

Determinació i valoració de les resistències en el tractament antiretroviral

L. RUIZ

INTRODUCCIÓ

El principal objectiu de la teràpia antiretroviral en la infecció causada pel virus de la immunodeficiència humana (HIV-1) és blocar la replicació d'aquest virus. Tanmateix, aquest objectiu no sempre s'aconsegueix en tots els pacients, especialment en els tractats prèviament amb règims terapèutics subòptims incapaços d'inhibir la replicació viral. La supressió incompleta de la replicació del virus promou la generació de variants virals amb mutacions que ofereixen resistències a diferents fàrmacs.

El desenvolupament de resistències és en part conseqüència de l'alta dinàmica de replicació de l'HIV durant tot el procés de la malaltia. Els virus, així com d'altres microorganismes, necessiten adaptar-se al medi mitjançant l'adquisició de diversos mecanismes. Aquesta adaptació té com a conseqüència l'alta diversitat genètica de la població viral que té un individu infectat per l'HIV-1. A més, els virus RNA no tenen els mecanismes correctors de les DNA polimerases que preserven la composició genètica dels organismes de DNA de doble cadena. Per tant, els virus RNA de nova generació difereixen del virió parenteral en una mitjana d'un nucleòtid.

L'aplicació de models matemàtics suggereix que una mutació puntual pot ocórrer fins a 10.000 vegades al dia en els individus infectats per l'HIV. Alguns estudis han mostrat diferències de més del 25% entre les variants virals en un mateix pacient ("quasiespècies"). Quan algunes mutacions es produeixen en punts crítics del genoma, poden afectar aspectes importants del comportament del virus, com la seva virulència, capacitat replicativa, citotoxicitat i/o resposta a la teràpia antiretroviral. Perquè es produeixi resistència a un agent antiretroviral que inhibeix l'activitat d'un determinat enzim viral (retrotranscriptasa, proteasa, etc.), aquest, en presència de l'inhibidor, s'ha de modificar sense perdre la seva funció. Les mutacions puntuals poden afectar la capacitat de l'enzim per seleccionar o no un determinat substrat. Però també moltes de les mutacions que es produeixen durant la dinàmica de replicació intrínseca del virus, sense o amb pressió selectiva, poden considerar-se com a "neutres", és a dir, que no afecten la capacitat replicativa del virus, o bé ser defectives, que afecten parcial o completament la replicació viral. Les mutacions es poden classificar en: primàries i secundàries. Les mutacions primàries apareixen generalment en les etapes inicials del desenvolupament de resistències, i comunament estan relacionades de manera específica amb el fàrmac que les selecciona. Les mutacions secundàries, en canvi, s'acumulen en el genoma viral quan ja han aparegut una o més mutacions primàries. Les mutacions secundàries per si mateixes tenen un mínim o cap efecte en la magnitud de les resistències, encara que en general milloren la capacitat replicativa del virus quan estan en conjunció amb les mutacions primàries.

S'han detectat mutacions que ofereixen resistències a un inhibidor sense exposició prèvia a la teràpia.

La pressió selectiva de la teràpia antiretroviral proporciona als virus mutants un avantatge en la seva capacitat replicativa enfront d'altres virus, això els permet arribar a constituir la quasiespècie dominant. Amb alguns fàrmacs pot ocórrer extremadament de pressa. Per exemple, una substitució completa del virus *wild type* per una variant mutant pot ocórrer en 14 dies després d'iniciar una teràpia amb nevirapina. Amb alguns antiretrovirals, com la lamivudina o nevirapina, l'aparició d'una única mutació pot conferir un alt nivell de resistència. Tanmateix, altres fàrmacs, com la

zidovudina o certs inhibidors de la proteasa viral, requereixen l'acumulació de tres o més mutacions per adquirir un elevat nivell de resistències.

L'aparició de mutants resistents és un procés dinàmic on diverses variants coexisteixen en un mateix individu. Els virus mutants poden representar la quasiespècie poc dominant o, per contra, una espècie poc dominant després que falti la pressió selectiva del fàrmac. El primer cas indicaria que alguns dels virus mutants tenen una capacitat replicativa similar als virus *wild type*, mentre que el segon indicaria que la capacitat replicativa de la variant mutant és inferior respecte a la *wild type* i només mostraria un avantatge replicatiu sota la pressió del fàrmac

Per al òptim seguiment clínic dels pacients, una apreciació inicial de fracàs terapèutic pot realitzar-se quantificant la concentració de virus RNA en plasma. La determinació de resistències a diferents antiretrovirals pot ser utilitzada per correlacionar el fracàs terapèutic amb el desenvolupament de resistències.

