu L, Quesenberry CP Jr, Klein DB, et al. Narrowing the gap in life expectancy between HIV-infected and HIV-uninfected individuals with access to care. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016; 73(1): 39-46.
3. Cohen MS, Ying QCh, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med*. 2011; 365(6): 493-505.
4. The INSIGHT START Study Group. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med*. 2015;373(9):795-807. doi:10.1056/NEJMoa1506816.
5. Phillips A, Cambiano V, Nakagawa F, Mabugu T, Miners A, Ford D, et al. 2014a. Cost-effectiveness of HIV drug resistance testing to inform switching to second line antiretroviral therapy in low income settings. *PLoSOne* 9, e109148.
6. Phillips AN, Cambiano V, Miners A, Revill P, Pillay D, Lundgren JD, et al. 2014b. Effectiveness and cost-effectiveness of potential responses to future high levels of transmitted HIV drug resistance in antiretroviral drug-naive populations beginning treatment: modelling study and economic analysis. *Lancet HIV* 1, e85-e93.
7. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, González J, et al. Utility of HIV genotyping ad clinical expert advice. The Havana Trial. *AIDS*. 2002; 16:209-218.
8. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: The VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet*. 1999; 353:2195-2199

9. Reyes- Terán et al. HIV Medicine 2005. Versión en español. Cap. 4: 61-90. Adaptado de www.HIVMedicine.com http://www.hivmedicine.com/hivmedicine2005_spanish.pdf
10. Ruchansky D, Casado C, Russi JC, Arbiza JR, López-Galindez C. Identification of a new HIV Type 1 Circulating Recombinant Form (CRF38_BF1) in Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009; 25: 351-356.
11. Bello G, Aulicino PC, Ruchansky D, Guimarães ML, Lopez-Galindez C, Casado C, et al. Phylodynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology* 2010;
12. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 1995; 267: 483-489.
13. Perelson AS, Ribeiro RM. Modeling the within-host dynamics of HIV infection. *BMC Biol*. 2013; 11: 96.
14. Sobhie Díaz R, de Araripe Sucupira MC. Tipos de resistência aos ARVs em Guia para o manuseio de resistência antirretroviral. Permanyer Brasil Publicações, Ltda. 2011; 23-26.
15. Paredes R, Clotet B. Clinical management of HIV-1 resistance. *Antivir Res*. 2010; 85: 245-65.
16. Abram ME, Ferris AL, Shao W., Alvord WG, Hughes SH. Nature, Position, and Frequency of Mutations Made in a Single Cycle of HIV-1 Replication. *J Virol*. 2010; 84:9864-78.
17. Laurido M. Desarrollo e impacto clínico de la resistencia del VIH-1. Resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales. Cap. 1: 3-11. Guía práctica 1ª ed. *Journal*. 2011.
18. Paredes R, Lalama CM, Ribaldo HJ, Schackman BR, Shikuma C, Giguel F, et al. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Study Team. Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis*. 2010; 201:662-71.
19. Shafer RW, Schapiro JM. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. *AIDS Rev*. 2008; 10: 67-84.
20. Charpentier C, Dwyer DE, Mammano F, Lecossier D, Clavel F, Hance AJ. Role of Minority Populations of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Evolution of Viral Resistance to Protease Inhibitors. *J Virol*. 2004; 78:4234-47.
21. Omrani AS, Pillay D. Multi-drug Resistant HIV-1. *J.Infect*. 2000; 41: 5-11.
22. Bates M, Wrin T, Huang W, Petropoulos C, Hellmann N. Practical applications of viral fitness in clinical practice. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; 16:11-8.
23. Human Genome Variation Society. www.hgvs.org
24. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs*. 2012; 72:e1-25.
25. Melikian GL, Rhee SY, Varghese V, Porter D, White K, Taylor J, et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69: 12-20.
26. King MS, Rode R, Cohen-Codar I, Calvez V, Marcelin A, Hanna GJ, Kempf D J. Predictive Genotypic Algorithm for Virologic Response to Lopinavir-Ritonavir in Protease Inhibitor-Experienced Patients. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007;51: 3067-3074.
27. Blanco JL, Varghese V, Rhee SY, Gatell JM, Shafer R. W. HIV-1 Integrase Inhibitor Resistance and Its Clinical Implications. *JID*. 2011; 203: 1204-14.
28. Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, et al. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*. 2003; 17: F1-F5.
29. Doyle T, Dunn DT, Ceccherini-Silberstein F, De Mendoza C, Garcia F, Smit E, et al. Integrase inhibitor (INI) genotypic resistance

