

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE UN PROGRAMA DE INTERRUPCIONES
ESTRUCTURADAS DE TARAA EN CICLOS DE 4/12 SEMANAS EN NIÑOS
CON SIDA Y CARGA VIRAL CRÓNICAMENTE INDETECTABLE**

Por:

GERARDO DEL CARMEN PALACIOS SAUCEDO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
Con Especialidad en Microbiología**

Diciembre 2010

**EVALUACIÓN DE UN PROGRAMA DE INTERRUPCIONES
ESTRUCTURADAS DE TARAA EN CICLOS DE 4/12 SEMANAS EN NIÑOS
CON SIDA Y CARGA VIRAL CRÓNICAMENTE INDETECTABLE**

Comité de Tesis

Dra Cristina Rodríguez Padilla
Director de la tesis

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales
Secretario

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Vocal

Dr Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dr Humberto H. Lara Villegas
Vocal

DEDICATORIA

A mi amante y eterno Dios

Porque lo que soy, lo que tengo y lo que hago se lo debo sólo a
Él

“Porque en él vivimos, y nos movemos, y somos” (Hechos 17:28).

Con todo cariño a mi esposa

Martha Socorro Montalvo Bañuelos

Y a mi pequeñita hija

Cesia Anaís

Por su amor, apoyo y comprensión

Y porque llevaron sobre ellas buena parte de la carga de este trabajo

A mis padres

Javier Palacios Flores y

Rosa María Saucedo Venegas

Por su apoyo y tenacidad, y

Por su herencia de trabajo y dedicación

A todos los que de alguna manera contribuyeron

Para que esta tesis llegara a su término,

MUCHAS GRACIAS

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de investigación fue financiado:

Por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el proyecto titulado: “EVALUACION DE UN PROGRAMA DE INTERRUPCIONES ESTRUCTURADAS DE HAART EN CICLOS DE 4/12 SEMANAS EN NIÑOS CON SIDA Y CARGA VIRAL CRONICAMENTE INDETECTABLE” (FIS/IMSS/PROT/416).

Por el programa de apoyo a la investigación científica y tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León titulado “ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES DE PROTEASA Y TRANSCRIPTASA EN REVERSA EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH” (Clave SA 209-09).

Por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) mediante el proyecto titulado: “EVALUACION DE UN PROGRAMA DE INTERRUPCIONES ESTRUCTURADAS DE HAART EN CICLOS DE 4/12 SEMANAS EN NIÑOS CON SIDA Y CARGA VIRAL CRONICAMENTE INDETECTABLE” (2005/1/1/071).

ÁREA DE TRABAJO

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN:

- LA UNIDAD DE INFECTOLOGÍA MOLECULAR (UIMO) DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, U.A.N.L. BAJO LA DIRECCIÓN GENERAL DE LA DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA Y DE LA DRA. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES.
- EL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, SERVICIO DE INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA, DE LA UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD HOSPITAL DE ESPECIALIDADES NÚMERO 25, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.
- EL LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, SECRETARÍA DE SALUD, MONTERREY, NUEVO LEÓN.

TABLA DE CONTENIDOS

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	v
NOMENCLATURA.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos específicos.....	4
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Marco histórico.....	6
4.2 Situación actual del VIH/SIDA.....	7
4.2.1 Situación mundial.....	7
4.2.2 Situación en México.....	9
4.3 Virus de Inmunodeficiencia Humana.....	12
4.3.1 Clasificación, estructura y genoma.....	12
4.3.2 Ciclo de replicación viral.....	15
4.3.3 Subtipos del Virus de Inmunodeficiencia Humana.....	17
4.4 Terapia antirretroviral y resistencia.....	17
4.5 Tratamiento antirretroviral en niños.....	21
4.6 Interrupciones estructuradas en el manejo de la infección por VIH.....	27
4.6.1 Beneficios y riesgos potenciales.....	27
4.6.2 Interrupciones estructuradas en adultos.....	28
4.6.1 Interrupciones estructuradas en niños.....	29

