

Genotipado de la resistencia genotípica secundaria a los antirretrovirales en pacientes con aids en los Estados de Pará y Amazonas, Brasil: 2002 a 2006*

Genotipagem da resistência genotípica secundária aos antirretrovirais em pacientes com aids nos Estados do Pará e Amazonas, Brasil: 2002 a 2006

Profile of secondary genotypic resistance to antiretroviral drugs in aids patients in the States of Pará and Amazonas, Brazil: 2002 to 2006

Olinda Macêdo

Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Luciana Macedo Ferreira

Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Rita Catarina Medeiros de Sousa

Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Carmen Andrea Freitas

Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

José Ricardo Mourão Araújo

Casa Dia, Secretária Municipal de Saúde, Belém, Pará, Brasil

RESUMEN

La resistencia a las drogas antirretrovirales resulta de la supresión incompleta de la replicación del VIH-1. El presente estudio caracterizó el perfil de resistencia genotípica a los antirretrovirales (ARV) en muestras serológicas de 127 pacientes VIH positivos, originarias de los Estados de Amazonas y Pará, Región Norte de Brasil, en el período de 2002 a 2006. Las muestras fueron sometidas a la prueba de resistencia por el kit ViroSeq™ Genotyping System. Considerando las informaciones genéticas obtenidas de las regiones de la proteasa y/o transcriptasa inversa del VIH-1, la mutación M184V (81,1%) fue la más asociada a los inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (INTR), en individuos usando ARV en el Estado de Pará, y la mutación T215F/Y (56,3%) en individuos del Estado de Amazonas. La mutación K103N fue la más prevalente (33,5%) para los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (INTR) en ambos Estados. Para el gen de la proteasa la mutación *minor* L63P (65,3%) se presentó como la más frecuente en ambos Estados. El estudio reveló la importancia de la identificación de mutaciones asociadas a la resistencia a las drogas antirretrovirales para el uso racional en esquemas terapéuticos y sus resultados se mostraron semejantes a los obtenidos en otras regiones de Brasil.

Palabras clave: Terapia Antirretroviral; VIH-1; Mutación; Genotipado.

INTRODUCCIÓN

La resistencia del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) a los fármacos antirretrovirales es consecuencia de la alta tasa de replicación y mutación de este virus combinada con su capacidad de integración con el genoma del huésped. El VIH-1 presenta una notable diversidad genética con implicaciones en la patogénesis, desarrollo de vacuna, diagnóstico y susceptibilidad a los antirretrovirales (ARV)^{1,2,3}.

El virus posee distintos mecanismos que le permiten escapar tanto de la presión del sistema inmunológico como de la presión farmacológica. El surgimiento de las *quasiespecies* es favorecido por los siguientes factores: escasa fidelidad de la transcriptasa reversa (TR) en su trabajo de replicación del ARN viral lo que genera una elevada población de cepas de virus diversificadas – cerca de 10^{12} y extraordinaria cinética de replicación viral con una vida plasmática promedio inferior a seis horas^{4,5}. La continua producción de esas variantes proporciona al virus una gran capacidad de adaptación al huésped. La resistencia antirretroviral es un de los motivos primarios para que la terapia antirretroviral (TARV) fracase con el uso prolongado del esquema^{6,7}.

La finalidad de la TARV para individuos con infección por el VIH incluye impedir o retardar la progresión de la inmunodeficiencia; mejorar la sobrevida de los pacientes, disminuyendo la ocurrencia de infecciones oportunistas; y mejorar la calidad de vida de los infectados^{8,9,10}. La reducción de la carga viral en sangre periférica y la reversión de la inmunodeficiencia característica traen beneficios al paciente, aumentando la supervivencia del individuo en, al menos, 13 a 14 años¹¹. El esquema

* Artículo resultado de disertación presentada al Programa de Posgrado en Biología de los Agentes Infecciosos y Parasitarios del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Pará, como requisito para obtener el grado de Magíster en Biología de Agentes Infecciosos y Parasitarios.

Correspondencia / Correspondencia / Correspondence:

Olinda Macêdo

Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia
Rodovia BR 316, km 7, s/nº Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
Tel.: +55 (91) 3214 2009
E-mail: olindamacedo@iec.pa.gov.br

terapéutico está compuesto por una asociación de drogas para obtener la disminución de carga viral plasmática y, así, alcanzar niveles virales indetectables en la circulación periférica¹².

Las cepas resistentes del virus VIH-1 pueden ser transmitidas entre los individuos. La transmisión de variantes del VIH-1, con resistencia a los inhibidores de la TR y la proteasa (PR), ha sido ampliamente caracterizada en países desarrollados. Con efecto, los niveles de transmisión del VIH-1 estudiados en pacientes con infección reciente documentada y con otros crónicamente infectados mostraron que de 10 a 20% de los nuevos pacientes diagnosticados en Europa y EUA corresponde a infecciones con cepas de VIH-1 resistentes a, al menos, una droga^{13,14,15,16}.

