

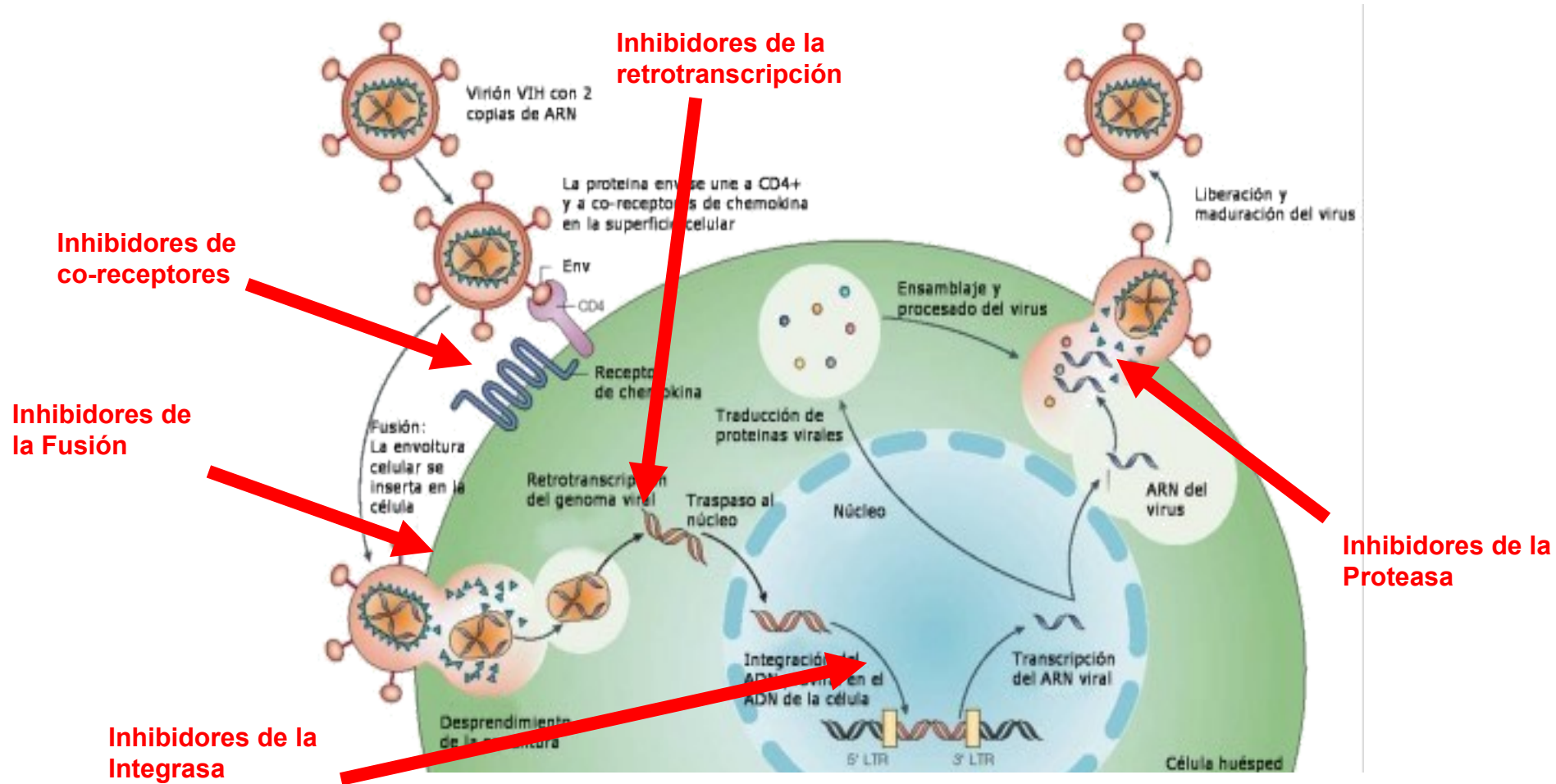
RESISTENCIA ANTIRRETROVIRAL (INTRODUCCIÓN)

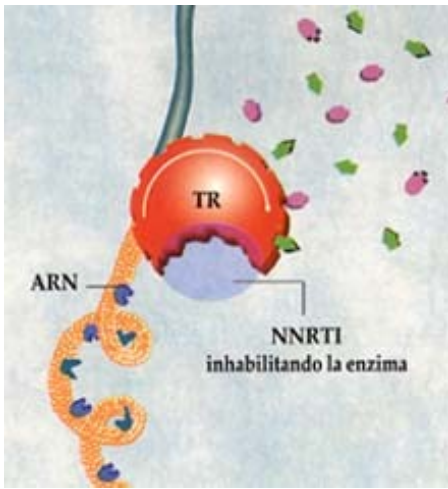
Prof. Adj. Dra. Dora Ruchansky

Departamento de Bacteriología y Virología

Instituto de Higiene - Facultad de Medicina

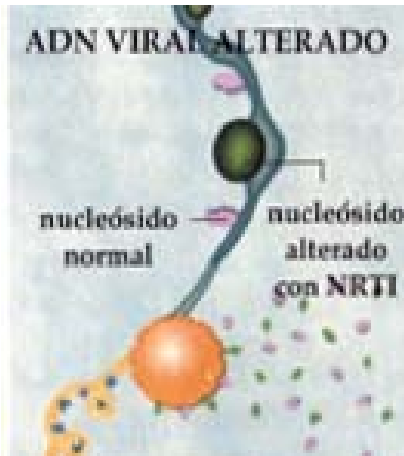
Terapia antirretroviral (TARV)





INHIBIDORES NO NUCLEOSÍDICOS DE LA RT (INNTR):

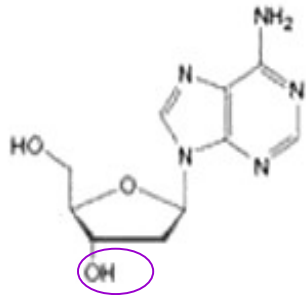
Estas drogas son pequeñas moléculas con fuerte afinidad por un bolsillo hidrofóbico localizado cerca del dominio catalítico de la RT, que actúan generando un cambio conformacional en el sitio activo de la enzima. De esta forma se reduce la afinidad de los nucleótidos para unirse a dicho sitio activo y así se inhibe el proceso de retrotranscripción en el ciclo replicativo.



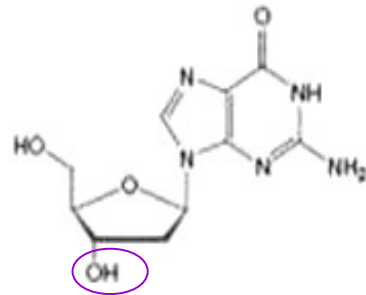
INHIBIDORES NUCLEOSÍDICOS /NUCLEOTÍDICOS DE LA RT (INTR)

Estas drogas actúan produciendo “fallas” en la síntesis del ADN proviral. Los nucleótidos presentes en estas drogas carecen del grupo terminal 3’OH, por tanto se interrumpe la incorporación de nuevos nucleótidos en la síntesis del ADNc

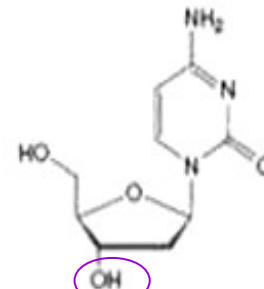
A Native nucleosides



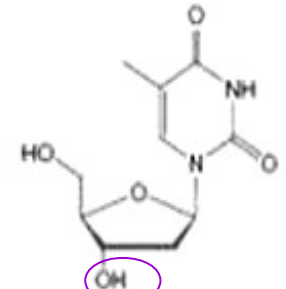
Deoxyadenosine



Deoxyguanosine

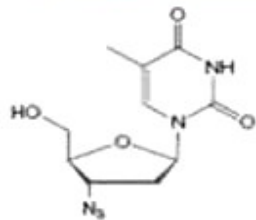


Deoxycytidine

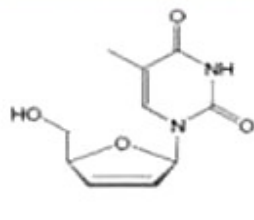


Deoxythymidine

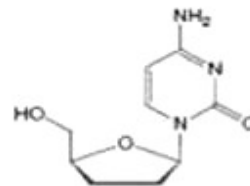
C Anti-HIV nucleoside and nucleotide analogues



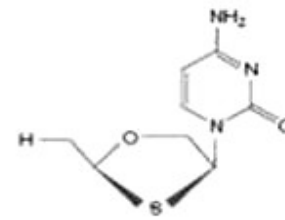
Zidovudine (AZT)



