

## Evolución rápida de la resistencia a drogas antirretrovirales en 2 pacientes infectados por VIH-1

### Rapid development of resistance to antiretroviral drugs in two patients infected with HIV-1

Dr. Héctor Manuel Díaz Torres,<sup>1</sup> Lic. Liuber Yans Machado Zaldívar,<sup>1</sup>  
Lic. Marta Dubed Echevarría,<sup>1</sup> Dr. Liodelvio Martínez Fernández,<sup>1</sup> Lic. Nancy  
María Ruiz Gutiérrez,<sup>1</sup> Lic. Madeline Blanco de Armas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). Mayabeque, Cuba.

<sup>1</sup> Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** el empleo de la terapia antirretroviral ha facilitado la recuperación lenta y parcial del sistema inmune, lo que permite reducir las complicaciones oportunistas, incrementar la supervivencia y mejorar la calidad de vida en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.

**Objetivo:** determinar las variantes virales de evolución rápida a la resistencia a drogas antirretrovirales en pacientes positivos a VIH-1.

**Métodos:** se estudiaron 2 pacientes positivos a VIH-1; se nombraron con las letras A y B, respectivamente, y se les determinó la resistencia a drogas antirretrovirales en 2 tiempos diferentes: momento del diagnóstico y 2012. Los resultados se relacionaron con variables clínicas.

**Resultados:** el paciente A, en el momento del diagnóstico, presentó un virus subtipo BG con niveles bajos de resistencia a zidovudina y estavudina y el B, virus subtipo B, con bajos niveles de resistencia a zidovudina. En el año 2012, el paciente A mostró una variante viral FRC18\_cpx con altos niveles de resistencia a lamivudina, emtricitabina y nevirapina. El paciente B se mantuvo infectado con un virus subtipo B, pero resistente a los inhibidores de la transcriptasa inversa.

**Conclusiones:** estos resultados muestran la dinámica y rápida evolución de las variantes de VIH-1 en pacientes infectados.

**Palabras clave:** tratamiento antirretroviral, resistencia, VIH-1, drogas antirretrovirales, subtipo.

## ABSTRACT

**Introduction:** the use of antiretroviral therapy has facilitated the slow and partial recovery of the immune system, allowing to reduce opportunistic complications, to increase survival and to improve quality of life in patients infected with human immunodeficiency virus type 1.

**Objective:** to determine rapid evolving viral variants with resistance to antiretroviral drugs in HIV-1 positive patients.

**Methods:** two HIV-1 positive patients were studied. They were appointed by the letters A and B, respectively, and antiretroviral drug resistance were determined at two different times: Moment of diagnosis and 2012. Results were related to clinical variables.

**Results:** at the time of diagnosis Patient A had subtype BG virus with low levels of resistance to zidovudine and stavudine. Patient B had subtype B virus with low levels of resistance to zidovudine. In 2012, the patient A showed FRC18-cpx viral variant with high levels of resistance to lamivudine, emtricitabine, and nevirapine. Patient B remained infected with subtype B virus, but resistant to the reverse transcriptase inhibitors.

**Conclusions:** these results show the dynamic and rapidly evolving variants of HIV-1 infected patients.

**Key words:** antiretroviral therapy, resistance, HIV-1, antiretroviral drugs, subtype.

---

## INTRODUCCIÓN

El empleo de la terapia antirretroviral en los pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) ha logrado modificar la historia natural de la infección<sup>1</sup> y ha facilitado la recuperación lenta y parcial del sistema inmune, lo que permite reducir las complicaciones oportunistas en más de 50 %, incrementar significativamente la supervivencia y mejorar la calidad de vida en estos pacientes.<sup>2</sup> En la actualidad se dispone de un amplio arsenal de medicamentos que se clasifican según los sitios de acción en el ciclo de replicación viral: los inhibidores de la enzima transcriptasa inversa (ITI), los inhibidores de la proteasa viral (IP), los inhibidores de entrada del virus a la célula (IE) y los inhibidores de la integrasa (IIN).<sup>3</sup> Esta amplia variedad implica el empleo de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), que exige un tratamiento combinado con 3 o más drogas.<sup>4</sup> Sin embargo, es común el fracaso terapéutico, por la pobre adhesión a la terapia, la intolerancia a la medicación, las interacciones medicamentosas, las variaciones individuales de la farmacocinética y el desarrollo de resistencia.<sup>1,5-7</sup> La resistencia a los antirretrovirales (ARV) se considera como la causa más importante de fracaso terapéutico, ya que su aparición basal conlleva una respuesta subóptima y puede transmitirse.<sup>7,8</sup>

En el presente trabajo se describen 2 casos de individuos infectados por VIH-1 con el objetivo de determinar las variantes virales que mostraron una aparición rápida de la resistencia a los ARV.

