

DELECIÓN INFRECUENTE EN EL CODÓN 67 DEL GEN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA DE HIV EN FALLA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

JUAN GIRI¹, HORACIO JAUREGUI RUEDA², ALEJANDRA MONTICELLI², DANIEL A. PIROLA¹, NORMA PLANES¹

¹ Centro Diagnóstico de Virus, ² Fundación de Asistencia e Investigación en VIH/SIDA (FAIVIH/S), Buenos Aires

Resumen Presentamos un caso clínico de falla al tratamiento antirretroviral, con aparición de resistencia confirmada por genotipificación. También se muestra la evolución del patrón de mutaciones que confiere resistencia a inhibidores de proteasa y transcriptasa reversa conforme a la modificación del esquema terapéutico indicado a la paciente. Se encontró un raro patrón de resistencia a AZT, con una delección del codón 67 en el gen de la transcriptasa reversa lo que enfatiza la importancia de la genotipificación de la resistencia a antivirales por métodos de secuenciación.

Palabras clave: HIV, terapia de rescate, resistencia, genotipificación

Abstract *Novel deletion in 67 codon in HIV reverse transcriptase gene in antiretroviral treatment failure.* We present a clinical case of antiretroviral treatment failure with appearance of mutations demonstrated by genotyping. We also show the evolution of the pattern of mutations that confers resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors along with changes in the scheme of drugs indicated to the patient. A deletion was found in codon 67 of the TR gen, along with a novel resistance model to AZT pointing out the benefits of the detection of antiviral resistance by sequencing (genotyping).

Key words: HIV, salvage therapy, resistance, genotyping

La infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV), representa uno de los mayores desafíos de la medicina actual. En los últimos años, se han producido significativos progresos en los tratamientos antirretrovirales con lo que se ha logrado una disminución marcada de la morbilidad y mortalidad. Estos antirretrovirales inhiben la actividad de dos enzimas claves en la multiplicación del virus, la transcriptasa reversa (TR) y la proteasa (PR). Los beneficios de estas terapias se manifiestan tanto en la mejoría del estado inmunológico indicado por un aumento en el número de linfocitos T CD4⁺, como en la reducción de la multiplicación viral evidenciada por la disminución de la carga viral plasmática.

Sin embargo, en un importante número de casos, se producen fallas terapéuticas demostrables por progresión virológica, inmunológica o clínica. Contribuyen a este fenómeno múltiples factores como la adherencia inadecuada al tratamiento, tratamientos subóptimos, factores farmacológicos de biodisponibilidad y la resistencia a los antivirales. Se ha visto que la aparición de progenies virales con una susceptibilidad disminuida a determinados antivirales se encuentra en muchos casos asociada a la

detección de una o varias mutaciones puntuales en los genes virales que codifican para la enzima sobre la cual actúa el antiviral^{2, 3}. Ante una falla terapéutica^{4, 5} la búsqueda y detección de estas mutaciones específicas (genotipificación) así como la evaluación directa *in vitro* de la susceptibilidad a antirretrovirales (fenotipificación) para la enzima sobre la cual actúa el antiviral^{2, 3} han demostrado ser útiles para seleccionar una terapia efectiva.

En el contexto descrito se determinó la evolución del patrón de mutaciones predominante, correspondiente a la zona del genoma viral relacionada a resistencia a antivirales, en función del tiempo de tratamiento y de los esquemas terapéuticos prescritos^{6, 7}.

Caso clínico

Presentamos el caso de una mujer de 40 años infectada por el virus HIV con 15 años de evolución. Recibió numerosos esquemas antirretrovirales en diversos centros médicos con adherencia sub-óptima a los tratamientos. Presenta antecedentes de leucoplasia vellosa oral y Molluscum contagiosum. En 1995 concurre a la consulta con herpes-zoster en miembro inferior y un recuento de linfocitos T CD4⁺ de 170 células/mm³ (17%), se instauró tratamiento con zidovudina (AZT) y lamivudina (3TC). Diez meses más tarde se le agregó nelfinavir (NFV) dado que presentaba un recuento de CD4⁺ de 260 células/mm³ (17%) y una carga viral de 245 000 copias/ml (log 5.39) medida por el método NASBA (Organon Teknika Corp). A principios de 1998 la paciente sufrió un aumento en su carga viral

Recibido: 18-X-2000

Aceptado: 27-XI-2000

Dirección postal: Dra. Norma Planes, Av. Santa Fe 3942, 1425 Buenos Aires, Argentina

Fax: (54-11) 4831-8847

e-mail: cdvirus@elsitio.net

TABLA 1.— Relación entre mutaciones asociadas a resistencia presentes en cada uno de los estudios de genotipificación realizados a la paciente