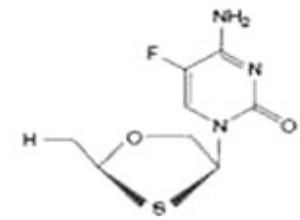
Stavudine (d4T)



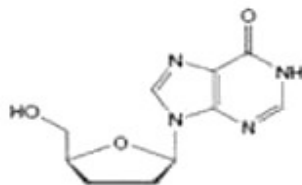
Zalcitabine (ddC)



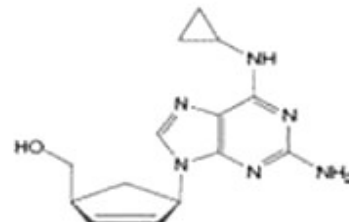
Lamivudine (3TC)



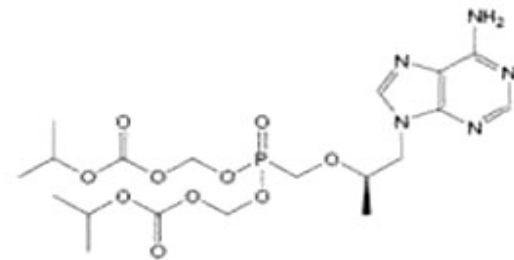
Emtricitabine (FTC)



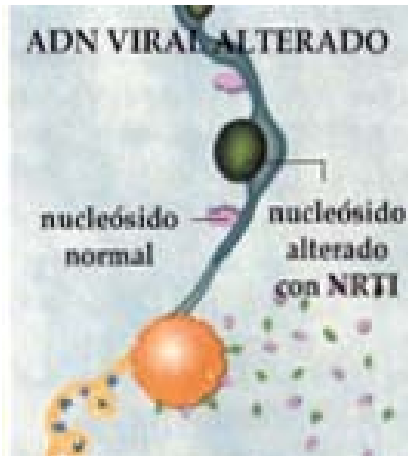
Didanosine (ddI)



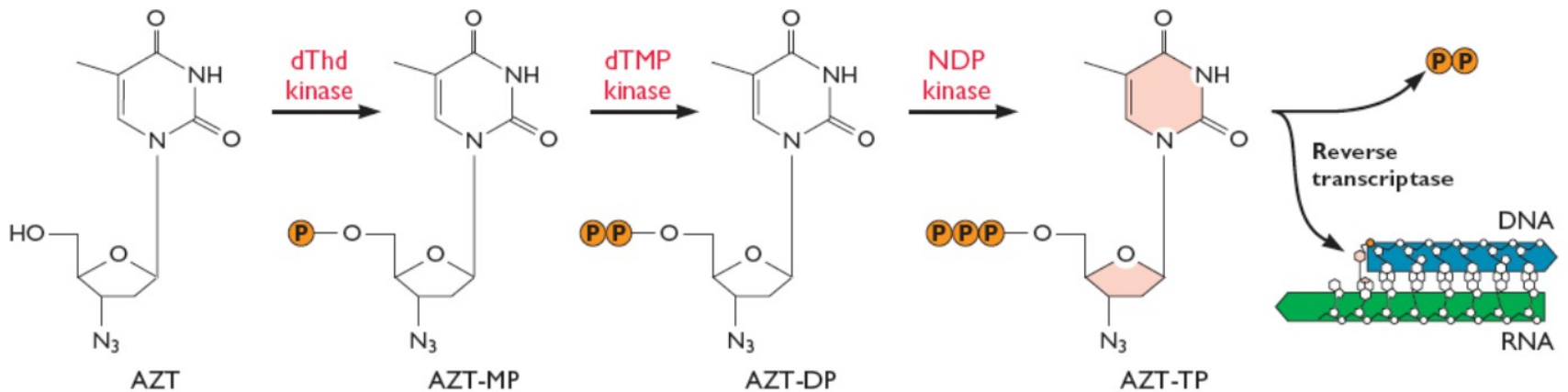
Abacavir

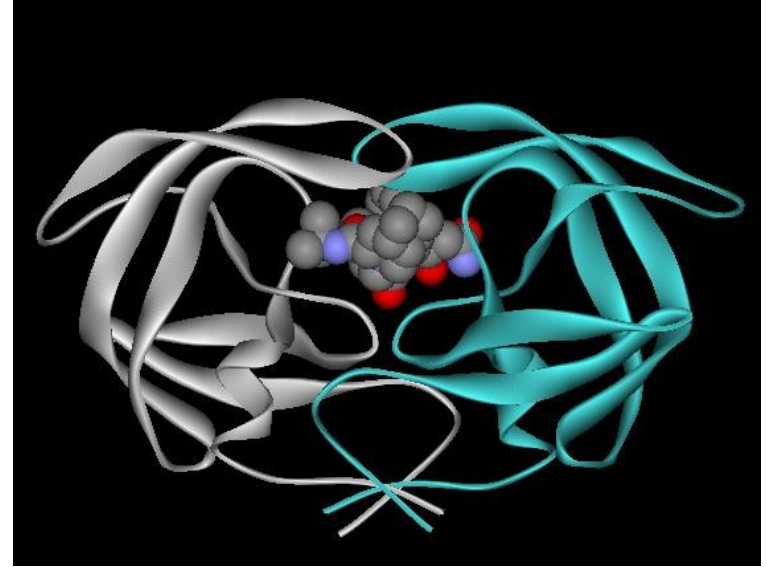
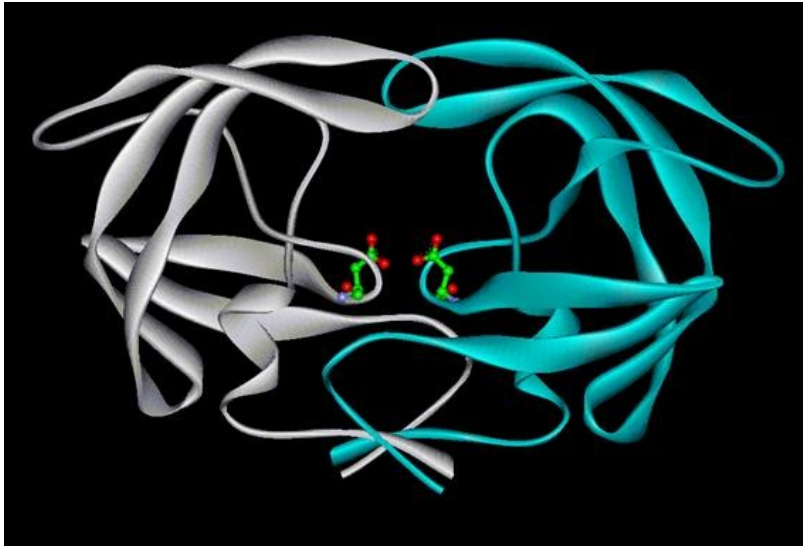