## MÉTODOS

Se estudiaron 2 pacientes infectados por VIH-1 a quienes se les nombraron con las letras A y B, respectivamente, y se les determinó en 2 tiempos: momento del diagnóstico de VIH-1 (octubre de 2009 y mayo de 2011) y año 2012.

### Procesamiento y análisis de las muestras

Se colectaron 10 mL de sangre periférica en tubos con EDTA (0,2 M; pH 7,2), mediante punción venosa, y se separó el plasma mediante centrifugación durante 20 min a 2 000 g. El plasma se conservó a -85 °C hasta su uso.

La carga viral plasmática y el conteo de subpoblaciones linfocitarias (CD4+) se determinaron al momento del diagnóstico de la infección por VIH-1 y, posteriormente, en las consultas de seguimiento, según las pautas cubanas para la atención médica al paciente que vive con VIH/sida (Pautas cubanas para la atención médica integral a las personas que viven con VIH/sida, MINSAP).

La carga viral plasmática se determinó mediante el empleo de la tecnología *COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HIV-1 Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)*. Los resultados de la carga viral plasmática se expresaron en UI/mL.

Los valores correspondientes al conteo de subpoblaciones linfocitarias (CD4+) se obtuvieron a través de la base de datos SIDATRAT del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).<sup>9</sup>

Para determinar el subtipo de VIH-1 y la resistencia a drogas antirretrovirales se aisló el ARN viral del plasma para amplificar la región del gen *pol* de VIH-1 que codifica las enzimas proteasa y transcriptasa inversa (TI), según los procedimientos descritos por *Machado* y otros.<sup>10,11</sup> Las mutaciones asociadas a resistencia y niveles de resistencia a los ARV se determinaron según los programas disponibles en la base de datos de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>).

## RESULTADOS

En las tablas 1 y 2 se muestran los valores de carga viral plasmática de VIH-1 y el conteo de células CD4+ de los pacientes A y B, respectivamente.

**Tabla 1.** Valores de carga viral plasmática de VIH-1 y conteo de células CD4+ del paciente A durante el tiempo de estudio

Fecha	Carga viral (UI/mL)	Conteo de células CD4+ cél/mm <sup>3</sup>	%
27/10/2009	872 100	No realizado	-
23/03/2010	2 057 000	134	6
Abril 2010 comienza la TARGA			
11/05/2010	1 191 700	No realizado	-
08/06/2011	17 241	266	11
31/07/2012	219 300	140	8

**Tabla 2.** Valores de carga viral plasmática de VIH-1 y conteo de células CD4+ del paciente B durante el tiempo de estudio

Fecha	Carga viral (UI/mL)	Conteo de células CD4+ cél/mm <sup>3</sup>	%
05/07/2011	6 358	441	14
31/01/2012	24 990	776	26
12/06/2012	No realizado	778	26
01/11/2012	No realizado	933	26

### Subtipo viral y resistencia a los ARV

#### *Paciente A*

Según los valores de la carga viral plasmática y el conteo de CD4+ después de transcurridos 5 meses del diagnóstico de la infección por VIH-1 (23/3/2010), el paciente A fue clasificado, clínicamente, como A3 (sida), por lo que se procedió a estudiar la resistencia genotípica con el objetivo de comenzar la TARGA. La variante genética del VIH-1 circulante en el paciente en el momento del estudio fue la forma recombinante circulante (FRC) 23-BG. El estudio de resistencia genotípica detectó en la región del gen *pol* que codifica para la enzima transcriptasa inversa (TI) la mutación D67N, la cual se asocia a bajos niveles de resistencia a zidovudina (AZT) y estavudina (D4T). Por el índice de susceptibilidad genotípica (ISG) a las diferentes combinaciones empleadas como primera línea terapéutica en Cuba decidimos aplicarle la combinación lamivudina (3TC), AZT y nevirapina (NVP).

Por los criterios de fallo terapéutico, según parámetros clínicos, inmunológicos y virológicos, se realizó otro estudio de resistencia genotípica en el año 2012. La variante genética del VIH-1 circulante en el paciente en el momento del segundo estudio fue una FRC 18-cpx y se detectaron las mutaciones M184V, asociadas a altos niveles de resistencia a 3TC y emtricitabina (FTC) y G190A, asociada a altos niveles a NVP en la región del gen *pol* de la enzima TI.