Genotipo	Proteasa	Transcriptasa reversa
Marzo 1999 Genebank AF271765	L10I, M36I, I54V, A71V, V82A	M41L, K70R, K103N, Y181C, G190A, T215F, K219Q
Marzo 2000 Genebank AF271766	L10I, K20R, L63H, I84V	M41L, del 67, T69G, K70R, A98G, M184V, T215M, K219Q

TABLA 2.— Secuencias nucleotídica y aminoacidídica de HIV-1 RT entre codones 61 y 74

Codón	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
HIV-1	TTT	GCC	ATA	AAG	AAA	AAA	GAC	AGT	ACT	AAA	TGG	AGA	AAA	TTA
HXB-2	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L
Paciente 03/1999	TTT	GCC	ATA	AAG	AAA	AAA	GAC	AGT	ACT	AGA	TGG	AGA	AAA	TTA
Paciente 03/2000	F	A	I	K	K	K	D	S	T	R	W	R	K	L
	TTT	GCC	ATA	AAG	AAA	AAA	- - -	AGT	GGT	AGA	TGG	AGA	AAA	TTA
	F	A	I	K	K	K	-	S	G	R	W	R	K	L

a 750 000 copias/ml (log 5.87) con una caída en el recuento de CD4⁺ a 48 células/mm³ (7.9%), por lo que se le cambió el tratamiento a una combinación de efavirenz (EFV) más saquinavir (SQV) más nelfinavir (NFV).

A fines de 1998, con una carga viral de 830 000 copias/ml (log 5.92) (NASBA), un recuento CD4⁺ de 48 células/mm³ (8%) y con un diagnóstico de neumonía por *Pneumocystis carinii* se decidió un nuevo cambio en tratamiento a didanosina (ddl) más stavudina (d4T) más lamivudina (3TC) más hidroxiurea.

En marzo de 1999, se realizó un estudio genotípico de resistencia a antirretrovirales. Se amplificaron por RT-PCR los genes de la proteasa y de la transcriptasa reversa, a partir del RNA plasmático de HIV-1. Luego se secuenció el producto amplificado y se analizó la secuencia obtenida utilizando la cepa HIV-1 HXB-2 salvaje como referencia. Las mutaciones encontradas fueron L10I, M36I, I54V, A71V, V82A en el gen de la proteasa y M41L, K70R, K103N, Y181C, G190A, T215F, K219Q en el gen de la transcriptasa reversa. Esta secuencia se encuentra en el Genebank con el número de acceso AF271765 (Tabla 1).

Debido a que el patrón de mutaciones encontrado se asocia con resistencia a NFV, SQV e indinavir (IDV) para la proteasa, y con AZT y todos los inhibidores no nucleosídicos (EFV, DLV y NVP) para la transcriptasa reversa, se decidió agregar el inhibidor de proteasa amprenavir (APV) al esquema en curso.

Un nuevo estudio genotípico de resistencia realizado en marzo de 2000 por la persistencia de altas cargas virales demostró las siguientes mutaciones: L10I, K20R, L63H, I84V en el gen de la proteasa y M41L, del 67, T69G, K70R, A98G, M184V, T215M, K219Q. La secuencia se encuentra en el Genebank con el número de acceso AF271766 (Tabla 1).

El nuevo patrón genotípico obtenido reveló la presencia de resistencia a 3TC, AZT y llamativamente la desaparición de las mutaciones de resistencia a los inhibidores no nucleosídicos de transcriptasa reversa.

Se detectó un extraño patrón de resistencia a AZT reportado hasta la fecha sólo en una oportunidad⁸. Este consiste en la delección del codón 67 y la aparición de T69G y A98G de la TR (Tabla 2).

En mayo de 2000 y teniendo en cuenta la resistencia reportada se decidió un tratamiento de salvataje con múltiples drogas que incluyó ddl+d4T+EFV+AMP+NFV+Hidroxiurea. A un mes de su implementación se obtuvo un valor de carga viral de 78 000 copias por mililitro (Amplicor Roche) con CD4⁺ de 277 células/mm³ (23%).

Discusión

La implementación de la llamada terapia antirretroviral de alta eficiencia (HAART) permitió una significativa disminución de la morbilidad y la mortalidad de los pacientes infectados por el HIV. Sin embargo, en un creciente número de pacientes, múltiples factores dan lugar al complejo fenómeno de la falla terapéutica. En caso de deberse a resistencia a los antirretrovirales por parte de la progenie viral predominante, es necesario saber a cuales drogas es resistente dicha progenie.