Tenofovir disoproxil



B

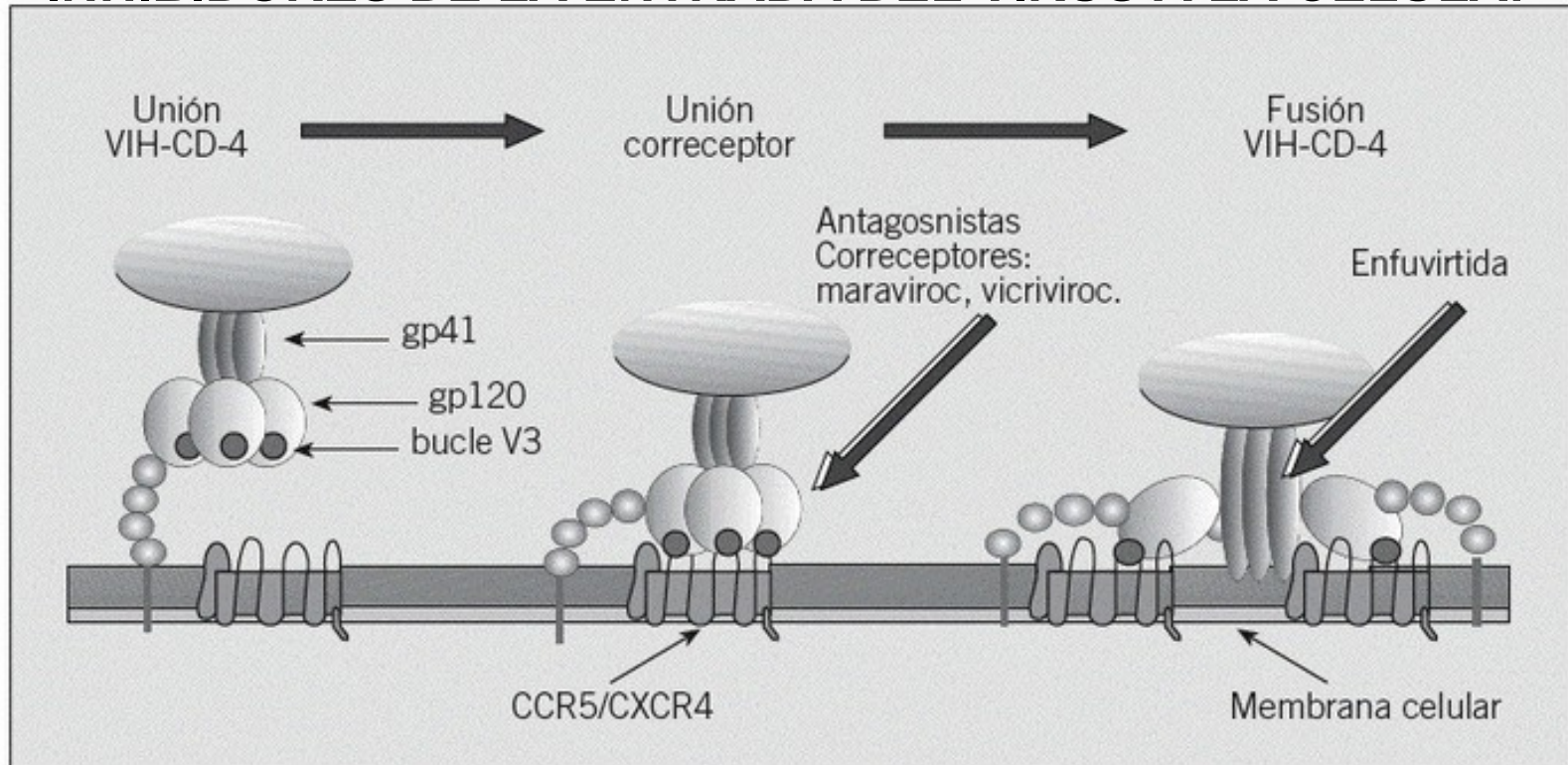




INHIBIDORES DE PROTEASA.

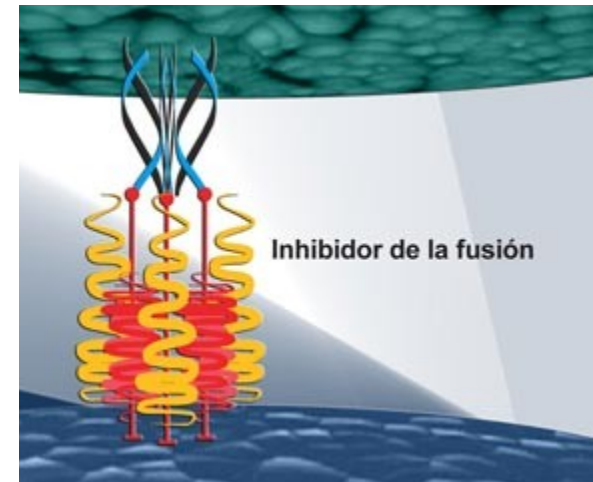
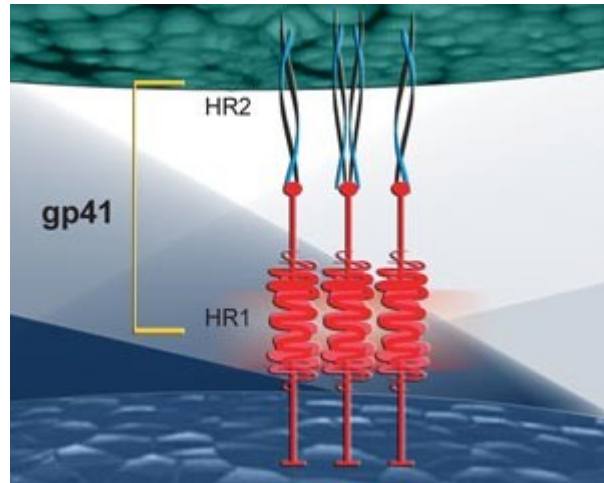
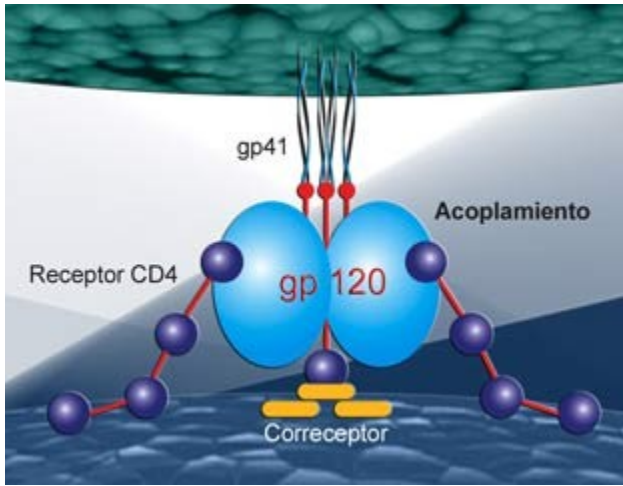
Estas drogas presentan una fuerte afinidad por el sitio activo de la proteasa viral e inhiben la actividad catalítica de la enzima de manera altamente selectiva. La inhibición del corte de las poliproteínas virales por los inhibidores de la proteasa impide que se infecten más células al bloquear su procesamiento en la etapa de ensamblado y maduración del ciclo replicativo, impidiendo la generación de partículas infectivas.

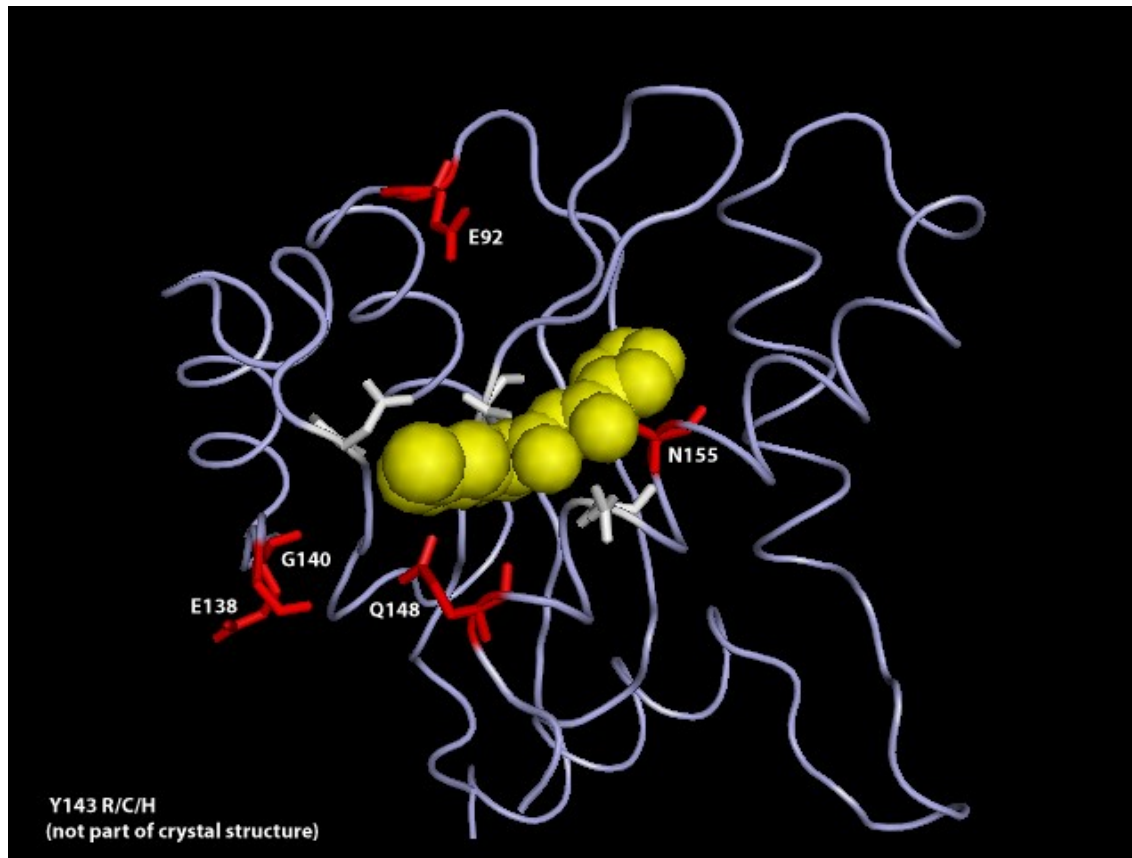
INHIBIDORES DE LA ENTRADA DEL VIRUS A LA CÉLULA:



INHIBIDORES DE FUSIÓN: Se unen a la glicoproteína transmembrana (gp41), impidiendo la unión del virus a la superficie de las células T, de tal forma evita la entrada del virus y el desarrollo de su ciclo replicativo.