Les resistències poden estudiar-se a nivell genotípic, mitjançant l'anàlisi de mutacions que confereixen resistències a diferents fàrmacs, o bé a nivell fenotípic, mitjançant la determinació de la sensibilitat del virus a diferents fàrmacs.

Tant els assajos genotípics com els fenotípics tenen els seus avantatges i els seus desavantatges. Encara que els assajos genotípics són més ràpids, menys laboriosos i més barats que els fenotípics, encara presenta resultats genotípics per predir la resposta terapèutica en el pacient. Les principals raons d'aquestes limitacions són:

- Barreges de virus de diferents variants virals que no es detecten.
- Desconeixement de mutacions que ofereixen resistències a diferents inhibidors.
- Desconeixement de l'efecte de les resistències creuades.
- Resposta variable dels pacients a un fàrmac.

Les tècniques genotípiques es caracteritzen, en principi, per la seva elevada sensibilitat pel fet que l'obtenció d'una seqüència òptima de la regió amplificada proporciona una anàlisi comprensible de totes les muta-

cions relacionades amb resistències. Tanmateix, tant les tècniques genotípiques com les fenotípiques poden ser menys sensibles quan la proporció d'una espècie viral en un individu infectat es troba en minoria. En general, el valor predictiu dels assajos genotípics en la resposta terapèutica necessita definir-se millor mitjançant la realització d'estudis amplis enfocats a l'anàlisi de la importància de les resistències genotípiques. En general, existeix una bona correlació entre les mutacions detectades al laboratori mitjançant experiments de selecció i aquelles aïllades en mostres de pacients que han fracassat al tractament. Tanmateix, s'han observat *in vitro* mutacions que no es troben en aïllats clínics, com per exemple, la mutació V75T seleccionada en laboratori sota la pressió selectiva de l'estavadina, o la mutació P236L seleccionada amb delavirdina. És important remarcar que encara que l'origen molecular de les resistències és el desenvolupament de mutacions en el genoma de l'HIV (tècniques genotípiques), el càlcul de la disminució de la sensibilitat del virus enfront de diferents fàrmacs es realitza mitjançant tècniques fenotípiques.

Els mètodes utilitzats per analitzar les resistències fenotípiques quantifiquen el grau de resistència viral o la sensibilitat a un fàrmac específic. Els assajos fenotípics poden també determinar la influència de múltiples mutacions que es troben en el genoma de l'HIV-1, però el paper que tenen les mutacions puntuals queda emmascarada per aquests assajos.

L'aparició de resistències, s'ha associat a fracàs terapèutic. Segons alguns estudis el fracàs terapèutic no sempre es deu a l'aparició de resistències. Així doncs, l'absència de resistències no necessàriament prediu una bona resposta clínica. El tipus de fàrmac utilitzat, la prèvia exposició a aquest fàrmac, la possibilitat d'aparició de resistències creuades, la no adhesió al tractament, les alteracions en el metabolisme intracel·lular i la farmacocinètica del fàrmac en els diferents compartiments de l'organisme tenen una influència molt important en la resposta terapèutica.

En resum, les tècniques que analitzen les resistències, estan adquirint cada vegada un paper més rellevant en els assajos clínics en què s'inclouen diferents règims terapèutics. Quan es disposi de més fàrmacs i més opcions terapèutiques, els assajos de sensibilitat a diferents antire-

trovirals podran tenir un important paper en el maneig terapèutic de la infecció per l'HIV-1. Actualment, s'hauria d'estudiar la utilitat dels assajos genotípics i fenotípics mitjançant:

- Anàlisis retrospectives, correlacionant el fenotip i el genotip amb la resposta virològica.
- Estudis prospectius del valor que proporcionen els assajos de resistències genotípics i fenotípics en el tractament antiretroviral.
- Estudis epidemiològics d'ambdós assajos en el tractament de persones sense prèvia experiència als antiretrovirals amb infecció aguda o recent seroconversió, per estimar la probabilitat de possibles resistències pre-existents.

TÈCNIQUES D'ESTUDI

Tècniques genotípiques

Les tècniques genotípiques s'utilitzen per determinar qualsevol mutació en el genoma de l'HIV, com a resultat d'un canvi en la seqüència de les proteïnes virals (per exemple, RT o proteasa). La majoria de les tècniques actuals utilitzen inicialment l'amplificació del genoma del virus mitjançant PCR (*polymerase chain reaction*). La PCR consisteix en l'amplificació de l'RNA o el DNA per així obtenir una gran quantitat de material, fet que permetrà prosseguir amb els posteriors passos de les tècniques.

