

Identificación de mutaciones asociadas con resistencia a inhibidores de la transferencia de cadena de integrasa en pacientes VIH-1 positivos *naïve* para tratamiento antirretroviral en Medellín, Colombia

Daniela Vanegas-Otálvaro¹, Paula A. Velilla¹, Claudia P. Velasquez², Maria T. Rugeles¹, Francisco J. Díaz¹, Liliana Acevedo-Sáenz^{1,2,*}

Resumen

Objetivo: Estimar las frecuencias de mutaciones y de polimorfismos adicionales asociados con resistencia a los fármacos inhibidores de la integrasa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).

Metodología: Estudio descriptivo, de corte transversal, en individuos VIH-1 positivos de la ciudad de Medellín, quienes no habían recibido tratamiento antirretroviral. En ellos se determinó, a través del método de 2-dideoxinucleótidos y el sistema ABI3730XL, la secuencia del gen de la integrasa del VIH-1 a partir del ARN viral circulante, la cual fue analizada en la base de datos de resistencia a medicamentos antirretrovirales de la Universidad de Stanford y según reportes de literatura científica.

Resultados: Se encontraron las siguientes mutaciones (con sus respectivas frecuencias): una mutación mayor, E138K (1/46), tres mutaciones accesorias G163E (3/46), L74I (3/50) y E157Q (2/48), una mutación no polimórfica A128T (1/49) y otras dos mutaciones potencialmente asociadas con resistencia a inhibidores de integrasa S230N (9/39) y S119P/R/T (4/47, 2/47 y 14/47, respectivamente).

Conclusiones: En las secuencias analizadas, llama la atención la presencia de al menos una mutación asociada a resistencia a inhibidores de integrasa en el 14% de los individuos estudiados, sugiriendo una pobre presión selectiva de este tipo de fármacos en la población viral circulante en la zona.

Palabras clave: Resistencia a medicamentos, VIH-1, mutación, integrasa de VIH

Identification of mutations associated with resistance to Integrase Strand Transfer Inhibitors (INSTI) in ART-naïve HIV-1 patients in Medellín, Colombia.

Abstract

Aim: To estimate the frequencies of major and accessory mutations, as well as additional polymorphisms associated with resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase strand transfer inhibitors.

Materials and methods: Descriptive cross-sectional study, focused on HIV-1 positive individuals from Medellín, recruited between 2013 and 2015, and that had not received antiretroviral therapy. In these patients, the sequence from HIV-1 integrase was determined from circulating viral RNA through Sanger chain termination method with the ABI3730XL system, and the sequences were analyzed using the HIV Drug Resistance Database from the University of Stanford, together with previous literature reports.

Results: The following mutations associated with resistance to integrase strand transfer inhibitors, along with its respective frequencies, were found: one major mutation, E138K (1/46), three accessory mutations, G163E (3/46), L74I (3/50) and E157Q (2/48); one non-polymorphic mutation, A128T (1/49); and two mutations potentially associated with resistance to integrase strand transfer inhibitors, S230N (9/39) and S119P/R/T (4/47, 2/47 and 14/47, respectively).

Conclusions: In the sequences analyzed, it is noteworthy the presence of at least one mutation related with resistance to integrase inhibitors in 14% of the studied patients, suggesting a poor selective pressure of this kind of drugs in the circulating viral population in our region.

Keywords: drug resistance, HIV-1, mutation, HIV integrase

1 Grupo Inmunovirología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70 No. 52-21. Grupo de Investigación Biología CES, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Medellín, Colombia

2 Grupo de Investigación en Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia.

3 Programa nacional VIH-SIDA, EPS Sura, Medellín, Colombia.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: liliana.acevedo@udea.edu.co

Carrera 53 No. 61-30 Torre 2 Lab. 532, Sede de Investigación Universitaria – SIU, Medellín, Colombia. Teléfono 57-4-2196634. Fax 57-4-2196482

Recibido: 11/07/2018; Aceptado: 16/08/2018

Cómo citar este artículo: D. Vanegas-Otálvaro, et al. Identificación de mutaciones asociadas con resistencia a inhibidores de la transferencia de cadena de integrasa en pacientes VIH-1 positivos *naïve* para tratamiento antirretroviral en Medellín, Colombia. Infectio 2019; 23(S1): 97-128

Introducción

Para el año 2016, se reportó en Colombia cerca de 120.000 personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y 2.800 muertes asociadas al virus¹; sumado a lo anterior, el análisis epidemiológico del comportamiento de la infección en el país muestra una tendencia al aumento anual en el número de casos¹, por lo que se requieren programas de intervención que aporten al control de la infección en el país.

En la actualidad, la estrategia con mayor impacto en la salud de los pacientes infectados por VIH-1 es la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA), la cual busca inhibir diversos pasos del ciclo replicativo viral². Sin embargo, las mutaciones asociadas con resistencia a medicamentos antirretrovirales (ARV) comprometen la eficacia de la TARAA³, no sólo en pacientes que han sido previamente tratados sino también en aquellos individuos no previamente tratados o *naive*, cuya infección es iniciada por una variante viral resistente a ARV lo que se define como resistencia primaria⁴.