Se ha demostrado la asociación de resistencia a antirretrovirales con alteraciones en la secuencia de los genes que codifican para las enzimas sobre las cuales actúan estas drogas. Sin embargo, el conocimiento de asociaciones de mutaciones con resistencia no es completo y las interacciones entre las mutaciones entre sí son poco conocidas, resultando en una actualización permanente de las asociaciones entre detección de resistencia y las mutaciones relacionadas con la misma.

En el caso en discusión puede observarse la dinámica con que la progenie predominante va cambiando en cuanto a la expresión de mutaciones de resistencia. Las cepas con mutaciones de resistencia, aun cuando estas mutaciones le confieren una ventaja adaptativa en presencia de la presión de selección impuesta por las drogas

antirretrovirales, tienen una capacidad replicativa o *fitness* disminuida respecto de la cepa salvaje cuando la droga es suprimida. Este factor explicaría la desaparición de las mutaciones de resistencia al quitarse del esquema determinadas drogas, como ocurre con las mutaciones de resistencia a inhibidores no nucleosídicos entre el primer y segundo estudio genotípico de la paciente.

Adicionalmente, al volver a incluir una determinada droga, es posible que rápidamente se produzca la aparición de progenies virales que posean mutaciones de resistencia a esa droga a partir de la subpoblación de células latentemente infectadas. El genoma del virus HIV proviral integrado en estas células codifica dichas mutaciones. Este sería el caso de la mutación M184V en la paciente, que confiere resistencia a 3TC.

El caso presenta un nuevo ejemplo de regiones génicas del HIV proclives a modificaciones de mayor magnitud como deleciones e inserciones de codones. Es de destacar la aparición de la deleción del codon 67, descrita hasta el momento sólo una vez anteriormente⁸. Tal deleción se ubica en el dominio de los "dedos" de la transcriptasa reversa, región en la que se han descrito deleciones e inserciones relacionadas con la resistencia a AZT⁹⁻¹¹. Este hallazgo enfatiza la importancia de la genotipificación de la resistencia a antivirales por métodos de secuenciación.

Por otra parte, la acumulación de mutaciones secundarias en progenies virales que ya expresan mutaciones primarias de resistencia se interpretaría como intentos evolutivos de la progenie viral predominante por mejorar su capacidad replicativa ante la presencia continuada de la presión de selección ejercida por la droga.

Agradecimientos: Agradecemos a la Dra. Luisa Sen su participación en la discusión de los resultados y los comentarios sobre el presente caso.

Bibliografía

1. Suárez C, Jahnke N, Montaner JCG. El estado actual del tratamiento de la infección por HIV. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 385-92.
2. Rodríguez Rosado R, Briones C, Soriano V. Introduction of HIV drug-resistance testing in clinical practice. *AIDS* 1999; 13: 1007-14.
3. Lorenzi P, Opravil M, the Swiss HIV Cohort Study, et al. Impact of drug resistance mutations on virologic response to salvage therapy. *AIDS* 1999; 13: F17-F21.
4. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 2195-9.
5. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, et al. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Beinr Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 2000; 14: F83-93.
6. Vandamme AM, Van Laethem K, De Clercq E. Managing resistance to anti-HIV drugs. *Drugs* 1999; 57: 337-61.
7. Cabana M, Clotet B, Martinez MA. Emergence and genetic evolution of HIV-1 variants with mutations conferring resistance to multiple reverse transcriptase and protease inhibitors. *J Med Virol* 1999; 59: 480-90.
8. Imamichi T, Sinha T, Imamichi H, et al. High-level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine due to a deletion in the reverse transcriptase gene of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 2000; 74: 1023-8.
9. De Jong JJ, Goudsmit J, Lukashov VV, et al. Insertion of two amino acids combined with changes in reverse transcriptase containing tyrosine-215 of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs. *AIDS* 1999; 13: 75-80.
10. Kim EY, Vrang L, Oberg B, et al. Anti-HIV-1 activity of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine for different multidrug-resistant mutants. VII Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, California, USA, February 2000. Abstr. 742.
11. Winters MA, Cooley KL, Girard YA, et al. A 6-Basepair insert in the reverse transcriptase gene of Human Immunodeficiency Virus Type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 1769-75.

What is truly revolutionary about molecular biology in the post-Watson-Crick era is that it has become digital ... the machine code of the genes is uncannily computer-like.

Lo que la biología molecular tiene de verdaderamente revolucionario en la era post Watson-Crick es que se ha vuelto digital ... el código de los genes tiene un extraño parecido al de las computadoras.

Richard Dawkins

River out of Eden. London: Weidenfeld & Nicolson, 1995