Les tècniques genotípiques utilitzades per destacar mutacions associades amb resistència a fàrmacs inclouen diversos processos.

Seqüenciació del DNA

La seqüenciació del DNA proporciona informació de tots els nucleòtids de la regió seqüenciada.

Seqüenciació clínica mitjançant dideoxinucleòtids

La seqüenciació del DNA utilitzant equips automàtics és àmpliament emprada per a la determinació de resistències. Es basa en la detecció de fluorescència de cadenes de DNA marcades en els extrems 3'-OH amb dideoxinucleòtids biotinilats i seqüenciades mitjançant tècniques d'electroforesi. Els productes seqüenciats es detecten utilitzant encebadors o dideoxinucleòtids marcats durant la síntesi de la cadena de DNA.

Afimetrix

Aquest mètode es basa en la hibridació de fragments petits d'RNA obtinguts per PCR i transcripció *in vitro*. Els fragments marcats amb biotina hibriden en una microplaca (xip) en la qual estan units una gran col·lecció d'oligonucleòtids solapats, que permeten la identificació del nucleòtid present a cada posició. Aquest mètode permet processar un elevat nombre de mostres i és ràpid. Estudis on s'analitzen resultats obtinguts per aquest mètode i pels de la seqüenciació automàtica demostren que ambdues tècniques són comparables. No obstant això, aquest mètode no està dissenyat per identificar barreges de poblacions virals.

Detecció de mutacions puntuals

Amplificació per PCR mitjançant l'ús d'encebadors específics o PCR selectiva

Aquesta tècnica s'utilitza una vegada es tenen ben identificats els codons que confereixen resistència a un fàrmac específic. Consisteix en el disseny d'encebadors (*primers*) que hibriden específicament en l'extrem 3'-OH de les formes *wild type* o mutant d'aquests codons durant la PCR. Aquest procediment permet l'anàlisi d'un ampli nombre de mostres de pacients rebent teràpia. Tanmateix, aquesta tècnica és limitada quant que no pot analitzar al mateix temps diversos codons que tenen la possibilitat de mutar i oferir resistències múltiples a un o diferents fàrmacs. A més, no

pot quantificar les proporcions que poden existir de variants *wild type* o mutant si és que ambdues hi són presents.

Determinació de seqüències del genoma individuals d'una població viral

El material amplificat per PCR es sotmet a clonatge molecular generalment en *Escherichia coli*. Com a vectors poden emprar-se els pGEM amb *polilinkers* de diferent composició de dianes de restricció. Poden clonar-se DNAs amplificats després d'adequar els seus extrems (roms o adhesius) per a la seva unió al vector. Generalment, es sol sotmetre a anàlisi de 15 a 20 clons per a l'avaluació de la població viral que alberga un pacient infectat. Aquest mètode està indicat per a l'estudi de poblacions minoritàries virals.

Hibridació diferencial (Point mutation assay)

Aquest mètode, adaptat a l'HIV per Kaye i col·laboradors, es basa essencialment en l'extensió d'un iniciador o encebador unit a un suport sòlid. En les reaccions d'extensió, un dideoxinucleòtid marcat amb S o biotina s'uneix a la cadena de DNA que s'està sintetitzant en l'extrem 3'-OH enfront del nucleòtid que pot o no conferir resistència a un fàrmac específic. La informació semiquantitativa s'obté mesurant la quantitat de fluorescència o radiació emesa pels genotips *wild type* o mutants.

Aquestes tècniques d'hibridació utilitzant sondes marcades amb isòtops radioactius es van començar a realitzar l'any 1995 i permeten quantificar variants virals *wild type* o mutants en mostres de plasma. Actualment aquests mètodes han millorat considerablement, ja que han introduït tècniques de marcatge no radioactiu utilitzant reactius, com la biotina i la fosfatasa alcalina, que permeten detectar i quantificar els productes de PCR colorimètrica o quimioluminiscentment en microplaques. A diferència dels mètodes inicials, que no poden quantificar petites quantitats de virus mutants, els actuals permeten l'anàlisi de mostres on existeixen poblacions minoritàries d'espècies virals en un mateix individu.