La reciente introducción de los inhibidores de integrasa (INI), o más específicamente, los inhibidores de la transferencia de cadena de integrasa (InSTI) se ha convertido en una alternativa tanto en esquemas de tratamiento inicial como en terapias de rescate para la infección por VIH-1, dada su capacidad para suprimir la integración del ADN viral al genoma humano⁵. Aunque todos los InSTI significativamente reducen la replicación viral, estudios clínicos de resistencia a ARV han reportado que los InSTI de primera generación, raltegravir (RAL) y elvitegravir (EVG), presentan una baja barrera genética a la resistencia comparados con los inhibidores de proteasa⁶. A la fecha, se han reportado las mutaciones de resistencia Y143R/C, N155H y Q148K/R/H en el dominio catalítico de la enzima integrasa para RAL cuando se encuentran acompañadas de al menos una de las siguientes mutaciones: L74M/I, E92Q, T97A, E138K/A/T, G140S, Y143H, entre otras^{7,8}; de otro lado, las mutaciones T66I/A/K, E92Q/G, T97A, N155H y Q148H/K/R se han asociado con resistencia a EVG⁹. En el caso de dolutegravir (DTG), un InSTI de segunda generación, se han reportado raras variantes virales resistentes¹⁰ con un perfil de mutaciones limitado al residuo G148 acompañado de L74I, E138A/K/T o G140A/C/S⁸.

Adicionalmente, se han reportado mutaciones aminoacídicas accesorias cuya sola presencia no aporta a la resistencia al medicamento pero en combinación con otras mutaciones disminuye la susceptibilidad a los InSTI y/o incrementa la replicación viral⁹. Sumado a lo anterior, los polimorfismos naturales en la integrasa viral pueden favorecer el desarrollo de resistencia a estos medicamentos; un ejemplo es la mutación V72I, la cual puede tener un impacto en el desarrollo de resistencia al RAL, EVG y al DTG¹¹.

Las mutaciones descritas en la integrasa son clasificadas en tres grandes grupos dentro de la base de datos de resistencia a VIH de Stanford: i) mutación mayor, ii) mutación accesorias

y iii) mutaciones misceláneas. Las mutaciones mayores son sustituciones no polimórficas que juega un papel importante en la reducción de la susceptibilidad a uno o más InSTI. Las mutaciones accesorias se definen como sustituciones en posiciones no polimórficas o mínimamente polimórficas que contribuyen a reducir la susceptibilidad en combinación con una o más mutaciones mayores. También se incluyen sustituciones altamente inusuales y mal caracterizadas en las principales posiciones de resistencia a los fármacos y finalmente las mutaciones misceláneas son aquellas que no están asociadas con la resistencia a los medicamentos; incluye mutaciones en sitios polimórficos que pueden estar débilmente asociadas con resistencia a los fármacos. Se describe otro grupo de mutaciones definidas como Otras que son mutaciones no reportadas por la base de datos de Stanford pero que, en ensayos *in vitro*, se han asociado con resistencia a InSTI.

Teniendo en cuenta la baja barrera genética de algunos InSTI, la tendencia creciente en el uso de este tipo de medicamentos y la transmisión potencial de variantes virales resistentes a INI¹², se hace necesario la caracterización de mutaciones en la integrasa en individuos *naive* para poder optimizar los esquemas iniciales de tratamiento ARV. En Colombia, los reportes de frecuencias de resistencia se han limitado a los inhibidores de la transcriptasa reversa y de la proteasa, excluyendo mutaciones asociadas a InSTI, por lo cual el objetivo de este estudio fue identificar y estimar las frecuencias de mutaciones mayores y accesorias, y de polimorfismos adicionales asociados con resistencia a este grupo de fármacos.

Materiales y métodos

Tipo de estudio, diseño muestral y población de estudio

Este es un estudio descriptivo de corte transversal en el que se reclutaron 96 individuos infectados con VIH-1 del programa de atención integral de la entidad prestadora de salud SURA (EPS SURA) de Medellín, Colombia, captados entre 2013 y 2015. Los pacientes se seleccionaron con base en los siguientes criterios de inclusión: i) ser mayor de 18 años, ii) no haber recibido terapia antirretroviral, iii) tener carga viral detectable y iv) residir en Medellín al menos en los últimos 5 años.

De cada participante se obtuvo consentimiento informado, datos relacionados con conductas de riesgo (compañeros sexuales, tipo de relación sexual que incluía las siguientes opciones: hombres que tienen sexo con hombres (HSH), hombres que tienen sexo con hombres y mujeres (HSHM), hombres que tienen sexo con mujeres (HSM) y mujeres que tienen sexo con hombres (MSH); además de otros datos como uso de preservativo, uso de drogas alucinógenas entre otros) y se garantizó la confidencialidad de la información. El proyecto fue avalado por el comité de bioética de la Sede de Investigaciones Universitarias (CBEIH-SIU) de la Universidad de Antioquia (Acta 15-08-449), y por el comité de Investigaciones de la entidad EPS SURA, Medellín.

Extracción de ARN viral y síntesis del ADNc

A partir de plasma obtenido de sangre anticoagulada con EDTA, se extrajo el ARN viral siguiendo las instrucciones del estuche comercial Qiamp Viral Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). Para la síntesis del ADNc se utilizó el estuche comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), utilizando el cebador UNINEF específico para VIH, reportado por Nadai y colaboradores¹³ (Tabla 1).

Amplificación de la integrasa a partir gen *pol* del VIH-1 de ARN viral

La amplificación se realizó por medio de la técnica de PCR anidada utilizando cebadores específicos para el gen *pol* y el protocolo reportado por Nadai y colaboradores¹³ (Tabla 1), modificando la temperatura de alineamiento a 60°C en los primeros 10 ciclos y el tiempo de elongación a 5 minutos en todos los ciclos, en ambas rondas de amplificación. El tamaño del amplificado fue de aproximadamente 900 pb, correspondiente a las posiciones 4001 pb – 5112 pb de la secuencia HXB2.

Secuenciación, ensamblaje, edición y alineamiento de secuencias

Los productos de PCR fueron secuenciados por el método de 2-dideoxinucleótidos, con el sistema ABI3730XL en un servicio comercial (Macrogen Inc. Corea). Se utilizaron los juegos de cebadores mostrados en la tabla 1 y reportados por Malet y colaboradores⁷.