INHIBIDORES DE CO-RECEPTORES: Son compuestos que actúan formando un complejo que interacciona con el co-receptor (ej- CCR5), impidiendo la unión del virus al mismo. En este caso la droga actúa sobre una proteína humana (CCR5). Se aplica a virus con tropismo R5.

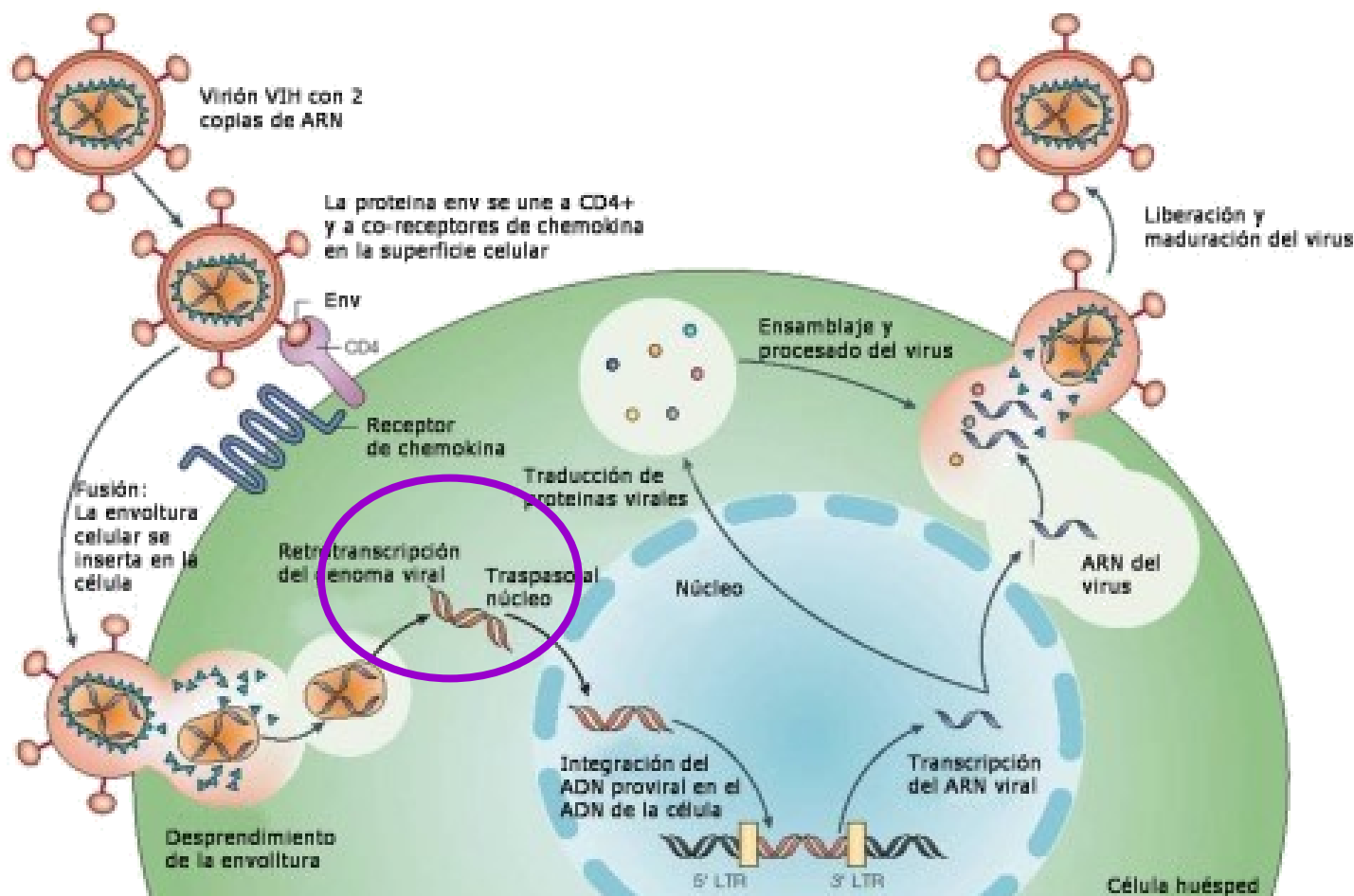




INHIBIDORES DE LA INTEGRASA:

Estos fármacos bloquean un paso irreversible en el ciclo de replicación del VIH, y sus acciones son independientes de los subtipos de correceptores. La inhibición de la integración protege al ADN del huésped contra la infección, al inhabilitar al ADN proviral e impedir la producción de virus.

FACTORES DE VARIABILIDAD GENETICA DEL VIH



Alta tasa de mutación:

1 nucleótido/genoma/ciclo

Recombinación:

~ 7-30/genoma/ciclo

Rápida replicación:

$4,4 \times 10^{10}$ partículas virales/día

COEXISTENCIA DE CUASIESPECIES VIRALES

En un paciente coexisten cuasiespecies o variantes de VIH

FÁRMACO ANTIRRETROVIRAL

Poblaciones de VIH sensibles al fármaco

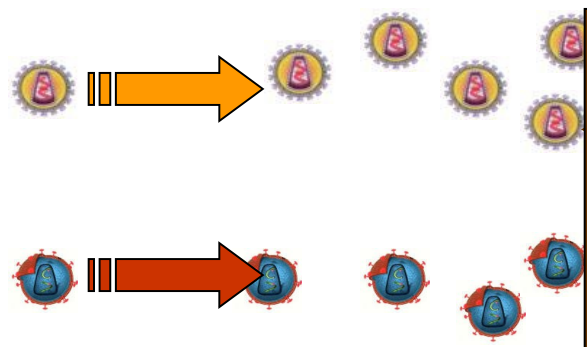
EL FÁRMACO INHIBE LA REPLICACIÓN DE LAS VARIANTES SENSIBLES

>20 billones de mutaciones/día en una persona infectada

Todas las mutaciones posibles ocurren diariamente

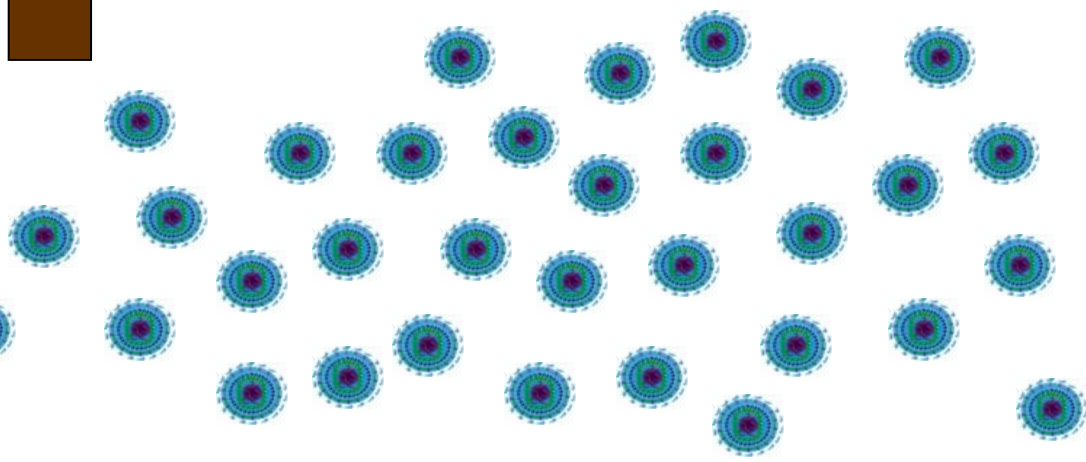
Algunas se seleccionarán bajo presión farmacológica

Wainberg MA, 2008



Poblaciones de VIH resistentes al fármaco

LA VARIANTE RESISTENTE SE REPLICA Y PREDOMINA



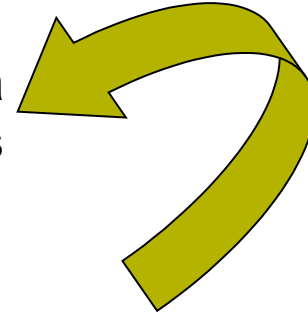
RESISTENCIA A DROGAS ANTIRRETROVIRALES

- ✓ Presencia de **mutaciones** en los genes que codifican para las proteínas blanco de acción de los ARV, generando un **cambio fenotípico**, que reduce la susceptibilidad del VIH mutado a los ARV, en comparación con la susceptibilidad de los virus salvajes.
- ✓ Disminución de la sensibilidad a una o más drogas determinada por la CI_{50}
- ✓ Debe diferenciarse de otras causas de fracaso terapéutico como:
 - Poca adherencia
 - Niveles de droga insuficiente
 - Regímenes con actividad intrínsecamente débiles

Tipos de Resistencia y su interrelación

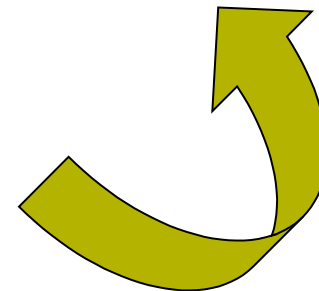
RESISTENCIA PRIMARIA

resistencia en personas sin ninguna exposición previa a ARV a infección con un virus mutante y resistente a los ARV (Resistencia Transmitida).