5. MÉTODOS.....	31
5.1. Estrategia experimental general.....	31
5.2 Estrategia en cada fase del estudio.....	38
5.2.1 Fase 1: Evaluación inicial de la respuesta a las interrupciones.....	38
5.2.1.1 Evaluación de la respuesta virológica.....	39
5.2.1.2 Evaluación de la respuesta inmunológica proliferativa.....	39
5.2.1.3 Evaluación de la respuesta clínica.....	40
5.2.1.4 Criterios de respuesta a la maniobra experimental.....	40
5.2.2 Fase 2: Evaluación de resistencia genotípica.....	42
5.2.2.1 Toma y características de las muestras para genotipos.....	42
5.2.2.2 Extracción de ARN viral.....	43
5.2.2.3 Preparación de reactivos para extracción de ARN viral.....	43
5.2.2.4 Protocolo de extracción de ARN viral.....	45
5.2.2.5 Síntesis de ADN complementario.....	46
5.2.2.6 Amplificación de proteasa y transcriptasa reversa (TR).....	46
5.2.2.7 Verificación de productos de amplificación.....	50
5.2.2.8 Verificación del ADNc por PCR en tiempo real.....	51
5.2.2.9 Secuenciación y evaluación de las secuencias.....	51
5.2.2.10 Determinación de mutaciones asociadas a resistencia.....	54
5.2.2.10.1 Interpretación de resistencia a inhibidores proteasa (IP).....	55
5.2.2.10.2 Interpretación de resistencia a inhibidores de TR.....	56
5.2.3 Fase 3: Evaluación de respuesta inmune específica contra VIH....	57
5.2.3.1 Toma y características de las muestras.....	57
5.2.3.2 Evaluación de la síntesis inducida de IFN- γ	57
5.2.3.2.1 Obtención de antígeno viral.....	57
5.2.3.2.2 Extracción de células mononucleares (CMNSP).....	58
5.2.3.2.3 Estimulación de CMSP con antígeno viral.....	58
5.2.3.2.4 Determinación cuantitativa de IFN- γ	59

6. RESULTADOS.....	60
6.1 Fase 1: Evaluación inicial de la respuesta a las interrupciones.....	60
6.1.1 Características generales de los pacientes.....	60
6.1.2 Respuesta virológica.....	61
6.1.3 Respuesta inmunológica.....	64
6.1.4 Respuesta clínica y adherencia al tratamiento.....	66
6.2 Fase 2: Determinación de resistencia antirretroviral.....	66
6.2.1 Amplificación de genes de proteasa y TR.....	67
6.2.2 Verificación del ADNc por PCR en tiempo real.....	71
6.2.3 Análisis de secuencias de proteasa y TR.....	72
6.2.4 Determinación del subtipo viral.....	75
6.2.5 Interpretación de susceptibilidad a inhibidores de proteasa.....	75
6.2.6 Interpretación de susceptibilidad a inhibidores de TR.....	77
6.3 Fase 3: Desarrollo de respuesta inmune específica vs. VIH.....	80
6.3.1 Características generales de los pacientes de esta etapa.....	80
6.3.2 Seguimiento virológico y de respuesta inmune proliferativa.....	81
6.3.3 Síntesis de IFN- γ por células mononucleares expuestas a VIH.....	83
7. DISCUSION.....	86
7.1 Fase 1.....	86
7.2 Fase 2.....	91
7.3 Fase 3.....	95
8. CONCLUSIONES.....	99
APÉNDICE.....	102
LITERATURA CITADA.....	106
RESÚMEN BIOGRÁFICO.....	117
LOGROS ALANZADOS.....	118

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por permitirme colaborar en su equipo de trabajo para el desarrollo de este proyecto de investigación, pero en especial por su amistad sincera y liderazgo.

A la Dra. Lydia G. Rivera Morales, por su apoyo y su asesoría incondicionales para la realización de este trabajo de investigación, pero también en especial por su sincera amistad y entusiasmo.