Las secuencias parciales obtenidas a partir de una misma muestra fueron ensambladas y editadas en "contigs" individuales en el programa Seqman II versión 5.01 de DNASTAR (Lasergene, Madison, WI USA), utilizando como guía la secuencia HXB2 (Genbank: K03455.1). Las secuencias consenso obtenidas de cada "contig" fueron alineadas utilizando el programa MEGA 7.0.14¹⁴ (<http://www.megasoftware.net/>) bajo el algoritmo MUSCLE¹⁵. Las inserciones que no se en-

contraran en la secuencia de referencia HXB2 fueron eliminadas. Todos los nucleótidos, incluyendo los ambiguos, y sus aminoácidos derivados fueron denominados de acuerdo con los códigos IUPAC (<http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>).

Identificación de mutaciones asociadas a resistencia antirretroviral

Con las secuencias alineadas se realizó la construcción de un árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo General de Tiempo Reversible (GTR) utilizando el programa MEGA7¹⁶ con un soporte de 1000 replicaciones bootstrap¹⁷. Para dicho árbol filogenético se incluyeron secuencias homologas de subtipo B, secuencias no-B y formas recombinantes circulantes aisladas en Suramérica. El porcentaje de adenina-timina, la diversidad nucleotídica y la prueba de neutralidad de Tajima *D* se realizó en el programa DnaSP6¹⁸.

La frecuencia de sitios polimórficos fue realizada por conteo directo, mientras que las mutaciones asociadas a resistencia fueron identificadas en la base de datos de la Universidad de Stanford¹⁹, disponible en <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/>. Además, se revisó literatura para identificar otras mutaciones asociadas con resistencia que no se encontraban en la base de datos mencionada. Las frecuencias de polimorfismos y de mutaciones asociadas a resistencia fueron calculadas como el número de secuencias que poseían el residuo mutado sobre el total de secuencias que incluían dicho residuo.

Resultados

Las características de los 96 individuos elegibles para el estudio, 95% de sexo masculino, se detallan en la figura 1. En general, estos individuos exhibían comportamientos de alto riesgo: 21% tenían un compañero sexual seropositivo para

Tabla 1. Cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación del segmento correspondiente a la integrasa

Cebador ^a	Posición ^b	Secuencia (5' → 3')	Uso
UNINEF-R	9605-9632	GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGCTT	Síntesis de ADNc
POLoutF1	2253-2277	CCTCAAATCACTCTTTGGCARGAC	Primera ronda de amplificación
VIF-VPUoutR1	6324-6352	GGTACCCATAATAGACTGTRACCCACAA	
POLinF1	2483-2509	AGGACCTACRCCTGTCAACATAATTGG	Segunda ronda de amplificación
VIF-VPUinR1	6207-6231	CTCTATTGCCACTGTCTCTGCTC	
4001F	4001-4020	AGCTTTGCAGGATTCGGGAT	Secuenciación
IN4764AS-R	4743-4764	CCATTTGTACTGCTGTCTAA	
IN1-F	4137-4157	AAGGTCTATCTGGCATGGGTA	
5088R	5088-5112	CTAATCCTCATCCTGTGTA CTGCA	
4744R	4744-4767	CCACTGGCTACATGAACTGCTACC	
IN4542S-F	4542-4558	GCAGGAAGATGGCCAGT	

^aF: "Forward", R: "Reverse". ^b Posiciones de acuerdo a la secuencia de referencia HXB2 (NC_001802.1)

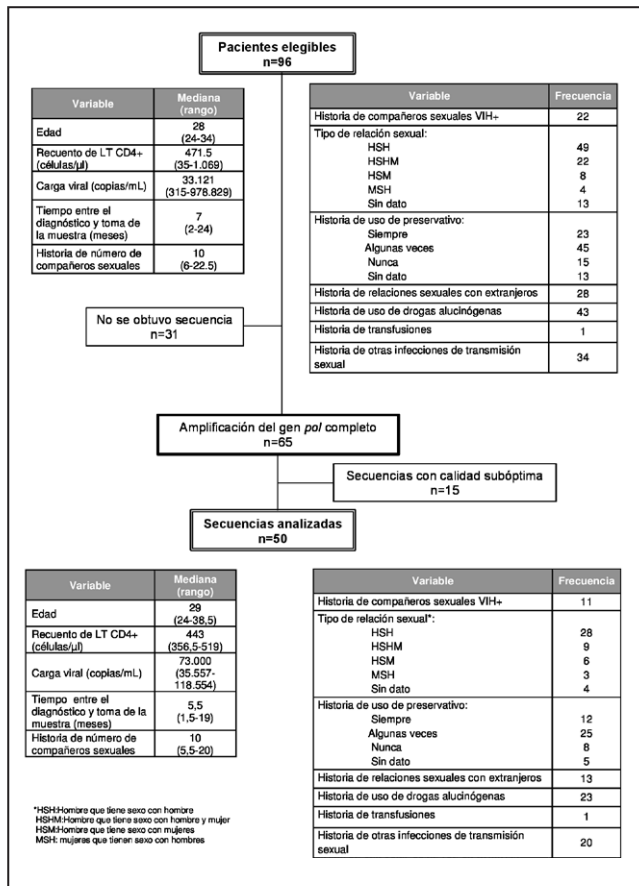


Figura 1. Diagrama de flujo de los pacientes elegibles. Se muestran las características clínicas y epidemiológicas, así como las causas de exclusión de las secuencias.

VIH, 28% tenían historia de relaciones sexuales con extranjeros y 34% tuvieron episodios previos de otras enfermedades de transmisión sexual. La mediana de número de parejas sexuales totales reportadas por individuo fue de 10 y el uso de preservativo fue ocasional en la mayoría de la población estudiada. La mediana de la carga viral fue de 33.121 copias/mL y de 471,5 células/ μ L para los linfocitos T CD4+.