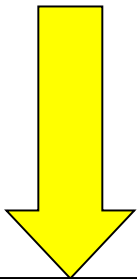


RESISTENCIA TRANSMITIDA A ARV

- resistencia que aparece en personas en TAR, debido a mutación del VIH *wild type* y selección de variantes resistentes durante la exposición a ARV.



RESISTENCIA SECUNDARIA



MUTACIONES PRIMARIAS:

Alteraciones en el material genómico del virus que una vez expresadas darán lugar a cambios en el sitio activo de la enzima, afectando la susceptibilidad de esta por su sustrato.

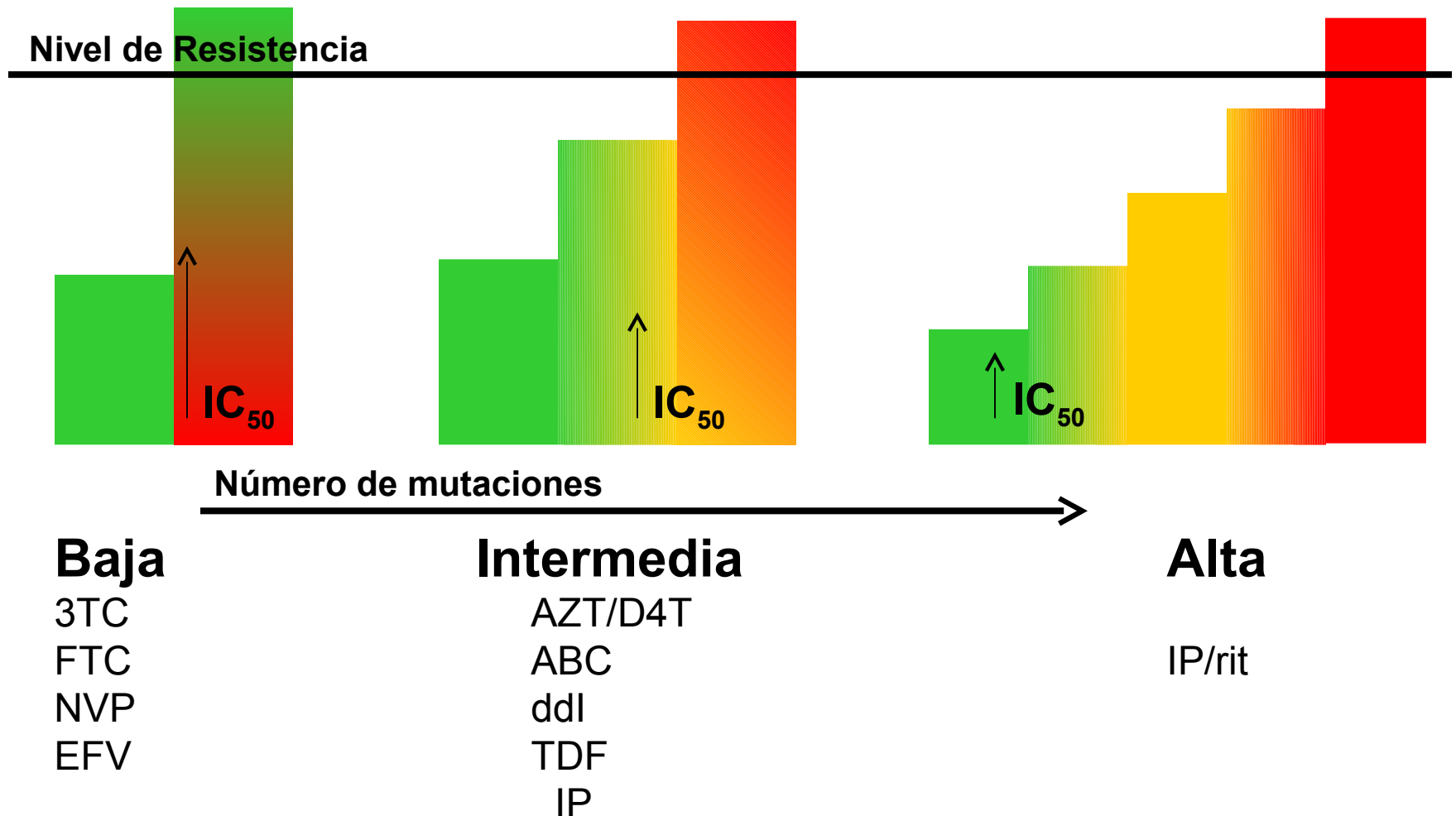
MUTACIONES SECUNDARIAS:

Mutaciones en el genoma viral que tienden a acumularse en virus que ya tienen una o más mutaciones primarias.

Poseen efecto mínimo o nulo en la magnitud de la resistencia al TAR en forma aislada