#### *Paciente B*

El paciente B, clínicamente, clasificó como A2 (asintomático). El estudio de resistencia genotípica realizado al momento del diagnóstico, como parte de la vigilancia de la resistencia transmitida, detectó la presencia del subtipo B con la mutación K219Q, la cual está asociada a bajos niveles de resistencia a AZT. Se le realizó otro estudio de resistencia genotípica en el año 2012 por el interés de incluirlo en un ensayo de vacuna terapéutica. Los resultados demostraron la presencia de una variante viral perteneciente al subtipo B, con las mutaciones K101E, M184V, G190A, M230L en la región del gen *pol* que codifica para la enzima TI, las cuales se asocian con altos niveles de resistencia a 3TC, FTC, efavirenz (EFV) y NVP, resistencia intermedia a abacavir (ABC), AZT, etravirina (ETR) y rilpivarina (RPV) y bajos niveles de resistencia a didanosina (DDI).

### Consideraciones éticas

Los procedimientos se llevaron a cabo según los estándares éticos válidos para el Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba y el Ministerio de Ciencia

Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), que contempla los principios enunciados en la declaración de Helsinki, para las investigaciones médicas en seres humanos. Previo a la toma de muestra, se tomó el consentimiento informado de ambos pacientes.

## DISCUSIÓN

En el año 2001, Cuba comenzó a producir 7 drogas antirretrovirales genéricas para el tratamiento de los pacientes infectados con el VIH-1, entre las cuales se incluyen los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN): 3TC, zalcitabina (DDC), DDI, D4T y AZT; la NVP como inhibidor de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN) y el indinavir (IDV) como IP. La introducción de la TARGA contribuyó a la disminución de casos clasificados como sida y de la mortalidad por dicha enfermedad.<sup>12</sup> Al cierre del año 2012, 17 624 casos de seropositivos al VIH-1 se habían diagnosticado en Cuba, donde 7 542 habían evolucionado a sida. Hasta el año 2012, 8 102 personas (55,3 %) se habían beneficiado con la TARGA (Registro informatizado, MINSAP). Las combinaciones de drogas más empleadas en el primer régimen terapéutico son: AZT+3TC+NVP (~50 %) y D4T+3TC+NVP (~20 %).<sup>13</sup> Sin embargo, el fracaso del tratamiento por la selección de variantes virales resistentes a los medicamentos y la capacidad de transmisión a otros individuos constituye una de las limitaciones del empleo de la TARGA. Las opciones limitadas para la sustitución de ARV en caso de fallo terapéutico, así como el difícil acceso a los ensayos de carga viral y las pruebas de resistencia en caso de fallo virológico, conlleva un uso subóptimo y prologando de la TARGA y un incremento del riesgo de desarrollo de resistencia a los ARV.<sup>14</sup> En nuestro estudio, el paciente B no presentó resultados de carga viral en 2 momentos diferentes, aspecto que dificultaría el análisis de la evolución de la infección y la efectividad de la TARGA en caso de que sea necesaria.

Estudios previos han referido una alta diversidad genética del VIH-1 en Cuba.<sup>10,15-18</sup> Los estudios realizados al paciente A detectaron, en un inicio, la variante FRC 23-BG y, posteriormente, la FRC 18-cpx con mutaciones asociadas a resistencia. Diversos autores han descrito la circulación de estas variantes genéticas en la población seropositiva cubana.<sup>10,17,18</sup> Sin embargo, es notable el cambio de la variante viral después del comienzo de la TARGA. Se ha descrito, que en un individuo pueden coexistir diversas cuasiespecies del VIH<sup>18</sup> y que la presión ejercida por los ARV y la pobre adhesión al tratamiento, entre otros aspectos, pueden favorecer la emergencia de variantes resistentes. La presencia del polimorfismo D67N en el virus presente en el paciente A, es una evidencia de la transmisión de mutaciones asociadas a la resistencia a los ARV. No obstante, a pesar de presentar bajos niveles de resistencia a AZT y D4T, se le indicó el comienzo de la terapia con la combinación: 3TC+AZT+NVP. En un estudio de la resistencia a los ARV realizado posteriormente, por indicios de fallo terapéutico, se detectó la presencia de mutaciones asociadas a altos niveles de resistencia a 2 de los fármacos empleados en la combinación prescrita: 3TC y NVP. En un estudio de resistencia a los ARV realizado a un grupo de pacientes cubanos con fallo a la terapia se encontraron altos niveles de resistencia a los ITIAN e ITINAN, donde las mutaciones M184V (33,8 %) y G190A (7,0 %) fueron detectadas en los pacientes que recibían la primera línea terapéutica.<sup>18</sup>

El paciente B presentó el subtipo B de VIH-1 en ambos estudios, forma genética predominante en la epidemia cubana.<sup>10,15-18</sup> La presencia de la mutación K219Q en la región que codifica para la TI en el primer estudio, evidencia la adquisición en el momento de la infección de una variante viral con dicho cambio en el genoma, el cual se asocia a bajos niveles de resistencia a AZT. Sin embargo, es sorprendente

la amplia gama de mutaciones detectadas en un estudio posterior, las cuales se asocian con niveles altos, intermedios y bajos de resistencia a diferentes ITIAN e ITINAN. Es importante referir que el paciente B no se encontraba bajo la presión de la TARGA y que dichos cambios pueden deberse a la posible reinfección con una variante viral con mutaciones asociadas a la resistencia, sin dejar de tener en cuenta una serie de factores virales que pueden conllevar la proliferación de variantes del VIH-1 resistentes a los ARV, como: la carencia en la TI de la actividad exonucleasa 3´-5´ correctora de errores, la alta tasa replicativa del VIH-1 y la presencia de cuasiespecies en un mismo individuo.<sup>19</sup>