De las 96 muestras obtenidas en el estudio se logró la amplificación del gen *pol* en 65 de ellas, pero sólo de 50 se obtuvo secuencias de buena calidad en la mayor parte del segmento de la integrasa, y sólo estas fueron analizadas.

El árbol filogenético realizado utilizando el método de máxima verosimilitud muestra la topología característica de ramas terminales largas y ramas basales cortas de secuencias de VIH (figura 2). Todas las secuencias de este estudio se agruparon con secuencias del Subtipo B, mas no con formas recombinantes circulantes (CRF). Las secuencias colombianas no forman un grupo monofilético sino que están entremezcladas con secuencias de referencia del Subtipo B aisladas en otros países de Suramérica. Sin embargo, la mayoría de los soportes de rama son bajos (<70), lo cual impide hacer inferencias sobre número de introducciones del virus en la población estudiada.

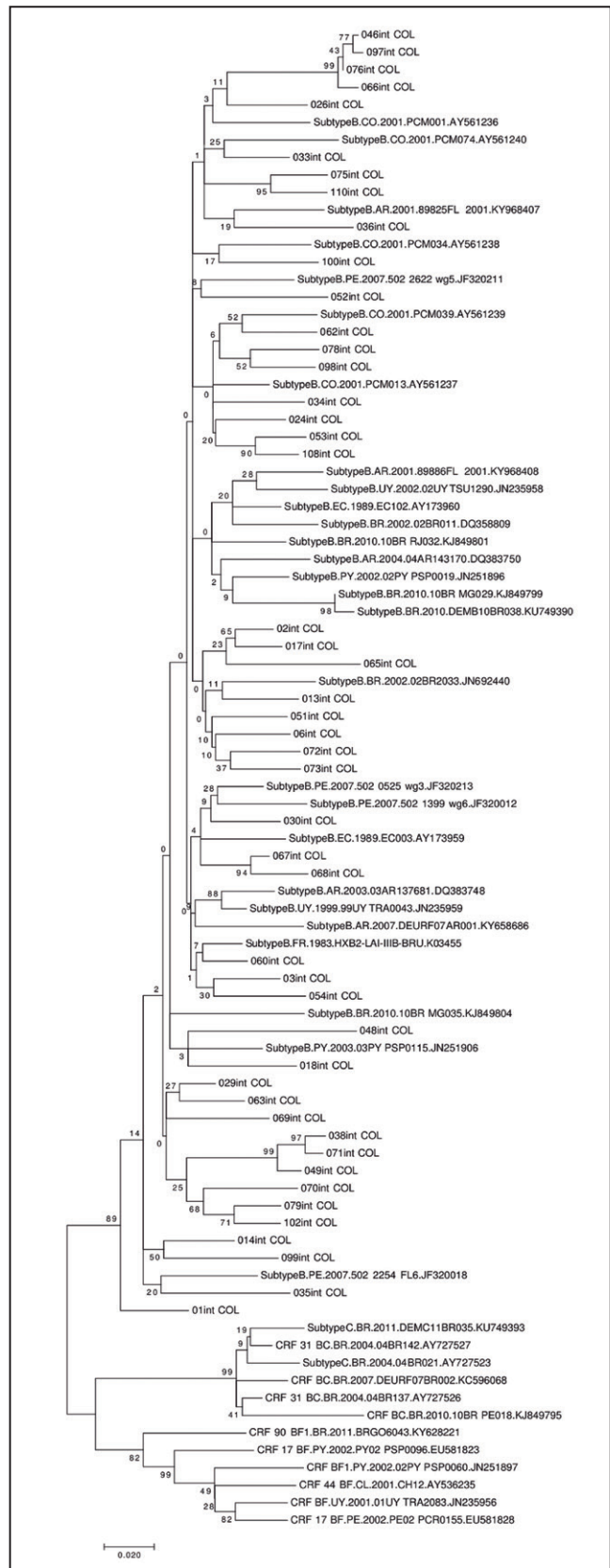


Figura 2. Análisis filogenético molecular de 50 secuencias del gen integrasa de VIH-1. El árbol filogenético fue inferido por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo General de Tiempo Reversible utilizando las secuencias de integrasa obtenidas en este estudio y otras secuencias reportadas en Suramérica, incluyendo formas recombinantes circulantes.

Los resultados de la prueba de neutralidad de Tajima *D*, incluyendo los sitios segregantes, el índice de polimorfismo nucleotídica y la diversidad nucleotídica, se muestran en la tabla 2, donde se presentan 222 sitios segregantes y una diversidad nucleotídica baja (0.049). La *D* de Tajima arrojó un valor negativo sin diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 2. Estimaciones de diversidad nucleotídica del gen de integrasa de 50 pacientes *naïve* crónicamente infectados con VIH-1 en Medellín, Colombia

n	%AT	θ	π	Tajima's D
50	58,6	0,083579	0,04953	-1,109*

N: número de secuencias; %AT: porcentaje de adenina-timina, θ : índice de polimorfismo nucleotídico; π : índice de diversidad nucleotídica; * $p > 0,05$.

De igual forma, se identificaron 150 sitios polimorfismos en las secuencias evaluadas (Tabla 3). Las mutaciones observadas y potencialmente asociadas a resistencia a los InSTI, con su respectiva frecuencia y fenotipo asociado, se muestran en la Tabla 4. El 2,2% de las secuencias presentan la mutación mayor E138K; además, se encontraron tres mutaciones accesorias mayores de resistencia: G163E, L74I y E157Q, con frecuencias del 6,4%, 6,0% y 4,2%, respectivamente. La mutación no polimórfica seleccionada *in vitro* por EVG, A128T, fue observada con frecuencia del 2,0%.