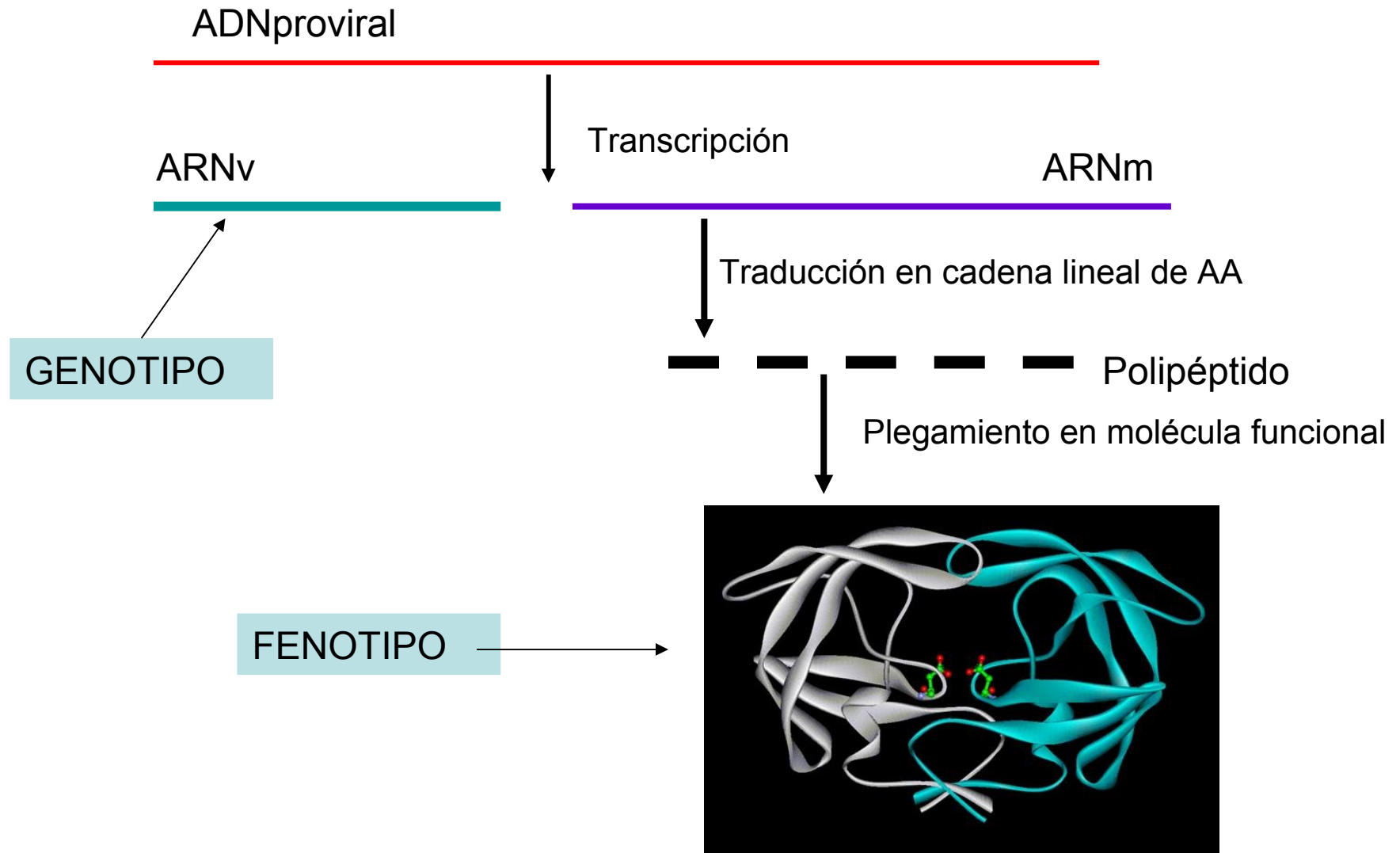
BARRERA GENÉTICA PARA LA RESISTENCIA

Dificultad con la que un virus desarrolla resistencia o en términos concretos la cantidad de mutaciones necesaria para que una droga pierda actividad.

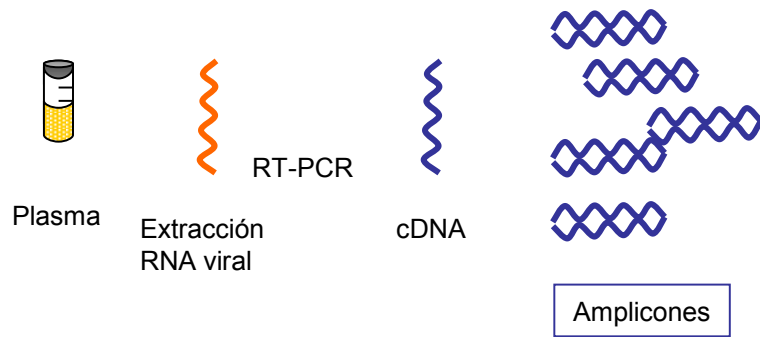


TEST DE RESISTENCIA DEL VIH-1

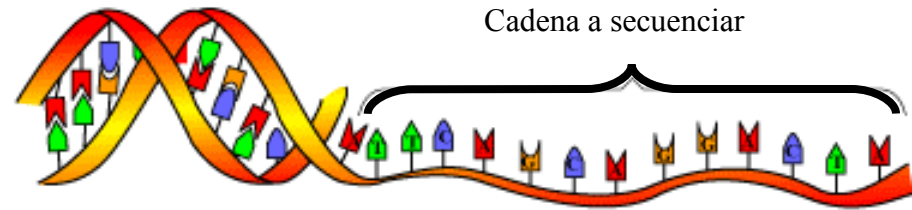
Estudio de la Resistencia del VIH-1



MÉTODOS GENOTÍPICOS: Secuenciación



Cebador marcado para replicación



4 mezclas de reacción que incluye cada uno de los diferentes ddNTP que paran la replicación

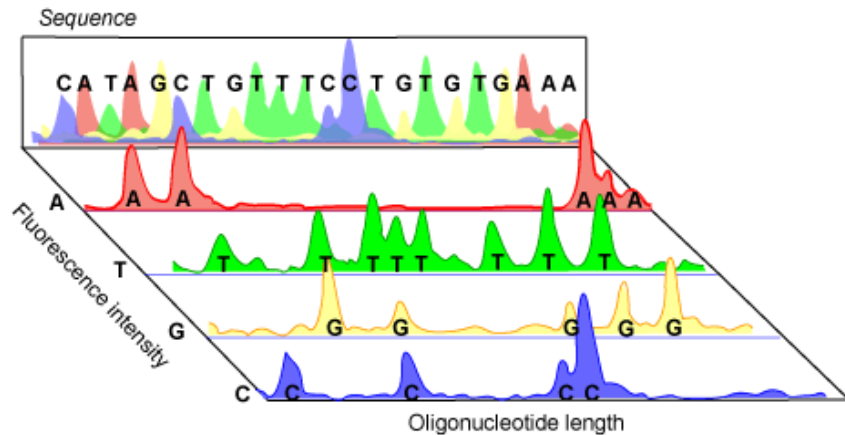
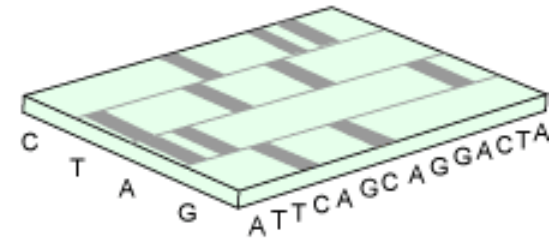
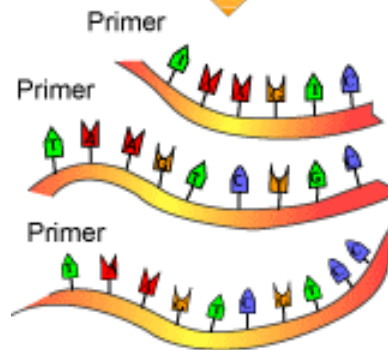