En conclusión, los resultados alcanzados demuestran la dinámica de la replicación viral y la rápida evolución de las variantes de VIH-1 en pacientes infectados, lo que hace más complejo el tratamiento antirretroviral en las personas que viven con VIH/sida. Combinaciones terapéuticas más óptimas mediante el uso de fármacos con una eficacia superior y alta barrera genética a la aparición de mutaciones asociadas a la resistencia, permitiría un uso adecuado de los recursos disponibles. Estudios de este tipo posibilitarían al personal médico asistencial la decisión de emplear mejores opciones al comenzar el tratamiento, lo que se traduce en beneficio para el paciente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila T, et al. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adults Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1: Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *CID*. 2003;37:113-28.
2. Ceccherini-Silberstein F, Svicher V, Sing T, Artese A, Santoro M, 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;81(20):11507-19.
3. Kuritzkes DR, Walker BD. HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations and Treatment. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields' Virology*. 5th ed. USA. Lippincott: Williams & Wilkins; 2007. p. 2188-206.
4. Carpenter CC, Cooper DA, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Hammer SM, et al. Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA*. 2000 19 Jan;283(3):381-90.
5. 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;353:2195-9.
6. Richman D. Benefits and limitations of testing for resistance to HIV drugs. *JAC*. 2004;53(4):555-7.
7. Sens S, Tripathy SP, Paranjape RS. Antiretroviral drug resistance testing. *J Postgrad Med*. 2006;52:187-93.
8. Domingo E, Mas A, Menéndez AL. Variabilidad genética del VIH-1. En: Vázquez S, González Lahoz J. *Manual del SIDA*. 3a ed. Madrid: Editorial IDEPSA; 1999. p. 41-58.

9. Aragonés C, Campos JR, Pérez D, Martínez A, Pérez J. SIDATRAT: Informatics to improve HIV/AIDS care. *MEDICC Review*. 2012 Oct.; 14(4):5-9.
10. Machado LY, Blanco M, Dubed M, Díaz HM, Ruiz NM, Valdés N, et al. HIV type 1 genetic diversity in newly diagnosed Cuban patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012; 28(8): 956-60.
11. Machado LY, Dubed M, Díaz H, Ruiz N, Romay D, Valdés N, et al. Transmitted HIV type 1 drug resistance in newly diagnosed Cuban patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013; 29(2): 411-4.
12. Gorry C. Cuba's National HIV/AIDS Program. *MEDICC Review*. 2011; 13(4):5-8.
13. Pérez J, Pérez D, González I, Díaz Jidy M, Orta M, Aragonés C, et al. Approaches to the management of HIV-AIDS in Cuba: case study. Perspectives and practice in antiretroviral treatment. Geneva: WHO, Library Cataloguing-in-Publication Data; 2004. p.1-19.
14. Gupta RK, Hill A, Sawyer AW, Cozzi-Lepri A, von Wyl V, Yerly S, et al. Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009; 9(7): 409-17.
15. Rolo F, Miranda L, Wainberg M, Gu Z, Lobaina L, Noa E, et al. Envelope V3 Region Sequences of Cuban HIV-1 Isolates. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes Human Retrovirology*. 1995; 9: 123-5.
16. Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Díaz H, Delgado E, Parga EV, et al. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS*. 2002; 16: 1643-53.
17. Pérez L, Thomson M, Aragonés C, González Z, Pérez J, Casado G, et al. HIV Type 1 Molecular Epidemiology in Cuba: High Genetic Diversity, Frequent Mosaicism, and Recent Expansion of BG Intersubtype Recombinant Forms. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; 22(8): 724-33.
18. Kourí V, Alemán Y, Pérez L, Pérez J, Fonseca C, Correa C, et al. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. *J Clin Virology*. 2012; 55: 348-55.
19. Shafer RW. Genotypic Testing for HIV-1. Drug Resistance. 2004. [cited 2013 Jul. 29]. Available from: <http://hivinsite.ucsf.edu>

Recibido: 5 de septiembre de 2013.

Aprobado: 22 de octubre de 2013.

Dr. *Héctor Manuel Díaz Torres*. Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). Carretera Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32700. [hectorm@infomed.sld.cu](mailto:hectorm@infomed.sld.cu)