Sumado a lo anterior, en la posición 230, donde la mutación asociada con resistencia es S230R, se observó la sustitución S230N en el 23,1% de las secuencias. De igual forma, fue observada (con su respectiva frecuencia) las siguientes variantes aminoacídicas en la posición 119: S119P (29,8%), S119R (8,5%) y S119T (4,2%).

De las 50 muestras evaluadas, seis secuencias presentaban combinación de sustituciones de mutaciones accesorias con otras mutaciones reportadas *in vitro* asociadas con resistencia a antirretrovirales, mientras que sólo una secuencia presentaba combinación con una mutación mayor (Tabla 5).

Discusión

A pesar de la introducción de los InSTI al mercado colombiano desde el año 2010 y de múltiples reportes de mutaciones asociadas a resistencia a InSTI en otros países²⁰, en Colombia no se han descrito dichas mutaciones en población crónicamente infectada con VIH-1.

En este estudio, realizado con secuencias de integrasa aisladas de pacientes *naïve* para el tratamiento, se observó un test de neutralidad negativo sin valor estadísticamente significativo, valor que no permite rechazar la hipótesis de neutralidad y, por lo tanto, aceptar que no se ejerció presión selectiva sobre las mutaciones²¹.

Sumado a lo anterior, se identificaron varias mutaciones que se asocian con resistencia a InSTI. La E138K es una mutación mayor que es seleccionada por el tratamiento por RAL, EVG

y DTG. Cuando se acompaña de mutaciones como Q148⁸ ó R263²² disminuye la susceptibilidad del virus a los InSTI. Dado que en este estudio no se identificaron mutaciones en las posiciones 148 ó 263, la presencia de la E138K en un individuo de este estudio sugiere exposición del virus a uno de estos medicamentos en un paso anterior en la cadena de transmisión, pero no necesariamente implica resistencia en el individuo portador.

La mutación E157Q es seleccionada *in vivo* por RAL e *in vitro* por EVG²³. Un estudio realizado en Polonia en pacientes *naïve* para el tratamiento reportó esta mutación en menos del 1%²⁴; en la población de este estudio se encontró dicha mutación en una frecuencia del 4,2%. La E157Q disminuye casi cinco veces la susceptibilidad a RAL y dos veces a EVG en individuos previamente tratados^{25,26}. Respecto a DTG, Danion y colaboradores reportaron falla virológica en un paciente con la mutación E157Q, adherente al esquema de tratamiento, en ausencia de mutaciones de resistencia para inhibidores de transcriptasa reversa y de proteasa²⁷. Lo anterior indica que la E157Q puede comportarse como una mutación mayor, aunque suele clasificarse como mutación accesorias mayor²³. La mutación S230N, observada con una frecuencia del 23,7% en este estudio, no se ha asociado a resistencia clínica a InSTI, pero en un estudio *in vitro* se observó que, cuando se acompaña de las mutaciones mayores G140S y Q148H, disminuye marcadamente la susceptibilidad a RAL²⁸. Su alta frecuencia en la población de Medellín podría predisponer a la selección de las citadas mutaciones y a la aparición de resistencia a RAL en personas que se expongan a dicho medicamento.

Un paciente de este estudio tenía la mutación A128T, reportada también en estudios europeos con frecuencias entre 1 y 2% en pacientes no tratados²⁹. Según la base de datos de VIH de Stanford, la A128T es una mutación accesorias seleccionada *in vitro* por EVG pero que no se ha asociado con resistencia a InSTI²³; sin embargo, varios reportes indican que esta mutación induce resistencia a un nuevo grupo de fármacos que actúan impidiendo la multimerización de la integrasa con moléculas como el "factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino" (LEDGF), un cofactor requerido en la integración del genoma viral^{30,31}. Estas nuevas drogas, llamadas LEDGIN, son inhibidores alostéricos de la integrasa y pueden constituir un recurso terapéutico importante en el futuro³²; sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia de la mutación A128T podría conferir resistencia primaria a estos nuevos medicamentos.

En este estudio los polimorfismos en la posición 119 de la integrasa se presentaron con frecuencias altas (29,8%, 8,5%, y 4,2% para, S119P, S119R y S119T, respectivamente), similar al 26% reportado para el conjunto de estas mutaciones en un estudio en 458 secuencias de VIH-1 subtipo B de individuos *naïve* para el tratamiento³³. Mutaciones del residuo S119 tienden a acompañar a las mutaciones mayores N155H y Q148H/R; en particular la S119R se ha asociado a falla virológica en pacientes en tratamiento con RAL.

Tabla 3. Perfil de mutaciones aminoacídicas en el gen de integrasa de 50 pacientes naive crónicamente infectados con VIH-1 en Medellín, Colombia