Algunos autores^{17,18} estimaron que alrededor de 70% de los individuos, aunque correctamente tratados, presentaban una carga viral detectable y tenían resistencia como mínimo, a un medicamento. La transmisión del VIH-1 resistente a drogas también fue documentada entre todos los grupos con comportamiento de riesgo¹⁹.

Se sabe que la supresión de la infección por VIH-1 por las drogas antirretrovirales es notable. Sin embargo, si la infección es ocasionada por un virus resistente, puede haber una reducción de la eficacia de los medicamentos empleados en el régimen de primera línea²⁰.

La transmisión del VIH resistente a los ARV impacta negativamente en la respuesta terapéutica de individuos vírgenes de tratamiento. Como la estrategia de la terapia y utilización de drogas ARV evolucionó, los estándares de mutación transmitida pueden cambiar. En investigaciones que abarcaron 40 ciudades de los EUA quedó demostrado que hubo una alta prevalencia de resistencia a los ARV, sugiriendo que el genotipado y/o el fenotipado debería ser considerado en la investigación de esos individuos, especialmente si la terapia incluye un inhibidor no nucleósido de la TR (IRTNN)²¹.

En Brasil, la distribución gratuita y universal de los medicamentos ARV por el Ministerio de Salud se inició en 1996 con la introducción del esquema TARV, el que cambió radicalmente la sobrevida de los portadores de Sida^{22,23}. No obstante, Clavel y Hance²⁴, describieron que, con el uso en masa de esos medicamentos, hubo un aumento del riesgo de resistencia a los ARV, surgiendo la necesidad de adoptar un monitoreo intenso y continuo de esa resistencia.

El presente estudio evaluó el perfil de resistencia en muestras de sangre de individuos con Sida para mejorar las estrategias de terapia en pacientes con fracaso en los regímenes terapéuticos previos en los Estados de Pará y Amazonas, Región Norte del Brasil, en el período de 2002 a 2006.

MATERIAL Y MÉTODOS

La detección de la resistencia primaria y secundaria a los ARV fue evaluada utilizando la lista propuesta por Johnson y colaboradores²⁵ para la clasificación de las mutaciones. En el presente estudio se observó, durante el proceso de análisis realizado en muestras de pacientes

usuarios de ARV, un largo espectro de codones mutacionales asociados a la mayor o menor resistencia a los ARV.

CRITERIO DE INCLUSIÓN

Se emplearon protocolos propios de la Red Nacional de Laboratorios de Genotipado (Renageno) los cuales contenían informaciones personales, clínicas, de laboratorio y epidemiológicas, para, enseguida, elegir el grupo considerando los criterios de la red. Los pacientes estuvieron de acuerdo y firmaron un documento conteniendo el término de consentimiento informado, o consentimiento libre y esclarecido, de la Coordinación Nacional de DST y Sida del Ministerio de Salud (CN de DST/Sida del MS), concordando en tomar parte del estudio de la Renageno.

DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para poder efectuar el estudio se colectaron muestras de plasma (1 mL) de los individuos que cumplieron con los criterios de inclusión.

POBLACIÓN ESTUDIADA

Considerando que se trata de un estudio retrospectivo realizado en el período de 2002 a 2006, el material se procesó adoptando los procedimientos de la Renageno, utilizando muestras de 127 pacientes, siendo 95 del Estado de Pará y 32 del Estado de Amazonas.

Las medidas de frecuencia fueron analizadas usando el Programa BioEstat 5.0²⁶. El análisis de las variables por la prueba del chi-cuadrado que presentaron valores de p menores a 5% ($p < 0,05$) proporcionaron adherencia a nivel de significación estadístico.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

El estudio incluyó a 32 (25,2%) pacientes procedentes de Amazonas, 19 (59,4%) de los cuales pertenecían al sexo masculino y 95 (74,8%) de Pará, 75 (78,9%) de los cuales del sexo masculino.

La edad varió de 19 a 72 años (promedio de 39 años) siendo que la mayoría, 84,3% estaba en la franja etaria entre 20 y 49 años.

Por ocasión del genotipado, 84 (66,1%) individuos de ambos Estados no presentaban ningún síntoma o señal clínica de Sida. El diagnóstico de la infección por el VIH-1 fue realizado en 63,8% en el período entre 1991 y 1999.

La detección de carga viral entre 10 mil y 100 mil copias de ARN/ml. fue positiva en 58,3% de los pacientes, con mediana de conteo en 39 copias de ARN/ml. El conteo de linfocitos TCD4⁺ en 57,5% de los pacientes al momento de su inclusión en el estudio estaba por debajo de 200 células/mm³ (mediana 97 células/mm³).

ANÁLISIS MOLECULAR

La extracción de ARN se realizó a partir de 1.000 microlitros (μ L) de plasma por el método ViroSeqTM HIV-1 Genotyping System, siguiendo las instrucciones del

fabricante (Celera Diagnostic, 2004). La secuenciación de las muestras se hizo empleando un secuenciado automatizado modelo ABI PRISM® 3100 DNA Analyzer, (Applied Biosystems, EUA) al cual estaba acoplado el Software – VIH-1 Genotyping System, versión 2.6, para la detección automática y análisis de todas las secuencias.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El perfil de las mutaciones de resistencia asociado al gen de la TR de todos los individuos con fracaso terapéutico en el Estado de Pará en las clases de los inhibidores nucleósidos de la TR (ITRN), no nucleósidos de la TR (ITRNN) y de los inhibidores de la proteasa (IP), se puede ver en las tablas 1 y 2.