A mi comité de tesis: Dr. Juan Manuel Alcocer González, Dr. Pablo Zapata Benavides, Dr. Humberto H. Lara Villegas, Dr. Juan Francisco Contreras y Dra. Lydia G. Rivera Morales, por su dirección y múltiples comentarios que enriquecieron este trabajo de tesis.

A todos los profesores, investigadores, personal técnico y administrativo y alumnos del Laboratorio de Inmunología y Virología, por todo el apoyo proporcionado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Carlos Alberto Vázquez Martínez y todo el personal de la Dirección de Educación e Investigación en Salud de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades No. 25 del IMSS, por todo su apoyo.

A todos los demás investigadores que participaron directamente en la realización de este estudio.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Resumen de las cifras estimadas de población infectada por VIH-1 a nivel mundial por región geográfica para el año 2008 según la ONUSIDA.....	8
2. Índice de casos acumulados de SIDA por categoría de transmisión del VIH/SIDA en México al 30 de Junio de 2010.....	9
3. Casos acumulados de SIDA por edad y sexo en México al 30 de Junio de 2009.....	11
4. Casos nuevos y acumulados de SIDA pediátricos por categoría de transmisión y sexo en México al 30 de Junio de 2009.....	11
5. Genes que constituyen el genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y sus funciones más importantes.....	14
6. Drogas antirretrovirales actualmente en uso clínico de acuerdo a su mecanismo de acción.....	19
7. Revisión 2009 de la Clasificación Clínica Pediátrica de la Infección por VIH de 1994 del CDC, EUA.....	23
8. Categorías inmunológicas de la enfermedad causada por el VIH en la edad pediátrica (CDC 1994).....	25
9. Clasificación clínico-inmunológica de la enfermedad por VIH en la edad pediátrica (CDC 1994).....	25
10. Recomendaciones para el inicio de tratamiento ARV en Pediatría.....	26
11. Riesgos y beneficios potenciales de las Interrupciones Estructuradas del Tratamiento Antirretroviral.....	28
12. Mezcla para preparar la “ <i>Lysis/Binding Solution</i> ” para la extracción de ARN viral empleando el “ <i>MagMAX Viral RNA Isolation Protocol</i> ” (Ambion, Austin, TX).....	44

13.	Componentes para preparar el “ <i>Bead Mix</i> ” para extracción de ARN viral empleando el “ <i>MagMAX Viral RNA Isolation Protocol</i> ” (Ambion, Austin, TX).....	44
14.	Mezcla de reacción al 2X para la síntesis de ADNc usando el <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i> (Applied Biosystems, Foster City, CA).....	46
15.	Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes de la proteasa y de los fragmentos 5’ , intermedio y 3’ de la transcriptasa reversa.....	48
16.	Condiciones de reacción para la amplificación de los genes de la proteasa y de los fragmento 5’ y 3’ de la transcriptasa reversa.....	49
17.	Condiciones de amplificación para los genes de la proteasa y de los fragmentos 5’ , intermedio y 3’ de la transcriptasa reversa.....	50
18.	Condiciones de amplificación para el fragmento 3’ de la transcriptasa reversa mediante PCR en Tiempo Real empleando <i>SYBR Green</i>	51
19.	Condiciones de amplificación para la reacción de secuenciación.....	52
20.	Condiciones para el marcaje de los productos de PCR empleando el <i>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i> (Applied Biosystems).....	53
21.	Protocolo para la purificación de los productos marcados para la secuenciación.	54
22.	Características basales de cuatro niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento.....	61
23.	Carga viral y linfocitos T de cuatro niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento.....	63
24.	Muestras de los rebotes virológicos incluidas en la evaluación de mutaciones relacionadas con resistencia a antirretrovirales de cuatro niños incluidos en el programa de interrupciones estructuradas (IET) en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con TARAA. Las muestras fueron tomadas al final de cada período de interrupción de TARAA de cuatro semanas.....	67
25.	Interpretación genotípica de resistencia a Inhibidores de la Proteasa (IP) en las muestras correspondientes a los tres rebotes virológicos del paciente No. 3. <i>HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Universidad de Stanford</i>	76

