Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a Rilpivirina (RPV) en muestras clínicas en Argentina

12 min.

La Rilpivirina es un NNRTI (inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa) de segunda generación que está indicado en combinación con otros agentes antirretrovirales para el tratamiento de la infección por VIH en pacientes adultos. En el siguiente trabajo Laboratorio MANLAB nos muestra la prevalencia de mutaciones de resistencia a NNRTI en pacientes infectados por VIH-1 incluyendo población sin historia previa de tratamiento antiretroviral, con tratamiento previo con NNRTIs de primera generación y en individuos con fracaso terapéutico.

García, María Gabriela[1]
García Di Marco, María Florencia[2]
Pirola, Daniel Alberto[3]

Area de Infectología Molecular
Laboratorio MANLAB
Buenos Aires. Argentina

Bióloga. Gerencia de Infectología molecular y Filiaciones. Laboratorio MANLAB.
[2] Bioquímica. Infectología molecular y Filiaciones. Laboratorio MANLAB.
[3] Bioquímico. Asesor de Infectología. Laboratorio MANLAB.

E-mail: gabriela.garcia@manlab.com.ar

Resumen

La Rilpivirina (RPV) es un NNRTI (inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa) de segunda generación que se administra en combinación con otros antirretrovirales. Se han reportado mutaciones asociadas a resistencia (RAM) a RPV: L100I, K101E/P, E138A/G/K/Q/R, V179L, Y181C/I/V, Y188L, G190A/S/E, H221Y, F227C y M230I/L. La prevalencia de RMA fue analizada en 400 muestras clínicas por técnicas de secuenciación poblacional. Los resultados mostraron que 31 poseían mutaciones asociadas a alto nivel de resistencia, 46 a moderado nivel de resistencia y 45 a bajo nivel. La mutación que apareció más frecuentemente fue Y181C (24/400) seguida por G190A (21/400). En 43 muestras se observó más de una mutación de resistencia.

La prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a RPV indica la necesidad de evaluar individualmente a cada paciente antes de introducir RPV en su tratamiento y de realizar una vigilancia activa de la resistencia en la población de infectados por VIH-1.

Introducción

La Rilpivirina (RPV) es un NNRTI (inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa) de segunda generación que está indicado en combinación con otros agentes antirretrovirales para el tratamiento de la infección por VIH en pacientes adultos, administrándose una única dosis diaria de 25 mg.

En el mercado local la droga se encuentra disponible integrando co-formulaciones con Emtricitabina y Tenofovir (FTC y TDF) en regímenes de 1 dosis diaria. En otros países también está disponible en combinación con Dolutegravir (DTG).

Su actividad *in vitro* contra cepas de VIH resistentes a NNRTIs parece ser similar a la de la Etravirina (ETV), otro NNRTI de segunda generación pero superior a los NNRTIs de primera generación, Nevirapina (NVP) y Efavirenz (EFV).

La RPV conserva su actividad frente a variantes virales portadoras de mutaciones asociadas a resistencia a NNRTIs de primera generación, tales como K130N (1). Al ser un NNRTI del grupo de las diarilpirimidinas posee cierta flexibilidad estructural que posibilita su unión al bolsillo NNRTI en varias conformaciones y por este motivo es relativamente adaptable a mutaciones en la retrotranscriptasa de VIH-1 (2). Otras ventajas de la RPV son su mejor tolerabilidad y menor número de efectos adversos en comparación con Efavirenz (3).

Pese a las bondades de este antirretroviral, durante los estudios clínicos de fase III ECHO y THRIVE se hallaron mutaciones asociadas a resistencia a RPV mediante el análisis de las cepas de VIH-1 de pacientes con falla virológica bajo terapia con RPV (4). En la retrotranscriptasa de VIH-1 se conoce que las mutaciones K101E/P, E138A/G/K/Q/R, V179L, Y181C/I/V, Y188L, H221Y, F227C y M230I/L causan dicho efecto (5).

De estas mutaciones se sabe que la presencia de K101E, E138K o Y181C hace

disminuir 2,5-3 veces la susceptibilidad a RPV y que es común en pacientes que reciben este medicamento. E138K fue observada más frecuentemente en los pacientes tratados con RPV que mostraban falla virológica y apareció junto a M184I/V y otras mutaciones asociadas a NNRTI. Por otro lado la mutación Y181C podría ser antagonista de E138K según fue sugerido por Asahchop y col., 2013 (6).