Tabla 1 – Mutaciones asociadas a la resistencia a los ARV en los genes de la TR en muestras colectadas de 95 pacientes con fracaso terapéutico, Estado de Pará, 2002-2006

Mutación ITRN	Nº	%	Mutación ITRNN	Nº	%
M184V	77	81,1	K103N	32	33,7
T215F/Y	53	55,8	G190A/S	11	11,6
M41L	38	40	Y181C/I	9	9,5
D67N	29	30,5	L100I	7	7,4
K70R	25	26,3	P225H	7	7,4
L210W	22	23,2	V108I	4	4,2
K219E/Q	20	21,1	Y188L	2	2,1
V118I	20	21,1	V106M	1	1,1
E44A/D	13	13,7			
L74V	7	7,4			
Q151M	6	6,3			
V75I	5	5,3			
K65R	2	2,1			
Y115F	1	1,1			
ins69	1	1,1			

Nota: ITRN: inhibidores nucleósidos de la TR; ITRNN: inhibidores no nucleósidos de la TR.

Tabla 2 – Frecuencia de mutaciones resistentes a los ARV en el gen de la proteasa de mutaciones menores o secundarias y de mutaciones mayores o principales encontradas en muestras colectadas de 95 pacientes con fracaso terapéutico en el Estado de Pará, 2002-2006

Mutación IP Secundaria	Nº	%	Mutación IP Principal	Nº	%
L63P	62	65,3	M46I/L	36	37,9
L10F/I/R/V	49	51,6	V82A/F/S/T	27	28,4
A71I/T/V	46	48,4	L90M	20	21,1
M36I/V	39	41,1	D30N	11	11,6
I93L	32	33,7	I84V	9	9,5
I54L/M/V	31	32,6	V32I	6	6,3
I62V	30	31,6	I47V	5	5,3
V77I	27	28,4	I50L	4	4,2
K20I/R/M	26	27,4			
I13V	13	13,7			
G73A/C/S/T	10	10,5			
L24I	10	10,5			
N88D	9	9,5			
L33F/I	8	8,4			
D60E	9	9,5			
F53L	6	6,3			
K43T	4	4,2			
Q58E	4	4,2			
E35G	1	1,1			

Nota: IP: inhibidores de la PR.

El perfil de las mutaciones de resistencia asociado al gen de la TR de todos los individuos con fracaso terapéutico en el Estado de Amazonas en la clase de los ITRN, ITRNN e IP puede verse en las tablas 3 y 4.

Tabla 3 – Mutaciones asociadas a resistencia a los ARV en los genes de la TR en muestras colectadas de 32 pacientes con fracaso terapéutico, Estado de Amazonas, 2005-2006.

Mutación ITRN	Nº	%	Mutación ITRNN	Nº	%
T215F/Y	18	56,3	K103N	11	34,4
M184V	17	53,1	Y181C	5	15,6
K219E/Q	16	50	L100I	4	12,5
D67N	15	46,9	G190A/S	4	12,5
K70R	14	43,9	Y188L	2	6,3
M41L	11	34,4	V108I	1	3,1
V118I	11	34,4	V106A	1	3,1
L210W	8	25			
E44D	5	15,6			
Q151M	5	15,6			
V75I	3	9,4			
K65R	2	6,3			
69ins	2	6,3			
L74V	1	3,1			

Nota: ITRN: inhibidores nucleósidos de la TR; ITRNN: inhibidores no nucleósidos de la TR.

Tabla 4 – Frecuencia de mutaciones resistentes a los ARV en el gen de la proteasa de mutaciones secundarias y de mutaciones principales encontradas en muestras colectadas de 32 pacientes con fracaso terapéutico en el Estado de Amazonas, 2005-2006

Mutación IP Secundaria	Nº	%	Mutación IP Principal	Nº	%
L63P	25	78,1	V82A/F/S/T	10	31,3
L10F/I/R/V	16	50	L90M	8	25
A71I/T/V	16	50	M46I/L	6	18,8
I62V	16	50	D30N	5	15,6
I93L	15	46,9	G48V	4	12,5
V77I	14	43,8	I47A/V	3	9,4
M36I/L	13	40,6	I50L	2	6,3
I54L/T/V	9	28,1			
I13V	8	25			
K20I/M/R	6	18,8			
D60E	5	15,6			
N88D	5	15,6			
G73S	4	12,5			
K43T	2	6,3			
L24I	1	3,1			
L33F	1	3,1			
Q58E	1	3,1			
E35G	1	3,1			
F53L	1	3,1			

Nota: IP: inhibidores de la proteasa.