Assaig LIPA HIV-1 RT

El test LIPA HIV-1 RT consisteix en un principi d'hibridació inversa. Primer, el gen de la transcriptasa inversa ha de ser amplificat a partir de plasmies o cèl·lules mononuclears de sang perifèrica del pacient. El DNA, que ha estat prèviament marcat amb biotina, hibrida amb sondes específiques immobilitzades en una membrana de nitrocel·lulosa. Després de la hibridació, s'hi afegeix estreptoavidina i fosfatasa alcalina que s'unirà al complex DNA+sonda. La incubació amb un compost cromògen dóna pas a un precipitat de color púrpura. Aquest mètode permet la detecció de múltiples mutacions associades amb resistències a antiretrovirals que inhibeixen la transcriptasa inversa, utilitzats en el tractament de la infecció per l'HIV-1. Aquesta tècnica és una eina idònia per a l'anàlisi ràpida de mutacions preexistents en pacients sense experiència prèvia al tractament antiretroviral. A més, l'assaig LIPA mostra una gran sensibilitat per a la detecció, en algunes mostres, d'espècies minoritàries en una població viral. No obstant això, en d'altres mostres la presència de polimorfismes pot interferir en la hibridació i no proporcionar resultats.

Tècniques fenotípiques

Mètode de sensibilitat del virus

en les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica

El mètode clàssic per a la determinació de la sensibilitat del virus a un determinat fàrmac està basat en les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica, a partir de les quals es valoren les resistències de la població proviral. Les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica del pacient són cultivades amb cèl·lules de donant sa i seronegatiu per l'HIV per així obtenir la població viral que té el pacient, que a la vegada utilitzaran ulteriorment per a l'assaig de sensibilitat.

La sensibilitat a un fàrmac es determina afegint a cèl·lules de donant una concentració estàndard de virus obtinguts prèviament en presència de concentracions creixents del fàrmac. La producció de virus en presèn-

cia de les diferents concentracions de fàrmac es mesura quantificant la producció d'antigen p24 o l'activitat de la transcriptasa inversa.

Finalment, aquest mètode calcula la concentració inhibidora 50 (CI_{50}) del virus, que és la concentració de fàrmac que redueix en un 50% la replicació del virus en cultiu.

Existeix una gran heterogeneïtat en els valors CI_{50} enfront de diferents fàrmacs i entre les diferents soques virals. A més, els valors obtinguts pels diversos mètodes poden ser diferents i, per tant, no haurien de comparar-se.

Aquesta tècnica permet la determinació de resistències de la població proviral d'un pacient en un entorn natural (cèl·lules del propi pacient). Aquest assaig pot ser de gran utilitat en pacients que han rebut prèviament teràpia antiretroviral i alberguen virus resistents que desapareixen del plasma, però segueixen mantenint-se integrats en les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica. Si aquests virus són alliberats del compartiment residual cel·lular podrien repercutir en la resposta terapèutica quan un dels fàrmacs utilitzats prèviament fos administrat de nou.

Un dels desavantatges d'aquest mètode és que és molt laboriós en l'obtenció de la població viral de l'individu infectat. Així mateix, durant la generació de la població viral, algunes variants víriques poden ser seleccionades i, per tant, la població viral final no necessàriament representaria la completa població proviral del pacient.

Tècnica de virus recombinants

Aquest mètode es basa en la generació de virus recombinants que introdueixen una regió o gen del pacient mitjançant recombinació homòloga en un clon que no té el gen que s'ha amplificat del pacient. Aquestes regions genòmiques o gens poden aïllar-se a partir de plasma o cèl·lules mononucleades de sang perifèrica del pacient. L'anàlisi de sensibilitat es pot realitzar mitjançant assajos de reducció de plaques o assajos de detecció de mort cel·lular. Aquest últim assaig mesura la capacitat d'un virus a induir la mort cel·lular. Les cèl·lules que sobreviuen a la infecció per l'HIV converteixen el reactiu 3-(4,4 dimethylthiasol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide en un producte de color blau (formazan). La quantitat de

formazan produït estarà correlacionat amb el nombre de cèl·lules que queden protegides de la infecció del virus pel fàrmac contra la infecció del virus. La quantitat de formazan pot mesurar-se espectrofotomètricament. Aquest procés en combinació amb la possibilitat de realitzar aquest assaig en una microplaca permet avaluar un nombre considerable de mostres.

Aquest mètode, actualment conegut amb el nom d'antivirograma, ha estat comercialitzat per la casa Virco amb un cost aproximat de 1000 dòlars. Els resultats es poden obtenir en 3 setmanes, encara que en un futur pròxim s'espera reduir el temps de realització a 12 dies. Aquest antivirograma permet conèixer la sensibilitat a antiretrovirals que bloquen l'activitat enzimàtica de la transcriptasa inversa i la proteasa, incloent-hi abacavir.