Posición (n)	Aminoácido silvestre	Polimorfismo	Frecuencia (%)
2 (47)	Leucina	Isoleucina	2,13
6 (47)	Ácido aspártico	Ácido glutámico	6,38
		Metionina	2,13
		Serina	2,13
7 (45)	Lisina	Glutamina	6,66
		Metionina	2,22
		Arginina	2,22
10 (46)	Ácido glutámico	Ácido aspártico	4,34
		Alanina	2,17
11 (45)	Ácido glutámico	Ácido aspártico	44,40
13 (44)	Ácido glutámico	Ácido aspártico	4,45
14 (45)	Lisina	Arginina	4,44
17 (47)	Serina	Asparagina	14,89
		Treonina	4,25
20 (46)	Arginina	Lisina	2,17
21 (47)	Alanina	Treonina	10,64
22 (47)	Metionina	Lisina	2,13
23 (46)	Alanina	Valina	2,17
24 (47)	Serina	Asparagina	8,51
		Ácido aspártico	2,13
25 (46)	Ácido aspártico	Ácido glutámico	2,13
27 (45)	Asparagina	Histidina	2,13
		Arginina	2,13
28 (42)	Leucina	Isoleucina	16,66
		Metionina	2,38
30 (47)	Prolina	Alanina	6,38
		Serina	2,13
31 (45)	Valina	Arginina	33,33
32 (47)	Treonina	Isoleucina	6,38
34 (45)	Lisina	Glutamina	2,22
37 (45)	Serina	Isoleucina	6,66
38 (47)	Alanina	Metionina	2,13
39 (44)	Glutamina	Cisteína	29,54
		Asparagina	4,54
41 (45)	Ácido aspártico	Asparagina	2,22
42 (45)	Lisina	Arginina	2,22
45 (45)	Leucina	Glutamina	8,88
		Histidina	6,66
		Valina	2,22
50 (46)	Metionina	Isoleucina	13,04

56 (47)	Cisteína	Tirosina	2,13
59 (46)	Glicina	Ácido glutámico	6,52
60 (46)	Isoleucina	Metionina	4,37
		Valina	2,17
70 (45)	Glicina	Ácido aspártico	6,66
		Ácido glutámico	2,22
71 (46)	Lisina	Glutamina	2,17
72 (44)	Isoleucina	Treonina	47,73
		Alanina	2,27
74 (50)	Leucina	Isoleucina	6,00
89 (47)	Isoleucina	Leucina	6,38
90 (46)	Prolina	Serina	2,17
96 (47)	Ácido glutámico	Valina	2,13
101 (44)	Leucina	Isoleucina	43,18
		Valina	2,23
103 (47)	Lisina	Arginina	2,13
110 (46)	Valina	Isoleucina	4,34
111 (43)	Lisina	Treonina	9,30
		Ácido glutámico	2,32
		Glicina	2,32
		Arginina	2,32
112 (46)	Treonina	Isoleucina	9,09
		Valina	6,82
		Alanina	6,82
		Arginina	2,27
113 (46)	Isoleucina	Valina	6,52
119 (47)	Serina	Prolina	29,80
		Arginina	8,50
		Treonina	4,20
122 (43)	Treonina	Isoleucina	25,58
		Valina	2,32
124 (41)	Treonina	Alanina	24,39
		Metionina	17,07
125 (42)	Treonina	Alanina	33,33
		Valina	7,14
		Prolina	2,38
126 (43)	Valina	Metionina	4,65
		Leucina	2,32
128 (49)	Alanina	Treonina	2,00
135 (47)	Isoleucina	Valina	4,25
136 (46)	Lisina	Arginina	2,17
138 (46)	Ácido glutámico	Lisina	2,20

139 (47)	Fenilalanina	Leucina	2,17
154 (47)	Leucina	Isoleucina	4,25
156 (47)	Lisina	Glutamina	19,15
157 (48)	Ácido glutámico	Glutamina	4,20
160 (46)	Lisina	Ácido glutámico	2,17
163 (46)	Glicina	Ácido glutámico	6,52
165 (47)	Valina	Isoleucina	10,63
167 (46)	Ácido aspártico	Ácido glutámico	2,17
171 (46)	Histidina	Leucina	2,17
175 (47)	Alanina	Valina	2,13
181 (47)	Fenilalanina	Leucina	2,13
187 (45)	Glutamina	Lisina	4,44
188 (47)	Lisina	Arginina	2,13
193 (46)	Glutamina	Ácido glutámico	4,34
196 (46)	Alanina	Prolina	2,17
198 (45)	Ácido glutámico	Ácido aspártico	2,22
		Histidina	2,22
		Glutamina	2,22
201 (43)	Isoleucina	Valina	34,88
		Leucina	2,32
203 (42)	Isoleucina	Metionina	14,28
205 (41)	Alanina	Serina	2,44
		Treonina	2,44
206 (42)	Treonina	Serina	21,43
207 (40)	Ácido aspártico	Asparagina	7,50
208 (40)	Isoleucina	Leucina	15,00
210 (41)	Treonina	Serina	2,43
211 (41)	Lisina	Glutamina	2,43
		Arginina	2,43
		Treonina	2,43
212 (42)	Ácido glutámico	Alanina	2,38
		Glutamina	2,38
		Valina	2,38
214 (41)	Glutamina	Ácido glutámico	2,43
215 (41)	Lisina	Asparagina	7,31
216 (41)	Glutamina	Histidina	9,75
		Asparagina	7,31
218 (40)	Treonina	Serina	15,00
		Isoleucina	5,00

219 (39)	Lisina	Asparagina	2,56
220 (39)	Isoleucina	Leucina	12,82
		Metionina	5,12
		Valina	2,56
221 (39)	Glutamina	Ácido glutámico	2,56
222 (39)	Asparagina	Lisina	2,56
		Serina	2,56
227 (39)	Tirosina	Fenilalanina	12,82
229 (39)	Ácido aspártico	Ácido glutámico	2,63
230 (39)	Serina	Asparagina	23,10
232 (36)	Ácido aspártico	Ácido glutámico	8,33
234 (38)	Leucina	Isoleucina	7,89
251 (34)	Isoleucina	Valina	2,94
252 (33)	Glutamina	Lisina	3,03
253 (33)	Ácido aspártico	Ácido glutámico	3,03
254 (32)	Asparagina	Glutamina	9,37
		Lisina	3,12
		Serina	3,12
255 (33)	Arginina	Glicina	12,12
256 (33)	Ácido aspártico	Ácido glutámico	24,24
265 (27)	Alanina	Treonina	7,40
266 (27)	Lisina	Treonina	3,70
275 (25)	Metionina	Valina	4,00
279 (25)	Ácido aspártico	Glicina	4,00
281 (25)	Treonina	Metionina	8,00
283 (23)	Serina	Glicina	8,69
286 (23)	Ácido aspártico	Asparagina	8,69
287 (23)	Ácido glutámico	Alanina	8,69
288 (20)	Ácido aspártico	Asparagina	5,00

El mismo estudio demostró que la mutación S119R disminuye significativamente la sensibilidad *in vitro* a los InSTI cuando acompaña a las mutaciones Y143C, Q148H, N155H, G140S/Q148H o T97A/Y143C³³.