Considerando la presencia de mutaciones principales relacionadas a las tres clases de ARV (Tabla 5), se observó mayor ocurrencia en la clase de los ITRN (96,9%), seguida de IP (62,5%) e ITRNN (56,3%) en Amazonas. En Pará, los porcentajes observados en las mismas clases fueron: ITRN (91,6%), IP (61,1%) e ITRNN (50,5%). No se observó significación estadística para los ARV con (p = 0,1188) en Amazonas, mientras en Pará hubo significación (p = 0,0017).

Tabla 5 – Frecuencia de las principales mutaciones según las clases de ARV en los pacientes de los Estados de Amazonas y Pará, 2002-2006

Clases de ARV	Amazonas			Pará		
	Nº de mutaciones principales	%	p (valor)	Nº de mutaciones principales	%	p (valor)
ITRN	31/32	96,9		87/95	91,6	
ITRNN	18/32	56,3	0,1188	48/95	50,5	0,0017
IP	20/32	62,5		58/95	61,1	

Nota: ITRN: inhibidores nucleósidos de la TR; ITRNN: inhibidores no nucleósidos de la TR; IP: inhibidores de la proteasa.

Se infirió el nivel de resistencia y de sensibilidad del VIH-1 de las muestras de Pará a los medicamentos con meta en el gen de la TR (Tabla 6). En orden decreciente, relacionamos los fármacos más comprometidos para utilizar en un

próximo esquema por los pacientes de este análisis: (Lamivudina, Zidovudina, Zidovudina+Lamivudina, Didanosina (en la clase de los ITRN) y Efavirenz y Nevirapina (en la clase de los ITRNN). Se observó significación estadística para la resistencia (*R), resistencia intermedia (**RI) y (**S) sensible S con p (valor) 0,0001 en Pará por la prueba de chi-cuadrado de adherencia con nivel de significación 5% (0,05).

Se hizo la misma evaluación (Tabla 6) con los medicamentos utilizados en el gen de la PR y observamos los siguientes fármacos más comprometidos: Nelfinavir, Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Fosamprenavir e Indinavir/Ritonavir. Se observó elevada significación estadística para la *R y **S con p (valor) 0,0001 en el Estado de Pará por la prueba de chi-cuadrado de adherencia, pero no fue significativo para la variable **RI ($p = 0,092$).

Tabla 6 – Nivel de resistencia y sensibilidad a los ARV en los genes de la TR y la proteasa en 95 muestras de pacientes del Estado de Pará 2002-2006

ARV	Gen de la TR								
	*R muestra nº abs	%	p (valor)	**RI muestra nº abs	%	p (valor)	***S muestra nº abs	%	p (valor)
ABC	42	44,2		42	44,2		11	11,6	
ddl	51	53,7		34	35,8		10	10,5	
3TC	79	83,2		1	1,1		15	15,8	
d4T	37	38,9		26	27,4		32	33,7	
TDF	31	32,6	0,0001	6	6,3	0,0001	58	61,1	0,0001
TDF+3TC	7	7,4		26	27,4		62	65,3	
AZT	58	61,1		14	14,7		23	24,2	
AZT+3TC	51	53,7		10	10,5		34	35,8	
EFV	52	54,7		–	–		43	45,3	
NVP	52	54,7		–	–		43	45,3	
ARV	Gen de la proteasa								
	*R muestra nº abs	%	p (valor)	**RI muestra nº abs	%	p (valor)	***S muestra nº abs	%	p (valor)
FPV	50	52,6		11	11,6	0,0924	34	35,8	0,0001
IDV	55	57,9	0,0001	13	13,7	–	27	28,4	
LPV	27	28,4		10	10,5		58	61,1	
NFV	63	66,3		10	10,5		22	23,2	
RTV	50	52,6		11	11,6		34	35,8	
SQV	57	60		7	7,4		31	32,6	
ATV	47	49,5		6	6,3		42	44,2	
FPV/r	35	36,6		6	6,3		54	56,8	
SQV/r	36	37,9		9	9,5		50	52,6	
IDV/r	49	51,6		5	5,3	–	41	43,2	
ATV/r	21	22,1		19	20		55	57,9	

Nota: *R: resistente; **RI: resistencia intermedia; ***S: sensibilidad; Señal convencional utilizada: – Dato numérico igual a cero no resultante de redondeo.

Leyenda: ABC (Abacavir); ddl (Didanosina); 3TC (Lamivudina); d4T (Estavudina); TDF (Tenofovir); TDF+3TC (Tenofovir + Lamivudina); AZT (Zidovudina); AZT+3TC (Zidovudina + Lamivudina); EFV (Efavirenz); NVP (Nevirapina); FPV (Fosamprenavir); IDV (Indinavir); LPV (Lopinavir); NFV (Nelfinavir); RTV (Ritonavir); SQV (Saquinavir); ATV (Atazanavir); FPV/r (Fosamprenavir/Ritonavir); SQV/r (Saquinavir/Ritonavir); IDV/r (Indinavir/Ritonavir); ATV/r (Atazanavir/Ritonavir).