26.	Interpretación genotípica de resistencia a Inhibidores de la Proteasa (IP) en las muestras correspondientes a los dos primeros rebotes virológicos del paciente No. 4. <i>HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Universidad de Stanford</i>	77
27.	Interpretación genotípica de resistencia a Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Nucleósidos (ITRAN) y no nucleósidos (ITRNN) en las muestras correspondientes a los tres rebotes virológicos del paciente No. 3. <i>HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Universidad de Stanford</i>	78
28.	Interpretación genotípica de resistencia a Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Nucleósidos (ITRAN) y no nucleósidos (ITRNN) en las muestras correspondientes a los tres rebotes virológicos del paciente No. 4. <i>HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Universidad de Stanford</i>	79
29.	Características basales de seis niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento para evaluar la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica inducida por un lisado de VIH-1....	81
30.	Carga viral y linfocitos T CD4+/CD8+ de seis niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento para medir la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica inducida por VIH.....	82
31.	Niveles de IFN- γ (pg/mL) en el sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica expuestas a un lisado de VIH 1. Las células fueron obtenidas de seis niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura básica del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Adaptado de: <i>Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (INAEI), EUA</i> [Disponible en: www3.niaid.nih.gov].	13
2. Ciclo de replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1). Adaptado de: <i>Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (INAEI), EUA</i> [Disponible en: www3.niaid.nih.gov].	15
3. Estrategia empleada para la evaluación clínica e inmunológica durante el programa IET de TARAA. *Evaluación de carga viral, cuentas de linfocitos T y clínica.	38
4. Estrategia empleada en el programa de IET de TARAA que incluye los tiempos en que fue realizada la genotipificación (final de cada período de interrupción).	43
5. Estrategia de amplificación del gen de la proteasa y transcriptasa reversa. La integrasa no fue incluida en el estudio, en la imagen se muestra para fines esquemáticos.	47
6. Estrategia empleada en el programa de IET que incluye los tiempos (marcados con un “*”) en que fueron tomadas las muestras para evaluar la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica al ser expuestas a antígeno de VIH.	57
7. Carga viral en número de copias de RNA / mL (cuadros llenos) y en \log_{10} de dicho número (círculos vacíos) de cuatro niños infectados con VIH-1 en un programa de interrupciones estructuradas del tratamiento (IET) en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con TARAA.	64
8. Porcentaje de linfocitos T CD4+ (triángulos llenos) y conteos absolutos de linfocitos T CD4+ (cuadros vacíos) y CD8+ (círculos vacíos) de cuatro niños infectos con VIH-1 en un programa de interrupciones estructuradas del tratamiento (IET) en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con TARAA.	65
9. Amplificación del fragmento 3' del gen de la transcriptasa reversa (RT) de la muestra correspondiente al segundo rebote virológico del paciente No. 2 (Muestra 7009) en gel de agarosa al 1.3%, teñido con bromuro de etidio.	68