La mutación M184I por sí sola no provoca una disminución en la sensibilidad a RPV, pero sí lo hace si se presenta junto a E138K (7 veces menos) o a K101E (4,5 veces menos). Las mutaciones M184I y E138K pueden compensarse mutuamente para restaurar la aptitud enzimática comprometida por cualquiera de las dos mutaciones por sí sola (7). La co-ocurrencia de las mutaciones K101E y E138K incrementó ligeramente la resistencia a RPV en relación a la otorgada por E138K sola (7). I135T/L y mutaciones de escape en linfocitos T citotóxicos restringidos en HLA*B 51/52 pueden predisponer al VIH-1 a presentar E138K ante el fracaso de la terapia que incluya RPV (8).

Las combinaciones L100I+K103N/S y L100+K103R+V179D están fuertemente asociadas a una susceptibilidad reducida a la RPV. No obstante, cuando K103N/R/S o V179D aparecían solas no se detectó ningún descenso en la susceptibilidad.

De acuerdo al trabajo de Calvez y col. (9) las mutaciones con mayor prevalencia en pacientes no tratados previamente resultaron ser E138A/G/K/Q/R y Y181C/I/V. Además la prevalencia de estas mutaciones varía según región geográfica. De esta manera, las áreas donde se registraron mutaciones en E138 con más frecuencia fueron Latinoamérica/Caribe y Europa, mientras que las de Y181 son particularmente prevalentes en Norteamérica. También se registraron variaciones según el subtipo de VIH-1 analizado, siendo las mutaciones en E138 más frecuentes en el subtipo-C.

Por otra parte, la resistencia a RPV fue reconocida en cerca del 20% de los pacientes para los cuales fallaron otros NNRTIs y resultó ser más común tras la falla de tratamientos con Etravirina (27.6%) o Nevirapina (25%) que con Efavirenz (14,5%) (10) y en el 90% de los casos la resistencia a RPV en ensayos clínicos de fase III condujo a la resistencia cruzada a Etravirina. Además la resistencia preexistente a NRTIs (inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa) y NNRTIs en pacientes que cambian a un régimen RPV-FTC-TDF por razones de practicidad está asociada a un riesgo mayor de recaída virológica (11).

Lambert-Niclot y col. (12,13,14) encontraron que la prevalencia de la resistencia a RPV en pacientes para los cuales el tratamiento con NRTIs y NNRTIs había fracasado y que poseían al menos una mutación de resistencia a los NNRTI en su VIH-1 fue más de 10 veces mayor que en pacientes sin terapia antirretroviral previa.

Debido a la presencia de mutaciones de resistencia a RPV es necesaria la selección cuidadosa de pacientes a los cuales prescribir esta medicación, ya sea en primera o segunda línea, o bien si se desea administrar RPV en alguna de sus co-formulaciones para mantener la supresión virológica de manera más conveniente y económica.

El objetivo del presente estudio es determinar la prevalencia de mutaciones asociadas a la resistencia a RPV en pacientes con o sin tratamiento previo con NNRTIs.

Materiales y métodos

Población de estudio y tipo de muestras

Se analizaron 400 muestras de plasma con EDTA correspondientes a pacientes infectados con el virus VIH-1 con valores de carga viral (CV) ≥ 500 copias/ml, independientemente de su edad o historia de exposición al TARV (tratamiento antirretroviral). Todos los pacientes estudiados procedían principalmente de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y sus alrededores y de algunas provincias del interior de la Argentina.

Extracción del ARN viral

El ARN viral fue extraído a partir de 1 ml de plasma con EDTA con el equipo MagnaPure 96 (Roche Diagnostics GmbH) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En muestras con valores de CV ≤ 1000 copias/ml el virus fue concentrado por centrifugación durante 1 hora a 17.000 RPM para aumentar la sensibilidad.