Se infirió el nivel de resistencia y sensibilidad del VIH-1 de las muestras del Estado de Amazonas a los medicamentos con meta en el gen de la TR (Tabla 7). En orden decreciente, relacionamos los fármacos más comprometidos a utilizar en un próximo esquema por los pacientes de este análisis: Zidovudina, Zidovudina+Lamivudina, Lamivudina, Estavudina, Didanosina y Abacavir en la clase de los ITRN y Nevirapina y Efavirenz en la clase de los ITRNN. Se observó significación estadística para la RI y S con $p = 0,0042$ y $p = 0,0001$ respectivamente en Amazonas por la prueba chi-cuadrado de adherencia a nivel de significación 5% (p

$< 0,05$). No hubo significación para la variable R ($p = 0,2029$).

Lo mismo sucede (Tabla 7) con los medicamentos utilizados en el gen de la proteasa. Observamos los siguientes fármacos más comprometidos en el Estado de Amazonas: Nelfinavir, Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Fosamprenavir e Indinavir/Ritonavir. Se observó significación estadística para la R $p = 0,0231$ en Amazonas por la prueba chi-cuadrado de adherencia a nivel de significación 5% ($0,05$), no siendo significativa para las variables RI y S $p = 0,0521$ y $p = 0,100$ respectivamente.

Tabla 7 – Nivel de resistencia y sensibilidad a los ARV en los genes de la TR y de la proteasa en 32 muestras de pacientes del Estado de Amazonas, 2005-2006

Gen de la TR									
ARV	*R muestra n° abs	%	p (valor)	**RI muestra n° abs	%	p (valor)	***S muestra n° abs	%	p (valor)
ABC	18	56,3		12	37,5		2	6,3	
ddl	21	65,6		10	31,3		1	3,1	
3TC	24	75		3	9,4		5	15,6	
d4T	23	71,9		3	9,4		6	18,8	
TDF	15	46,9		–	–		17	53,1	
TDF+3TC	8	25	0,202	7	21,9	0,004	17	53,1	0,001
AZT	25	78,1		3	9,4		4	12,5	
AZT+3TC	24	75		6	6,3		6	18,8	
EFV	19	59,4		–	–		13	40,6	
NVP	20	62,5		–	–		12	37,5	
Gen de la proteasa									
ARV	*R muestra n° abs	%	p (valor)	**RI muestra n° abs	%	p (valor)	***S muestra n° abs	%	p (valor)
FPV	13	40,6		6	18,8		13	40,2	
IDV	19	59,4		5	15,6		8	25	
LPV	4	12,5		7	21,9		21	65,6	
NFV	23	71,9		2	6,3		7	21,9	
RTV	20	62,5		2	6,3		10	31,3	
SQV	18	56,3	0,0231	4	12,5	0,0521	10	31,3	0,100
ATV	15	46,9		4	12,5		13	40,6	
FPV/r	10	31,3		2	6,3		20	62,5	
SQV/r	15	46,9		2	6,3		15	46,9	
IDV/r	18	56,3		2	6,3		12	37,5	
ATV/r	9	28,1		6	18,8		17	53,1	

Nota: *R: resistente; **RI: resistencia intermedia; ***S: sensibilidad.

Leyenda: ABC (Abacavir); ddl (didanosina); 3TC (Lamivudina); d4T (Estavudina); TDF (Tenofovir); TDF+3TC (Tenofovir+Lamivudina); AZT (Zidovudina); AZT+3TC (Zidovudina+Lamivudina); EFV (Efavirenz); NVP (Nevirapina) FPV (Fosamprenavir); IDV (Indinavir); LPV (Lopinavir); NFV (Nelfinavir); RTV (Ritonavir); SQV (Saquinavir); ATV (Atazanavir); FPV/r (Fosamprenavir/Ritonavir); SQV/r (Saquinavir/Ritonavir); IDV/r (Indinavir/Ritonavir); ATV/r (Atazanavir/Ritonavir).

DISCUSIÓN

La mutación encontrada con más frecuencia en el Estado de Pará, involucrando a los ITRN, fue la M184V, seguida de los codones 215, 41, 67, 70, 210 y 219, perfil este presentado por el VIH-1. Por otro lado, la mutación más frecuente en los pacientes del Estado de Amazonas fue la T215F/Y. En orden decreciente, los otros codones encontrados fueron los siguientes: 184, 70, 219, 67, 41 y 210. El estándar de mutaciones observado en el Estado de Pará recuerda al encontrado en el Sudeste y el Nordeste brasileños^{27,28}, mientras que el encontrado en el Estado de Amazonas fue similar al observado en Chile²⁹, lo que

sugiere que el origen de las cepas entre esos dos Estados amazónicos sea, probablemente, distinto.

El discreto aumento de la prevalencia en el codón 215, observado en las muestras del Estado de Amazonas, comparado al codón 184, antes observado, se debió, posiblemente, al hecho de que el estándar de la mutación sola M184V fue hallado en muestras de apenas dos de los 32 pacientes del Estado de Amazonas. Medeiros y colaboradores³⁰ observaron que pacientes de la Región Nordeste de Brasil, presentaron un aumento significativo de mutaciones TAM, cuando comparados a grupos de pacientes enfrentando fracaso terapéutico primario y

secundario con aquellos pacientes con fracasos terapéuticos múltiples y, asociaron ese hecho al mayor número de terapias empleadas en estos últimos pacientes ocasionando, como consecuencia, el aumento de las referidas mutaciones.