Generalment, es poden obtenir resultats en la majoria de mostres de plasma amb un nombre superior a 1000 còpies d'RNA del virus. Tanmateix, l'anàlisi de resistències és difícil d'obtenir quan els valors de la càrrega viral són inferiors a aquest nombre. Amb els mètodes actuals, es pot obtenir informació sobre la seqüència d'una regió o d'un gen determinat, si les variants virals representen almenys el 20% a 25% del producte amplificat.

Altres mètodes fenotípics en fase d'investigació

Cèl·lules transfectades amb vectors que contenen gens marcadors

Els gens marcadors inclosos dins de vectors poden ser de diferent naturalesa i estan sota el control de la regió LTR de l'HIV. Quan es produeix la infecció d'aquestes cèl·lules, la proteïna Tat transactiva l'LTR i "il·lumina" el gen indicador. Entre els marcadors més utilitzats hi ha:

- El gen de la beta-galactosidasa (*lacZ*): la seva activació tenyeix les cèl·lules de blau i pot quantificar-se mitjançant lectura en microscòpia òptica o mitjançant un test d'ELISA per a beta-gal.
- El gen de la luciferasa: la seva activació provoca la síntesi d'un enzim que permet una reacció que genera fotons i que es mesura per luminiscència.

- El gen de la proteïna verda: la seva activació sintetitza una proteïna fluorescent detectable per citometria de flux.

IMPORTÀNCIA DE LA DETERMINACIÓ DE RESISTÈNCIES EN LA PRÀCTICA CLÍNICA

Funció de les resistències en la selecció inicial d'una determinada teràpia antiretroviral

Com s'ha comentat anteriorment, la presència de mutacions que confereixen resistències a antivirals en pacients sense experiència prèvia, pot afectar a la seva eficàcia per inhibir la replicació viral. La transmissió de soques resistents a la zidovudina va ser descrita inicialment l'any 1992. Des d'aleshores, són diversos els estudis que han descrit la transmissió de variants mutants resistents a altres fàrmacs.

És important conèixer quina és la prevalença actual de soques mutants, principalment en pacients que s'han infectat recentment per l'HIV, en dones embarassades i en els nens nascuts d'aquestes mares.

Segons les actuals recomanacions, la realització rutinària de tècniques de resistències estaria justificada en cas que es produeixi un increment en la prevalença de mutacions resistents en qualsevol de les poblacions anteriorment comentades.

Així mateix, la realització del test de resistències genotípiques i fenotípiques abans d'iniciar una teràpia antiretroviral en pacients no tractats prèviament no està recomanada en la pràctica rutinària. En principi, la decisió d'iniciar un tractament determinat estaria basada en el valor de la càrrega viral en plasma, el recompte de limfòcits CD4 i l'estat clínic que presenti el pacient.

Quant al personal sanitari que per accident s'ha exposat al virus, s'hauria d'iniciar tractament antiretroviral immediatament després de l'exposició al dit virus, essent recomanable realitzar el test de detecció de resistències a la mostra font del possible contagi del personal sanitari.

Utilització dels tests de resistències en la decisió d'un canvi de teràpia antiretroviral

Existeixen estudis que demostren l'existència d'una correlació entre fracàs terapèutic i aparició de soques resistents. Tanmateix, no sempre és fàcil establir aquesta correlació. La presència de variants virals, predominantment *wild type*, en pacients que han fracassat al tractament fa difícil considerar els tests de resistències com a paràmetres òptims, a més de la càrrega viral i el recompte de limfocits CD4, per al maneig clínic del pacient HIV.

No obstant això, ha de considerar-se que la falta de sensibilitat d'aquestes tècniques pot estar emmascarant la presència minoritària de soques mutants que ofereixen resistències a diversos fàrmacs.

Com s'ha comentat anteriorment, l'aparició de resistències no és la única causa de fracàs terapèutic. Actualment, la càrrega viral és el marcador més adequat per decidir si és o no necessari el canvi de tractament. Tanmateix, quan s'han descartat altres factors relacionats amb fracàs terapèutic diferents a l'aparició de resistències, els tests genotípics i fenotípics poden aportar informació addicional que ajudi al clínic a controlar un pacient

Així doncs, la presència de mutacions relacionades amb resistències, en pacients que reben tractament antiretroviral i fracassen a aquest tractament, indicaria que aquest fàrmac no és suficientment actiu com per a blocar la replicació de l'HIV.

Els tests que permeten detectar resistències, tant genotípiques com fenotípiques, són de gran utilitat per avaluar els nous fàrmacs antiretrovirals, així com per al disseny de teràpies de rescat en aquells individus que són portadors de virus mutants.

Per últim, ha de tenir-se en compte que l'absència de resistències genotípiques o fenotípiques no sempre prediu una bona resposta a la teràpia.