Finalmente, la mutación L74I fue observada con una frecuencia del 6,0%. L74I y L74M se han clasificado como mutaciones accesorias mayores pero también como polimorfismos naturales con frecuencias entre 0,5 – 20,0% en la integrasa de pacientes no tratados en diferentes estudios²³; sin embargo, en combinación con Q148H/K/R o N155H, L74I puede generar resistencia a RAL y disminución de la susceptibilidad *in vitro* y de la respuesta virológica a DTG⁸.

Tabla 4. Mutaciones detectadas asociadas con resistencia a los inhibidores de integrasa (InSTI).

Substitución	Frecuencia (%)	Clasificación	Fenotipo	Puntajes de penalidad ^e		
				RAL	EVG	DTG
E138K	1/46 (2,2)	Mutación mayor ^a	Mutación no polimórfica accesoria asociada a resistencia seleccionada en pacientes que reciben RAL, EVG y DTG.	15	15	10
L74I	3/50 (6,0)	Mutación accesoria mayor ^b	Mutación polimórfica que no reduce la sensibilidad a los INI	-	-	-
E157Q	2/48 (4,2)		Mutación polimórfica seleccionada débilmente en pacientes que reciben RAL e seleccionada <i>in vitro</i> por EVG	0	5	5
A128T	1/49 (2,0)	Misceláneas ^c	Mutación no polimórfica asociada con resistencia <i>in vitro</i> al EVG.	-	-	-
S230N	9/39 (23,1)	Otras ^d	Mutación asociada a resistencia a RAL cuando está acompañada por las mutaciones G140S y Q148H	-	-	-
S119R	4/47 (8,5)		Mutación asociada a falla virológica en pacientes tratados con RAL.	-	-	-
S119T	2/47 (4,2)		Mutaciones que inducen una baja resistencia a INI	-	-	-
S119P	14/47 (29,8)			-	-	-

^a**Mutación mayor:** sustitución no polimórfica que juega un papel importante en la reducción de la susceptibilidad a uno o más InSTI. ^b**Mutación accesoria mayor:** sustitución en posiciones no polimórficas o mínimamente polimórficas que contribuyen a reducir la susceptibilidad en combinación con una o más mutaciones mayores. También se incluyen sustituciones altamente inusuales y mal caracterizadas en las principales posiciones de resistencia a los fármacos. ^c**Misceláneas:** mutaciones que no están asociadas con la resistencia a los medicamentos, incluye mutaciones en sitios polimórficos que pueden estar débilmente asociadas con resistencia a los fármacos. ^d**Otras:** mutaciones no reportadas por la base de datos de Stanford pero que, en ensayos *in vitro*, se han asociado con resistencia a InSTI. ^e**Puntaje de penalidad:** Nivel estimado de resistencia a un medicamento, el cual es considerado como susceptible si el puntaje se encuentra entre 0 a 9, potencial bajo nivel de resistencia con un cuando el puntaje esta entre 10 a 15, y bajo nivel de resistencia con puntajes entre 15 a 29.

Tabla 5. Combinación de mutaciones asociadas con resistencia a los inhibidores de integrasa (InSTI).

Sustituciones	Frecuencia (%)
E138K, S119P	1/50 (2,0)
L74I, S119P	1/50 (2,0)
L74I, S230N	1/50 (2,0)
S119P, S230N	3/50 (6,0)
S119R, S230N	1/50 (2,0)

En resumen, en este estudio encontramos una baja frecuencia de mutaciones mayores de resistencia a InSTI y frecuencias variables de mutaciones accesorias y polimorfismos asociados a resistencia, resultado esperado en una población no tratada y en un momento temprano del uso de esta familia de medicamentos. Sin embargo, la frecuencia de dichas mutaciones podría incrementarse a medida que el uso de los InSTI se extienda y con la eventual introducción de nuevos tipos de medicamentos dirigidos a la integrasa viral, como los inhibidores alostéricos.

Limitaciones

La mayor limitación de este estudio es el bajo número de secuencias analizadas y el muestreo restringido a pacientes de una sola ciudad y una única institución asistencial, por lo cual estos resultados deben evaluarse en conjunto con estudios que se realicen en otras poblaciones de Colombia. De esta forma se podrán formular recomendaciones sobre en quienes y en cual momento sería conveniente realizar pruebas genotípicas que incluyan el gen de integrasa antes del inicio de la terapia.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales: Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos: Los autores declaran que en este artículo no aparece la identidad de los participantes del estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado: Los autores declaran que no se reporta la identidad de los participantes en el texto ni en imágenes o tablas. De cada participante se obtuvo un consentimiento informado por escrito,

acorde con la resolución No 008430 de 1993 en la que se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

Conflicto de interés

Los autores no reportan conflictos de intereses.