Aún en la clase de los ITRN, en otro estudio se identificó que, más de un quinto de las muestras de pacientes del Estado de Pará presentaba la frecuencia de cuatro mutaciones en las posiciones 184, 41, 210 y 215, mientras que en el Estado de Amazonas la frecuencia de esos codones fue menor. El estándar de mutación de esos codones en los dos Estados de la Región Norte brasileña recuerda lo que fue anteriormente observado en pacientes del Estado de Rio de Janeiro²⁷.

Además de las mutaciones mencionadas para la clase de los ITRN, también fueron observadas otras mutaciones importantes, aunque en menor proporción, en los codones 74, 151, 75, 115, 65, e ins69, en el Estado de Pará. Las muestras del Estado de Amazonas presentaron resistencia para los mismos codones con excepción del 115, presente solamente en las muestras del Estado de Pará, lo que está de acuerdo con la literatura para otras regiones de Brasil²⁸.

En este estudio se detectó la presencia de mutación principal para los ITRN en 96,9% de las muestras virales del Estado de Amazonas y en 91,6% de los VIH-1 procedentes de muestras del Estado de Pará. Aunque menos potente contra el VIH que los ITRNN y los IP, los ITRN tienen un papel central en la TARV y permanecen como parte del tratamiento estándar actual^{31,32}.

Por otro lado, el VIH-1 de las muestras del Estado de Amazonas mostró un nivel de resistencia superior a 50% a los siguientes ARV: Zidovudina, Zidovudina+Lamivudina, Lamivudina, Didanosina y Abacavir, y el VIH-1 de las muestras del Estado de Pará presentaba el mismo nivel de resistencia a los fármacos Lamivudina, Zidovudina, Zidovudina+Lamivudina y Didanosina. La mayor sensibilidad fue al medicamento Tenofovir – superior a 50%, en ambos Estados. Estos datos son similares también a los descritos para VIH-1 en pacientes procedentes del Nordeste de Brasil³⁰.

En este estudio se detectó la mutación K103N en la clase ITRNN como la más prevalente en las muestras de los pacientes de los dos Estados y los valores hallados son similares a los de otros relatos en Brasil^{27,28}. Es de destacar que esa mutación ocurrió en más de 50% de los pacientes que desarrollaron fallo virológico con el uso de Efavirenz, reduciendo su susceptibilidad en aproximadamente 25 veces³³.

En el presente estudio detectamos la presencia de mutación principal para los ITRNN en 56,3% de las muestras del Estado de Amazonas y en 50,5% de las muestras de Pará, reflejándose en el nivel de resistencia del VIH-1 en 59,4% muestras de Amazonas y 57,4% del Estado de Pará, tanto al Efavirenz como a la Nevirapina, las únicas drogas pertenecientes a esa clase de ARV evaluadas. Cualquier tipo de mutación detectada en ese grupo de drogas, ocasiona significativa resistencia cruzada a todas las drogas, por tratarse de medicamentos que presentan una baja barrera genética²⁴ Ese hecho

también fue observado anteriormente en diversos otros estudios brasileños^{27,28}.

Entre los IP, la barrera genética para resistencia es generalmente mayor. Podemos citar, como ejemplo, el régimen ARV conteniendo Ritonavir, que requiere múltiples mutaciones que varían entre los IP, y su grado de resistencia depende tanto del número como del tipo de mutación presente^{34,35}.

Las mutaciones secundarias (*minor*) normalmente emergen antes de las principales (*major*), y por sí mismas no presentan un efecto significativo en el fenotipo²⁵. En algunos casos, su efecto puede ser para compensar el *fitness* replicativo del virus conteniendo mutaciones principales y en otros que contribuyen a la resistencia^{36,37,25}.

En el presente estudio, mutaciones específicas asociadas a resistencia a los IP se hallaron en muestras de pacientes con fallo para esos inhibidores. La mutación secundaria L63P fue hallada con más frecuencia en las muestras del Estado de Amazonas - 78,1%, para 65,1% en el Estado de Pará. En seguida, los codones secundarios más encontrados en las muestras de los dos Estados fueron 10 y 71, lo que está de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio realizado por Couto-Fernandez y colaboradores²⁷.