Amplificación y secuenciación

El ARN viral extraído fue amplificado en un procedimiento de un solo paso usando el LC RNA VIRUS MASTER kit (Roche Diagnostics GmbH) y los cebadores MJ3 y MJ4 (15) para la transcriptasa reversa (RT) y 5´prot 1 y 3´prot 1 para la proteasa (PR) (16). Los productos amplificados se sometieron a PCR anidada utilizando los cebadores A-35 y Ne1-35 (17) para la RT y 5´ prot 2 y 3´ prot 2 para la PR (16).

La reacción de secuenciación fue realizada con el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) a partir de los productos de PCR purificados, utilizando los cebadores 5´prot 2 y 3´prot 2, con la obtención de la secuencia nucleotídica completa del gen que codifica para la PR viral (codones 1-99) y A-20 y Ne1-20 para obtener la secuencia nucleotídica parcial del gen que codifica para la RT viral (codones 20-240) (17).

En todos los casos los ciclados fueron llevados a cabo en un Veriti Thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Los productos de las reacciones de secuenciación fueron purificados y sometidos a electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y las secuencias nucleotídicas fueron analizadas mediante los softwares de análisis de secuencias, Sequencer Analysis v 5.4 y Chromas Lite 2.1.1.

Para evaluar la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a los antirretrovirales las secuencias analizadas fueron incorporadas en la base de datos de la Universidad de Stanford de libre acceso https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/ con la finalidad de identificar las mutaciones asociadas a resistencia a antirretrovirales.

Resultados

Se observaron mutaciones asociadas a Ripilvirina en 122 de las 400 muestras analizadas. Dentro de estas, la que apareció con mayor frecuencia fue Y181C (24/122), seguida por G190A (21/122), E138A (16/122), K101E (15/122), L100I (13/122), E138K (7/122), G190S (6/122), Y188L (5/122), G190E (4/22), Y181C/I (3/122), M230L (2/122) y K101P (1/122) y E138G/Q (1/122)%. (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1: Prevalencia de mutaciones detectadas según niveles de resistencia reportados para esa mutación

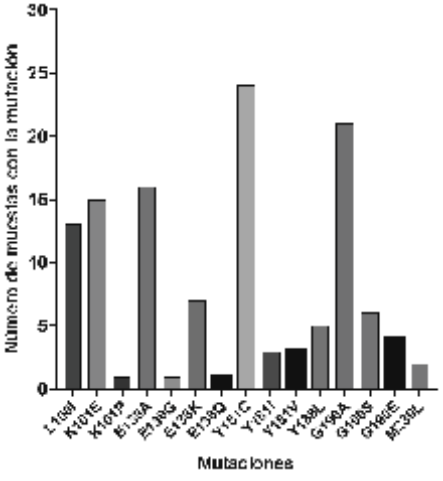
	Resistencia (nivel)		
Mutación detectada	Alto	Intermedio	Bajo
L100I	13		
K101E		15	
K101P	1		
E138A			16
E138G			1
E138K		7	
E138Q			1
Y181C		24	
Y181I	3		
Y181V	3		
Y188L	5		
G190A			21
G190S			6
G190E	4		
M230L	2		
Totales	31	46	45

Prevalencia de mutaciones detectadas según los niveles de resistencia: total de mutaciones detectadas 122/400 (30.5 %), prevalencia por nivel de resistencia: de nivel alto: 31/400 (7.7 %) , de nivel intermedio: 46/400 (11.5 %) y nivel bajo 45/400 (11.2 %).

De las muestras con mutaciones detectadas (n=122), 31 poseen mutaciones asociadas a alto nivel de resistencia a RPV, 46 poseen resistencia de nivel intermedio y 45 de bajo nivel. (Tabla 1 y Figura 2).

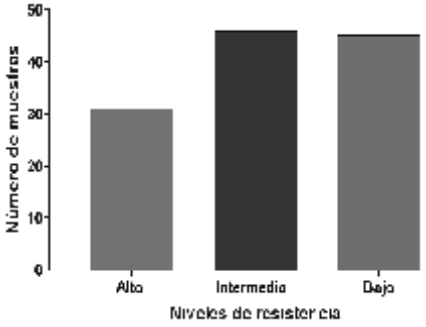
Los codones más comúnmente mutados fueron el 181 (35/122) y el 190 (31/122), les siguieron en frecuencia de mutación los codones 138 (25/122), 101 (16/122), 100 (13/122) y 188 (5/122). El codón mutado con menor frecuencia (2/122) resultó ser el 230.