- in treatment-naive and raltegravir-experienced patients infected with diverse HIV-1 clades. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015;70: 3080–86.
30. Fourati S, Charpentier C, Amiel C, Morand-Joubert L, Reigadas S, Traub-Darsatz M, et al. Group, A.A.R.S. Cross-resistance to elvitegravir and dolutegravir in 502 patients failing on raltegravir: a French national study of raltegravir-experienced HIV-1-infected patients. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 1507–12.
 31. Invernizzi CF, Coutinos D, Oliveira M, Moisi D, Brenner BG, Wainberg MA. Signature nucleotide polymorphisms at positions 64 and 65 in reverse transcriptase favor the selection of the K65R resistance mutation in HIV 1 subtype C. *Journal Infect Dis.* 2009; 200, 1202–06.
 32. Coutinos D, Invernizzi CF, Xu H, Moisi D, Oliveira M, Brenner BG, Wainberg MA. Template usage is responsible for the preferential acquisition of the K65R reverse transcriptase mutation in subtype C variants of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2009; 83: 2029–33.
 33. Wainberg MA, Brenner BG. Role of HIV Subtype Diversity in the Development of Resistance to Antiviral Drugs. *Viruses.* 2010; 2: 2493-2508.
 34. TenoRes Study Group, Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2016.
 35. Theys K, Vercauteren J, Snoeck J, Zazzi M, Camacho RJ, Torti C, et al. HIV-1 subtype is an independent predictor of reverse transcriptase mutation K65R in HIV-1 patients treated with combination antiretroviral therapy including tenofovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 5: 1053–56.
 36. White E, Smit E, Churchill D, Collins SE, Booth C, Tostevin A, et al, on behalf of the UK HIV Drug Resistance Database and UK Collaborative HIV Cohort Study. No evidence that HIV-1 subtype C infection compromises the efficacy of tenofovir-containing regimens: cohort study in the United Kingdom. *J Infect Dis.* 2016.
 37. Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, Lie YS, Wrinn T, Huang W, et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:920–28.
 38. Alemán Y, Vinken L, Kourí V, Pérez L, Álvarez A, Abrahantes Y, et al. Performance of an In-House Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genotyping System for Assessment of Drug Resistance in Cuba. *PLoS ONE.* 2015. 10(2): e0117176.doi:10.1371/journal.pone.0117176
 39. Clutter DS, Jordan M, Bertagnolio S, Shafer RW. HIV-1 drug resistance and resistance testing. Review. *Infection, Genetics and Evolution.* 2016; 46:292–307.
 40. Kuritzkes DR, Grant RM, Feorino P, Griswold M, Hoover M, Young R, et al. Performance Characteristics of the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and the Opengene DNA Sequencing System. *JCM.* 2003;41: 1599-2003.



Cátedra de Enfermedades Infecciosas

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA • FACULTAD DE MEDICINA

Prof. Dr. Julio Medina

Dirección: Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela",
Piso 16. Av. Italia, S/N.

Montevideo, 11600. Uruguay.

Mail: clinfec@fmed.edu.uy

Tel/Fax: (+598 2) 4876981

Twitter: [@Infectologia_uy](https://twitter.com/Infectologia_uy)

Sitio web: www.infectologia.edu.uy