CONCLUSIONES

La mutación más frecuente en la clase de los ITRN fue M184V para las muestras del Estado de Pará mientras que para las del Estado de Amazonas fue T215F/Y. La mutación más frecuente para las muestras de los Estados de Amazonas y Pará fue K103N, en la clase de los ITRNN, y, entre los IP, la mutación L63P para ambos Estados. En la clase de los ITRN, se encontró un porcentaje significativo de muestras de pacientes del Estado de Pará presentando cuatro mutaciones en las posiciones 184, 41, 210 y 215, siendo que esa frecuencia era un poco menor en las muestras del Estado de Amazonas. El VIH-1 se mostró más resistente a los ARV de la clase de los ITRN, seguido de la clase de los IP y, posteriormente, a los ITRNN para las muestras de ambos Estados. Se infirió el nivel de resistencia del VIH-1 a los ARV en el gen de la TR y las muestras analizadas del Estado de Amazonas presentaron resistencia superior a 50% para ocho drogas, siendo sensibles a solamente dos. En el gen de la proteasa, se presentaron resistentes a cinco y sensibles a tres de las drogas evaluadas. Se infirió el nivel de resistencia del VIH-1 a los ARV en el gen de la TR y las muestras analizadas del Estado de Pará presentaron resistencia superior a 50% para seis drogas y sensibles a dos. En el gen de la proteasa, se mostraron resistentes a seis y sensibles a cuatro. Las muestras del Estado de Amazonas sugieren mayor resistencia a todas las clases de ARV analizados en comparación con las muestras del Estado de Pará.

AGRADECIMIENTOS

A los profesionales del Instituto Evandro Chagas: Raimundo Macêdo dos Reis, Celina Serra de Freitas por todo el apoyo técnico durante la realización de las pruebas.

Genotipagem da resistência genotípica secundária aos antirretrovirais em pacientes com aids nos Estados do Pará e Amazonas, Brasil: 2002 a 2006

RESUMO

A resistência às drogas antirretrovirais resulta da incompleta supressão da replicação do HIV-1. O presente estudo caracterizou o perfil de resistência genotípica aos antirretrovirais (ARV) em amostras sorológicas de 127 pacientes HIV positivos, originárias dos Estados do Amazonas e Pará, Região Norte do Brasil, no período de 2002 a 2006. As amostras foram submetidas ao teste de resistência pelo kit *ViroSeq™ Genotyping System*. Considerando as informações genéticas obtidas das regiões da protease e/ou transcriptase reversa do HIV-1, a mutação M184V (81,1%) foi a mais associada aos inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (ITRN), em indivíduos usando ARV no Estado do Pará, e a mutação T215F/Y (56,3%) em indivíduos do Estado do Amazonas. A mutação K103N foi a mais prevalente (33,5%) para os inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (ITRNN) em ambos os Estados. Para o gene da protease a mutação *minor* L63P (65,3%) apresentou-se como a mais frequente em ambos os Estados. O estudo revelou a importância da identificação de mutações associadas à resistência às drogas antirretrovirais para o uso racional em esquemas terapêuticos e seus resultados apresentaram-se semelhantes aos obtidos em outras regiões do Brasil.

Palavras-chave: Terapia Antirretroviral; HIV-1; Mutação; Genotipagem.

Profile of secondary genotypic resistance to antiretroviral drugs in aids patients in the States of Pará and Amazonas, Brazil: 2002 to 2006

ABSTRACT

Resistance to antiretroviral drugs results from the incomplete suppression of HIV-1 replication. The present study characterized the profile of genotypic resistance to antiretroviral drugs (ARVs) in serum samples from 127 HIV-positive patients from the States of Amazonas and Pará, in Northern Brazil, from 2002 to 2006. The samples were tested for resistance using the *ViroSeq™ Genotyping System* kit. Based on the genetic information obtained from the HIV-1 protease (PR) and/or reverse transcriptase (RT) genes, the M184V mutation (81.1%) was the most frequently associated with resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) in individuals using ARVs in Pará, while the T215F/Y mutation (56.3%) was the most frequently associated with resistance in individuals from Amazonas. The K103N mutation was the most prevalent (33.5%) resistance mutation to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in both states. For the PR gene, the *minor* mutation L63P (65.3%) was the most frequent in both states. The present study showed the importance of identifying mutations associated with resistance to ARVs to the rational selection of therapeutic schemes. Additionally, the results found in Pará and Amazonas were found to be similar to those of other areas in Brazil.

Keywords: Terapia Anti-Retroviral; VIH-1; Mutation; Genotyping.

REFERENCIAS

- 1 Kanki PJ, Hamel DJ, Sankalé JL, Hsieh C, Thior I, Barin F, et al. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis.* 1999 Jan;179(1):68-73.
- 2 Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, et al. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology.* 2000 Sep;275(1):107-15.
- 3 Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirell D, Watera C, Lyagoba F, et al. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis.* 2002 May;185(9):1244-50.
- 4 Eigen M. Viral quasispecies. *Sci Am.* 1993 Jul;269(1):42-9.
- 5 Hellerstein MK, McCune JM. T cell turnover in HIV-1 disease. *Immunity.* 1997 Nov;7(5):583-9.
- 6 Shafer RW, Winters MA, Palmer S, Merigan TC. Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. *Ann Intern Med.* 1998 Jun;128(11):906-11.
- 7 Vella S, Palmisano L. Antiretroviral therapy: state of the HAART. *Antiviral Res.* 2000 Jan;45(1):1-7.
- 8 Coffin JM. HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 1996 Jan;267(5197):483-9.
- 9 Little SJ, Daar ES, D'Aquila RT, Keiser PH, Connick E, Whitcomb JM, et al. Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. *JAMA.* 1999 Sep;282(12):1142-9.
- 10 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Recomendações para a terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
- 11 Vermund SH. Millions of life-years saved with potent antiretroviral drugs in the United States: a celebration, with challenges. *J Infect Dis.* 2006 Jul;194(1):1-5.
- 12 Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta C, Forbici F, Violin M, Bertoli A, et al. Impact of mutations conferring reduced susceptibility to lamivudine on the response to antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 2001 Sep;6(3):195-8.
- 13 Balotta C, Berlusconi A, Pan A, Violin M, Riva C, Colombo MC, et al. Prevalence of transmitted nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains and pre-existing mutations in pol reverse transcriptase and protease region: outcome after treatment in recently infected individuals. *Antivir Ther.* 2000 Mar;5(1):7-14.