Figura 1: Mutaciones detectadas según el codón



Distribución de mutaciones asociadas a resistencia a los NNRTIs; (n= 122).

Figura 2: Mutaciones detectadas según niveles de resistencia reportados para los códones mutados



Distribución de las muestras en base a las mutaciones detectadas y a los niveles de resistencia asignados.

En 43 de las 122 muestras que presentaron mutaciones a NNRTIs se halló más de una mutación. Los resultados correspondientes a la combinación de mutaciones se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2: Prevalencia de mutaciones de resistencia combinadas

Mutación detectada	Mutación detectada	Número de casos
Y181C	G190E	3
Y181C	G190A	4
Y181C	G190S	4
K101E	G190A	5
L138K	Y181V	2
K101E	G190S	2
K101E	E138K	2
L100	Y181C	2
K101E	Y181C	4
Y188L	G190A	1
E138K	Y181C	1
E138K	M184V	1
K101E	M184I	1
L100	K103N	7
Total		43

De las 122 muestras que presentaron mutaciones asociadas a resistencia 43 (35.2 %) presentaron asociación de mutaciones, respecto al total de muestras analizadas representan 43/400 (10.7 %).

Otras mutaciones asociadas a NNRTI de primera generación que se detectaron fueron: V179I (9/400), V179D (16/400), V179E (3/400), V179T (1/400), K103N (18/400) K103R (4/400).

Discusión

En el presente estudio se muestra la prevalencia de mutaciones de resistencia a NNRTI en pacientes infectados por VIH-1 incluyendo población sin historia previa de tratamiento antiretroviral, con tratamiento previo con NNRTIs de primera generación y en individuos con fracaso terapéutico. Se utilizó secuenciación poblacional de las variantes circulantes en plasma.

La prevalencia global de mutaciones asociadas a resistencia a NNRTIs obtenida es del 30.5 % (122/400) en la población estudiada, valor significativamente mayor que la obtenida por otros autores. En un meta análisis realizado (9) en base a 138 publicaciones que comprendían 64.466 pacientes sin antecedentes de tratamiento previo con RPV la prevalencia en Latinoamérica fue del 3.6%. La base de datos de resistencia a antivirales de VIH-1 del Reino Unido indica una resistencia global del 6.2 % para RPV.

Recientemente ha sido publicado un trabajo (18) con pacientes de la población Argentina sin tratamiento previo, en el cual se detectó resistencia a RPV en un 13 %. Por otra parte Picchio y col. (19) han detectado un 17 % de muestras resistentes en individuos infectados.

Del total de muestras con mutaciones el 7.75 % (31/400) poseían resistencia de alto nivel lo que hace suponer un probable fracaso terapéutico y un 11.5 % (46/400) resistencia intermedia.

Se detectó la presencia de dos mutaciones asociadas a resistencia en 10.75 % (43/400). La combinación E138K+ M184I, asociada a niveles altos de resistencia no fue

BD Vacutainer®
Líder en Soluciones Preanalíticas

Calidad y Bioseguridad:
Su interés y nuestro compromiso

Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escríbanos a: vacutainer@bd.com

detectada en ninguna muestra.

La utilización de secuenciación de nueva generación (NGS) podría brindar mayor información sobre la prevalencia de mutaciones de resistencia. Con esta metodología es posible determinar poblaciones minoritarias de entre el 2 % y el 20 % que con la metodología utilizada en este estudio no es posible detectar. Estas mutaciones minoritarias podrían ser la causa del fracaso terapéutico en algunos casos aunque la importancia de su detección no está ampliamente aceptada.

Los resultados obtenidos muestran la necesidad de la vigilancia activa de la resistencia hacia RPV y otros antiretrovirales.