Financiación

COLCIENCIAS Código 111556933380 y Universidad de Antioquia UdeA

Bibliografía

- UNAIDS [Internet] United Nations Program HIV/AIDS. 2017:1-248; [Citado 2018 feb 25]. Disponible en: http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017_data_book
- Hughes A., Barber T., Nelson M. New treatment options for HIV salvage patients: An overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists. *J Infect.* 2008;1-10.
- Sluis-Cremer N., Wainberg MA., Schinazi RF. Resistance to reverse transcriptase inhibitors used in the treatment and prevention of HIV-1 infection. *Future Microbiol.* 2015;10:1773-82.
- Wittkop L., G?nthard HF., de Wolf F., Dunn D., Cozzi-Lepri A., de Luca A., et al. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): A European multicohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(5):363-71.
- Hazuda DJ., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler JA., et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science.* 2000;287(5453):646-50.
- Cooper DA., Steigbigel RT., Gatell JM., Rockstroh JK., Katlama C., Yeni P., et al. Subgroup and Resistance Analyses of Raltegravir for Resistant HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 2008;359(4):355-65.
- Malet I., Delelis O., Valantin MA., Montes B., Soulie C., Wirden M., et al. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1351-8.
- Andreoni M., Marcotullio S., Puro V., De Carli G., Tambussi G., Nozza S., et al. An update on integrase inhibitors: New opportunities for a personalized therapy?: The NEXTaim Project. *New Microbiol.* 2015:443-90.
- Abram ME., Hluhanich RM., Goodman DD., Andreatta KN., Margot NA., Ye L., et al. Impact of primary elvitegravir resistance-associated mutations in HIV-1 integrase on drug susceptibility and viral replication fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2654-63.
- Weller S., Borland J., Chen S., Johnson M., Savina P., Wynne B., et al. Pharmacokinetics of dolutegravir in HIV-seronegative subjects with severe renal impairment. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014:29-35.
- Nguyen H Le., Ruxrungtham K., Delaugerre C. Genetic Barrier to the Development of Resistance to Integrase Inhibitors in HIV-1 Subtypes CRF01_AE and B. *Intervirology.* 2012;55(4):103-11.
- Young B., Fransen S., Greenberg KS., Thomas A., Martens S., St Clair M., et al. Transmission of integrase strand-transfer inhibitor multidrug-resistant HIV-1: Case report and response to raltegravir-containing antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 2011;16(2):253-6, doi: 10.3851/IMP1748.
- Nadai Y., Eyzaguirre LM., Constantine NT., Sill AM., Cleghorn F., Blattner WA., et al. Protocol for nearly full-length sequencing of HIV-1 RNA from plasma. *PLoS One.* 2008;3(1).
- Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 2008;9(4):299-306.
- Edgar RC. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* 2004;5.
- Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* vol. 154. vol. 154. 2000.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol Biol Evol.* 2015;submitted(12):2725-9.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio JC., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins SE., et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol.* 2017.
- Liu TF., Shafer RW. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis.* 2006;42(11):1608-18.
- Ambrosioni J., Nicolás D., Manzardo C., Agüero F., Blanco JL., Mosquera MM., et al. Integrase strand-transfer inhibitor polymorphic and accessory resistance substitutions in patients with acute/recent HIV infection. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):205-9.
- Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989;123(3):585-95.
- Quashie PK., Oliviera M., Veres T., Osman N., Han Y-S., Hassounah S., et al. Differential effects of the G118R, H51Y, and E138K resistance substitutions in different subtypes of HIV integrase. *Am Soc Microbiol.* 2014;89(6):3163-75.
- Stanford University. HIV Drug Resistance Database [Internet]. INSTI Resistance Notes. [accedido 25 febrero 2017]. Disponible en: <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/>.
- Parczewski M., Bander D., Urbańska A., Boroń-Kaczmarska A. HIV-1 integrase resistance among antiretroviral treatment naïve and experienced patients from Northwestern Poland. *BMC Infect Dis.* 2012;12:368.
- Shimura K., Kodama E., Sakagami Y., Matsuzaki Y., Watanabe W., Yamataka K., et al. Broad Antiretroviral Activity and Resistance Profile of the Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol.* 2008;82(2):764-74.
- Ceccherini-Silberstein F., Van Baelen K., Armenia D., Trignetti M., Rondelez E., Fabeni L., et al. Secondary integrase resistance mutations found in HIV-1 minority quasispecies in integrase therapy-naïve patients have little or no effect on susceptibility to integrase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3938-48.
- Danion F., Belissa E., Peytavin G., Thierry E., Lanterner F., Scemla A., et al. Non-virological response to a dolutegravir-containing regimen in a patient harbouring a E157Q-mutated virus in the integrase region. *J Antimicrob Chemother.* 2014;70(6):1921-3.
- Buzón MJ., Dalmau J., Puertas MC., Puig J., Clotet B., Martínez-Picado J. The HIV-1 integrase genotype strongly predicts raltegravir susceptibility but not viral fitness of primary virus isolates. *AIDS.* 2010;24(June 2009):17-25.
- Casadellà M., van Ham PM., Noguera-Julian M., van Kessel A., Pou C., Hofstra LM., et al. Primary resistance to integrase strand-transfer inhibitors in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(10):2885-8.
- Jurado KA., Wang H., Slaughter A., Feng L., Kessl JJ., Koh Y., et al. Allosteric integrase inhibitor potency is determined through the inhibition of HIV-1 particle maturation. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(21):8690-5.
- Feng L., Sharma A., Slaughter A., Jena N., Koh Y., Shkriabai N., et al. The A128T resistance mutation reveals aberrant protein multimerization as the primary mechanism of action of allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *J Biol Chem.* 2013;288(22):15813-20.
- Christ F., Debyser Z. The LEDGF/p75 integrase interaction, a novel target for anti-HIV therapy. *Virology.* 2013:102-9.
- Hachiya A., Ode H., Matsuda M., Kito Y., Shigemitsu U., Matsuoka K., et al. Natural polymorphism S119R of HIV-1 integrase enhances primary INSTI resistance. *Antiviral Res.* 2015;119:84-8.