Primed DNA +



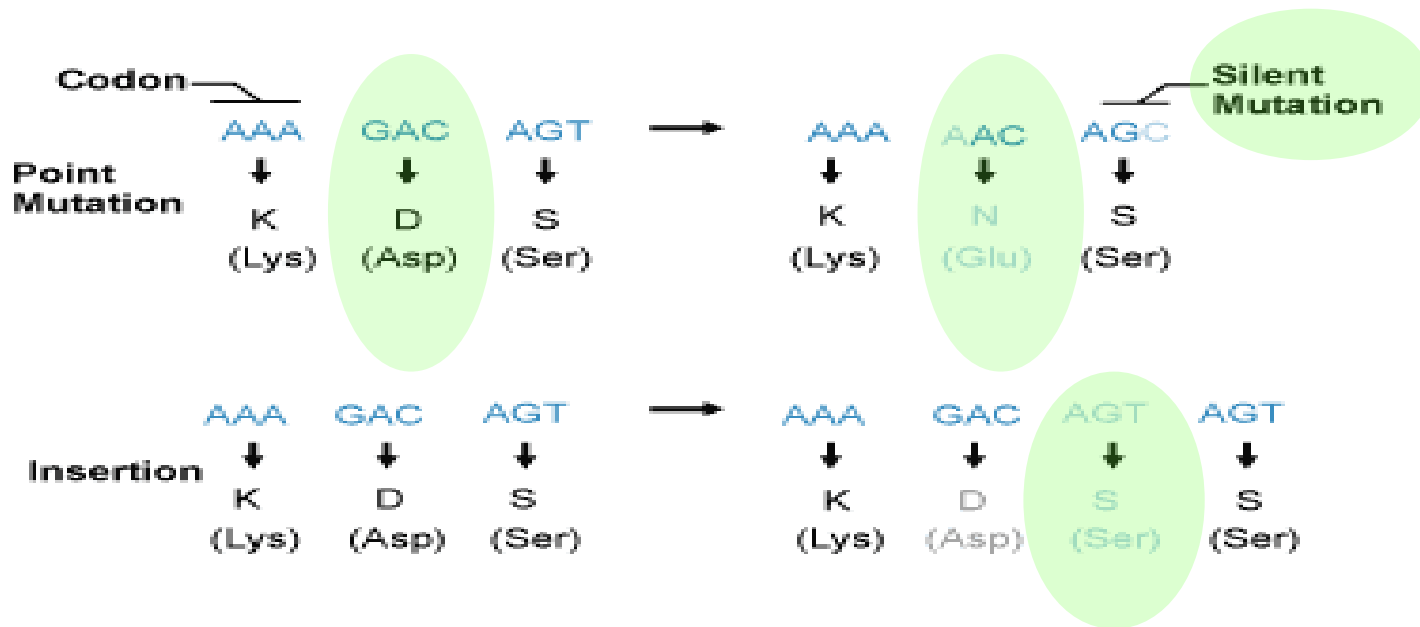
Productos de la reacción de replicación

Separación de productos por electroforesis



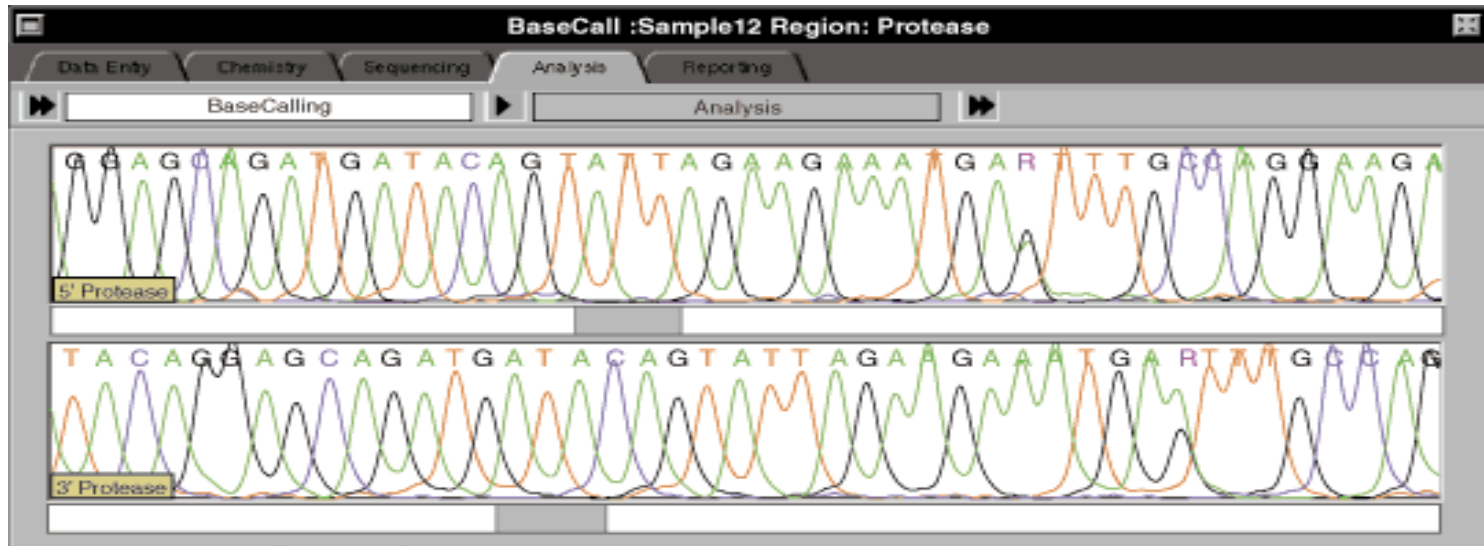
Método genotípico

- Análisis de secuencias nucleotídicas (regiones implicadas (*PR*, *RT*, *IN*))
- Determinación de mutaciones respecto a las cepas Salvajes (WT)
- Interpretación y relación de mutaciones con familias de fármacos



Método genotípico

- Análisis de secuencias nucleotídicas (regiones implicadas (*PR*, *RT*, *IN*))
- Determinación de mutaciones respecto a las cepas Salvajes (WT)
- Interpretación y relación de mutaciones con familias de fármacos



Codon:	...181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192...
Ref Seq:	...TAT	CAA	TAC	ATG	GAT	GAT	TTG	TAT	GTA	GGA	TCT	GAC...
	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D
Pt Seq:	...TAT	CAA	TAC	GTA	GAT	GAT	TTG	TAT	GTA	GGA	TCT	GAC...
	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D
				★								

Nomenclatura de las Mutaciones

atg

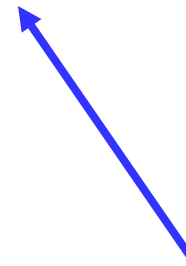
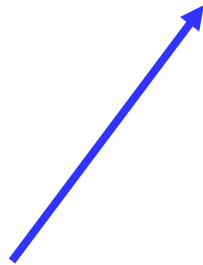
M 184 V

gtg

Aminoácido
normalmente
encontrado en esta
posición

Posición del
codón
analizado

Aminoácido
encontrado en
este virus mutado



Método genotípico

INFORME FINAL

TRUGENE® HIV-1 Reglas GuideLines™ 12.0 INFORME DE RESISTENCIAS

ID. Muestra:
ID. Paciente: PANEL 3
Nombre Paciente:
Fecha Extracción:
Médico:
Centro:
Fecha Informe: Miér 08 ago 2007 16:08:24 GMT-0300

Mutaciones de RT asociadas a resistencia: M41L*, E44D, V108I, M184V*, L210W*, T215Y*

Inhibidores nucleosídicos y nucleotídicos de la RT Interpretación de las resistencias

zidovudina (AZT)	Possible resistencia
didanosina (ddl)	Resistencia
lamivudina (3TC)/emtricitabina (FTC)	Resistencia
estavudina (d4T)	Possible resistencia
abacavir (ABC)	Resistencia
tenofovir (TDF)	Resistencia

Inhibidores no nucleosídicos de la RT Interpretación de las resistencias

nevirapina (NVP)	No hay pruebas de resistencia
efavirenz (EFV)	No hay pruebas de resistencia

Mutaciones de PR asociadas a resistencia: I13V*, K20R*, M36I*, I62V*, L63P*

Inhibidores de la proteasa Interpretación de las resistencias

saquinavir + ritonavir (SQV/r)	No hay pruebas de resistencia
indinavir (IDV)	No hay pruebas de resistencia
IDV/r **	No hay pruebas de resistencia
nelfinavir (NFV)	No hay pruebas de resistencia
amprenavir (APV)/fosamprenavir (FPV)	No hay pruebas de resistencia
APV/r or FPV/r **	No hay pruebas de resistencia
lopinavir + ritonavir (LPV/r)	No hay pruebas de resistencia
atazanavir (ATV)	No hay pruebas de resistencia
atazanavir + ritonavir (ATV/r) **	No hay pruebas de resistencia
tipranavir + ritonavir (TPV/r)	Possible resistencia
darunavir + ritonavir (DRV/r)	No hay pruebas de resistencia

** Inhibidores de la proteasa administrados con ritonavir en dosis bajas como refuerzo farmacológico.

La interpretación de la resistencia se fundamenta en la interpretación de los datos *in vitro* e *in vivo* por parte de un grupo internacional de expertos (Grupo de Consenso), incluidos los datos fenotípicos y de respuesta virológica disponibles desde Junio de 2006 para correlacionar las secuencias de la proteasa y la RT con la resistencia a antirretrovíricos. Comprenden las mutaciones primarias y secundarias.

* Los codones marcados con un asterisco guardan relación con los comentarios en cursiva de las secciones sobre detalles de las mutaciones.

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre: _____

Cargo: _____

Las decisiones relativas al tratamiento deben adoptarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio pertinentes, así como la información para la prescripción de los fármacos en cuestión.
El informe de resistencia de la prueba de genotipado del VIH-1 de TRUGENE® sigue las reglas de las GuideLines™ (normas) elaboradas por un grupo internacional de expertos.

Los resultados obtenidos con métodos de análisis o herramientas de interpretación diferentes no son intercambiables.

Para diagnóstico *in vitro*. Análisis del genotipo del VIH-1 por secuenciación del ADN.

DR 3.8 IVD (2007/01/05) GuideLines™ 12.0 (2006/06/17) © 2006 Bayer HealthCare LLC. Reservados todos los derechos.
GeneObjects™ 3.2 (2002/12/17) / TRUGENE_HIV1_G12.gnl (2006/10/27)

Método genotípico

VENTAJAS

- Rapidez
- Menor Costo
- Disponible
- Información completa gen
- Detecta resistencias antes del fenotipo
- Caracterización de los patrones de resistencia

DESVENTAJAS

- Necesita al menos 1000 copias/mL
- Dificultad para detectar mutaciones que se encuentran en baja frecuencia (<5%)
- No analizan variantes nuevas, solo subtipo B *
- Dificultad en interpretación

* En el caso en que solo se use la base de datos que presenta el software del fabricante

Método Fenotípico

Define si una cepa de VIH-1 es sensible o resistente a determinado fármaco ARV en función de su **capacidad de replicación ante concentraciones decrecientes del fármaco in vitro**.

Método Fenotípico

Define si una cepa de VIH-1 es sensible o resistente a determinado fármaco ARV en función de su **capacidad de replicación ante concentraciones decrecientes del fármaco in vitro**.

El resultado que se obtiene se conoce como concentración inhibitoria 50 o 90%: CI50 – CI90.