- 14 Little SJ. Transmission and prevalence of HIV resistance among treatment-naïve subjects. *Antivir Ther.* 2000 Mar;5(1):33-40.
- 15 Briones C, Pérez-Olmeda M, Rodríguez C, del Romero J, Hertogs K, Soriano V. Primary genotypic and phenotypic HIV-1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001 Feb;26(2):145-50.
- 16 Duwe S, Brunn M, Altmann D, Hamouda O, Schmidt B, Walter H, et al. Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naïve patients of the German Seroconverter Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001 Mar;26(3):266-73.
- 17 Tamalet C, Fantini J, Tourres C, Yahi N. Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes. *AIDS.* 2003 Nov;17(16):2383-8.
- 18 Scott P, Arnold E, Evans B, Pozniak A, Moyle G, Shahmenesh M, et al. Surveillance of HIV antiretroviral drug resistance in treated individuals in England: 1998-2000. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Mar;53(3):469-73.
- 19 Tang JW, Pillay D. Transmission of HIV-1 drug resistance. *J Clin Virol.* 2004 May;30(1):1-10.
- 20 Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, Craig C, et al. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med.* 2008 Jul;5(7):e158.
- 21 Ross L, Lim ML, Liao Q, Wine B, Rodriguez AE, Weinberg W, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance and resistance-associated mutations in antiretroviral therapy-naïve HIV-infected individuals from 40 United States cities. *HIV Clin Trials.* 2007 Jan-Feb;8(1):1-8.
- 22 Brasil. Decreto nº 9.313, de 13 nov. 1996. Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e Doentes de AIDS. *Diário Oficial da União, Brasília, p. 1, 14 nov. 1996.*
- 23 Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS.* 2003 Jul;17(11):1675-82.
- 24 Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med.* 2004 Mar;350(10):1023-35.
- 25 Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2005. *Top HIV Med.* 2005 Oct-Nov;13(4):125-31.
- 26 Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 2007. 364 p.
- 27 Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Feb;100(1):73-8.
- 28 Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Nov;102(7):785-92.
- 29 Afani SA, Orellana RL, Duarte JP, Acevedo MW, Morales BO, Wolff RM, et al. Resistance to anti-retroviral therapy in Chilean patients with HIV-1 from 2002 to 2005. *Rev Med Chil.* 2007 Oct;135(10):1237-44.
- 30 Medeiros MS, Arruda EA, Guerrant RL, Brown C, Hammarskjöld ML, Rekosh D, Lima AA, et al. Genotype testing and antiretroviral resistance profiles from HIV-1 patients experiencing therapeutic failure in northeast Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2007 Aug;11(4):390-4.
- 31 Shen L, Peterson S, Sedaghat AR, McMahon MA, Callender M, Zhang H, et al. Dose-response curve slope sets class-specific limits on inhibitory potential of anti-HIV drugs. *Nat Med.* 2008 Jul;14(7):762-6.
- 32 Department of Health and Human Services Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents: guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. [Internet]. USA, 2009. [Cited 2010 Apr 30]. Available from: <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/Guideline-NIH-AdultandAdolescentGL-2009.pdf>.
- 33 Ceccherini-Silberstein F, Svicher V, Sing T, Artese A, Santoro MM, Forbici F, et al. Characterization and structural analysis of novel mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involved in the regulation of resistance to nonnucleoside inhibitors. *J Virol.* 2007 Oct;81(20):11507-19.
- 34 Shafer RW, Schapiro JM. Drug resistance and antiretroviral drug development. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jun;55(6):817-20.
- 35 Von Wyl V, Yerly S, Böni J, Bürgisser P, Klimkait T, Battegay M, et al. Emergence of HIV-1 drug resistance in previously untreated patients initiating combination antiretroviral treatment: a comparison of different regimen types. *Arch Intern Med.* 2007 Sep;167(16):1782-90.
- 36 Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature.* 1995 Apr;374(6522):569-71.
- 37 Mammano F, Trouplin V, Zennou V, Clavel F. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J Virol.* 2000 Sep;74(18):8524-31.

Recibido en / Recebido em / Received : 18/4/2011
Aceito en / Aceito em / Accepted : 19/8/2011