MANLAB®
Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Bibliografía

1. Imaz A, García F, di Yacovo S, Llibre JM. [Resistance profile of rilpivirine]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31 Suppl 2:36-43.
2. American Society of Health-System Pharmacists 2013; Drug Information 2013. Bethesda, MD. 2013, p 681.
3. SHARMA, Mamta; SARAVOLATZ, Louis D. Rilpivirine: a new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, vol. 68, no 2, p. 250-256.
4. Jeulin H, Foissac M, Boyer L, et al. Real-life rilpivirine resistance and potential emergence of an E138A-positive HIV strain in north-eastern France. J Antimicrob Chemother. 2014;69(11):3095-3102.
5. Parczewski M, Urbańska A, Maciejewska K, Witak-Jędra M, Leszczyszyn-Pynka M. Transmitted drug resistance to rilpivirine among antiretroviral-naïve patients living with HIV from northern Poland. J Int AIDS Soc. 2014; 17:18929.
6. Asahchop EL, Wainberg MA, Oliveira M, et al. Distinct resistance patterns to etravirine and rilpivirine in viruses containing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor mutations at baseline. AIDS. 2013; 27(6):879-887.
7. Xu HT, Colby-Germinario SP, Asahchop EL, et al. Effect of mutations at position E138 in HIV-1 reverse transcriptase and their interactions with the M184I mutation on defining patterns of resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors rilpivirine and etravirine. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(7):3100-3109.
8. Hayashida T, Hachiya A, Ode H, et al. Rilpivirine resistance mutation E138K in HIV-1 reverse transcriptase predisposed by prevalent polymorphic mutations. J Antimicrob Chemother. 2016;71(10):2760-2766.
9. Calvez V, Marcelin AG, Vingerhoets J, Hill A, Hadacek B, Moecklinghoff C. Systematic review to determine the prevalence of transmitted drug resistance mutations to rilpivirine in HIV-infected treatment-naive persons. Antivir Ther. 2016;21(5):405-412.
10. Anta L, Llibre JM, Poveda E, et al. Rilpivirine resistance mutations in HIV patients failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapies. AIDS. 2013;27(1):81-85.
11. Armenia D, Di Carlo D, Calcagno A, et al. Pre-existent NRTI and NNRTI resistance impacts on maintenance of virological suppression in HIV-1-infected patients who switch to a tenofovir/emtricitabine/rilpivirine single-tablet regimen. J Antimicrob Chemother. 2017;72(3):855-865.
12. Lambert-Niclot S, Allavena C, Grude M, et al. Usefulness of an HIV DNA resistance genotypic test in patients who are candidates for a switch to the rilpivirine/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate combination. J Antimicrob Chemother. 2016; 71(8):2248-2251.
13. Lambert-Niclot S, Charpentier C, Storto A, et al. Prevalence of pre-existing resistance-associated mutations to rilpivirine, emtricitabine and tenofovir in antiretroviral-naive patients infected with B and non-B subtype HIV-1 viruses. J Antimicrob Chemother. 2013; 68 (6):1237-1242.
14. Lambert-Niclot S, Charpentier C, Storto A, et al. Rilpivirine, emtricitabine and tenofovir resistance in HIV-1-infected rilpivirine-naive patients failing antiretroviral therapy. J Antimicrob Chemother. 2014; 69(4):1086-1089.
15. Jung M, Agut H, Candotti D, Ingrand D, Katlama C, Huraux JM: Susceptibility of HIV-1 isolates to zidovudine: correlation between widely applicable culture test and PCR analysis. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1992, 5: 359-364.
16. Nijhuis M, Boucher CA, Schipper P et al: Stochastic processes strongly influence HIV-1 evolution during suboptimal protease-inhibitor therapy. Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95: 1441-1446.
17. Larder BA, Kellam P, Kemp SD: Zidovudine resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from HIV-infected lymphocytes. AIDS 1991, 5: 137-144.
18. Bissio, E, Barbas, MG, Kademián, S, et. al. Prevalence of rilpivirine resistance in people starting antiretroviral treatment in Argentina. Antiv Ther, 2017; 22(7):625-629.
19. Picchio GR, Rimsky LT, Van Eygen V, Haddad M, Napolitano LA, Vingerhoets J. Prevalence in the USA of rilpivirine resistance-associated mutations in clinical samples and effects on phenotypic susceptibility to rilpivirine and etravirine. Antivir Ther. 2014; 19(8):819-823.