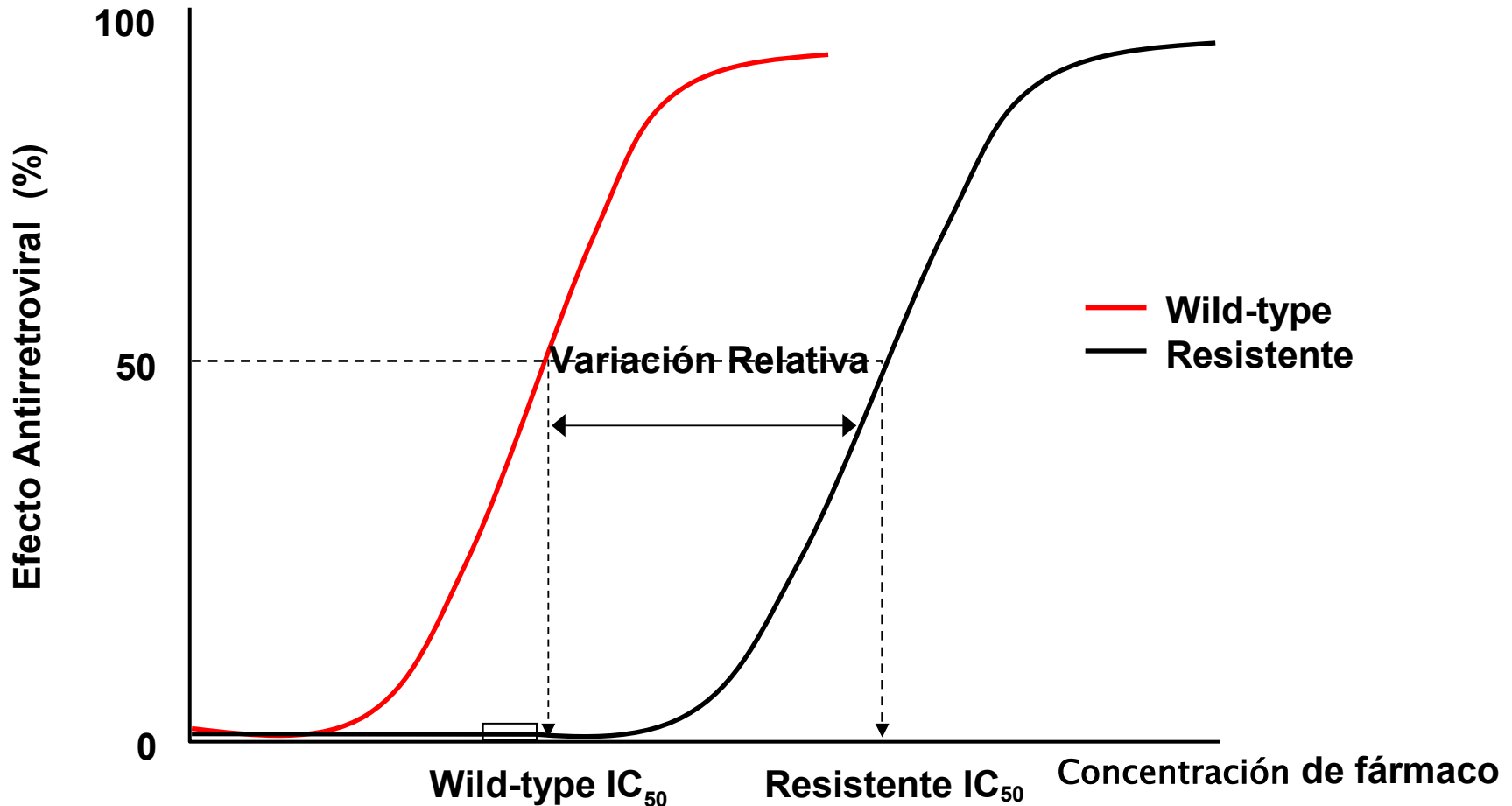
- Cultivo de virus en presencia de cada ARV
- Cuantificación de la pérdida de **susceptibilidad** comparadas con las cepas Salvajes (WT)
- Interpretación de la susceptibilidad

Cepa sensible: CI50 hasta 4x el de la cepa referencia (WT)

Intermedia: 4–10x

Cepa resistente: >10x

Variación de la Concentración (*fold change*)



- IC_{50} = 50% Concentración inhibitoria
- $IC_{50\ PT} / IC_{50\ WT} =$ Variación en la concentración
- Ejemplo: $IC_{50\ PT} 5\mu M, IC_{50\ WT} 0.5\mu M \Rightarrow$ Variación en la concentración = 10

Método Fenotípico

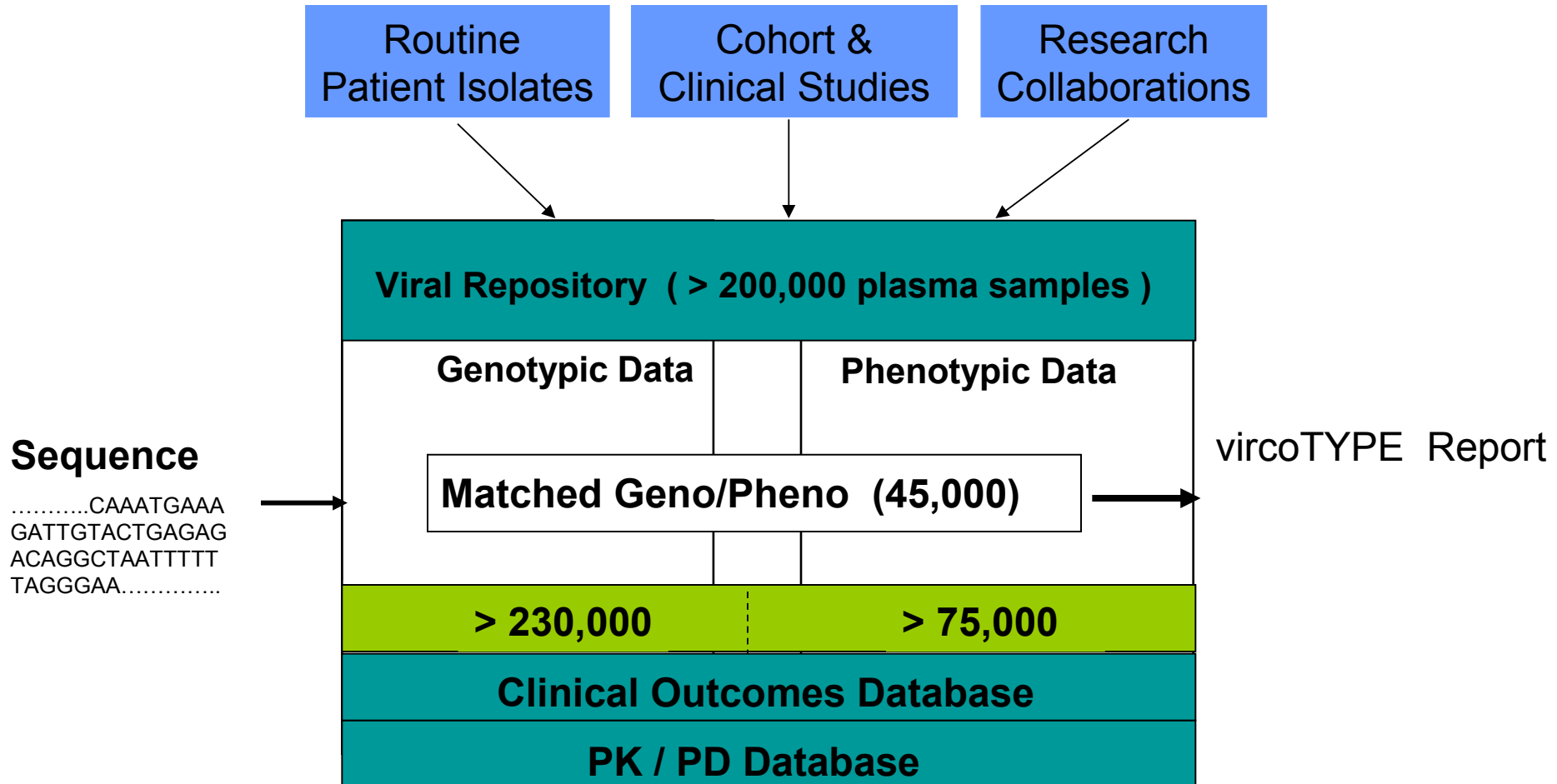
VENTAJAS

- Interpretación fácil
- Posibilidad de analizar los virus plasmáticos
- Conocer susceptibilidad real a varias drogas
- Buena estandarización y concordancia entre las pruebas

DESVENTAJAS

- Mayor tiempo de realización
- Mayor costo
- Infraestructura más compleja
- Personal altamente capacitado
- Deficiencia en análisis de especies minoritarias

Virco's Databases



Genotypic
Sequence

Measured
Fold Change (FC)

Calculated
Fold Change (FC)