10.	Amplificación de los genes de la proteasa y de la transcriptasa reversa (RT) de las muestras correspondientes a los tres períodos de interrupción de TARAA (rebotes virales) del paciente No. 3. Se observa la amplificación de la proteasa (566 pb), y los fragmentos de la RT 5' (592 pb), medio (631 pb) y 3' (345pb).....	69
11.	Amplificación de los genes de la proteasa y de la transcriptasa reversa (RT) de las muestras correspondientes a los tres períodos de interrupción de TARAA (rebotes virales) del paciente No. 4. Se observa la amplificación de la proteasa (566 pb) y de los fragmentos de la RT 5' (592 pb), medio (631 pb) y 3' (345pb).....	70
12.	Validación por PCR en tiempo real de la calidad de las muestras de ADNc. a) Curva de amplificación mediante PCR en tiempo real de las muestras de los pacientes No. 1 y No. 2. La única amplificación que se puede observar corresponde a la región 3' de la RT de la muestra 7009. b) Curva de disociación; el pico único que se observa corresponde a la muestra 7009 del paciente No. 2. La reacción fue realizada empleando la tecnología <i>SYBR Green</i> en el termociclador <i>StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)</i>	71
13.	Electroferograma obtenido de una de las reacciones de secuenciación. El análisis de secuencias fue realizando empleando el <i>Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)</i>	72
14.	Secuencias obtenidas del gen de la proteasa a partir de las muestras de los pacientes No. 3 y No. 4.....	73
15.	Secuencias obtenidas del gen de la transcriptasa reversa a partir de las muestras de los pacientes No. 3 y No. 4. Los puntos indican ausencia de bases en la secuencia.....	74
16.	Asignación de subtipo viral empleando la herramienta <i>REGA HIV-1 Subtyping Tool</i> . Se muestra el dato de salida para la muestra 6347 correspondiente al primer rebote viral del paciente No. 3.....	75
17.	Síntesis de Interferón-gamma (IFN- γ) por células mononucleares de sangre periférica expuestas a VIH-1 de seis niños infectados con VIH-1 sometidos a un programa de interrupciones estructuradas (IET) en ciclos de 4 semanas con / 12 semanas sin TARAA.....	84
18.	Síntesis de Interferón-gamma (IFN- γ) por células mononucleares de sangre periférica expuestas a VIH-1 (cuadros llenos), carga viral (círculos vacíos) y cifras absolutas de linfocitos T CD8+ (rombos llenos) y T CD4+ (triángulos vacíos) en seis niños infectados con VIH-1 en un programa de interrupciones estructuradas (IET) en ciclos de 4 semanas con / 12 semanas sin TARAA.....	85

NOMENCLATURA

TARAA	Terapia Antirretroviral Altamente Activa
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
CV	Carga Viral
ARV	Antirretroviral
IET	Interrupción (es) Estructurada (s)
CMNSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
ARN	Ácido Ribonucleico
TR	Transcriptasa Reversa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ITRAN	Inhibidor de la Transcriptasa Reversa Análogo Nucleósido
ITRNN	Inhibidor de la Transcriptasa Reversa No Nucleósido
IP	Inhibidor de la Proteasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
IFN- γ	Interferón gamma

RESUMEN

El tratamiento antirretroviral altamente activo (TARAA) ha mejorado la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con SIDA, pero a largo plazo tiene limitaciones de costo, toxicidad y fallas en adherencia. Las interrupciones estructuradas (IET) de TARAA reducen la toxicidad y costos del tratamiento, mejoran la calidad de vida y podrían favorecer el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH; sin embargo, la información disponible sobre las IET se refiere casi exclusivamente a pacientes adultos y es aún controversial. Evaluar (1) el impacto virológico, inmunológico y clínico, (2) el desarrollo de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales (ARV) y (3) el desarrollo de respuesta inmune específica contra el VIH de un programa de IET del TARAA en tres ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento en una muestra de niños en control virológico crónico. Diseño del estudio: Series temporales con experimentación repetida por retirada y reinicio del tratamiento. Previo consentimiento informado se incluyeron niños con VIH y carga viral (CV) crónicamente indetectable por TARAA, sin inmunosupresión y asintomáticos. Fase 1: La CV, subpoblaciones de linfocitos y estado clínico se evaluaron al término de cada IET y a las 6 y 12 semanas del reinicio de TARAA. Etapa 2: Se evaluó la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a ARV por secuenciación directa al final de cada período de interrupción de TARAA. Etapa 3: Se midió la síntesis de IFN- γ inducida por VIH en células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) para evaluar el desarrollo de respuesta inmune específica. Fase 1: Se incluyeron 4 niños, edad 10.3 años (mediana) en tratamiento con AZT+3TC+RTV. Al finalizar cada período de IET la CV fue: 1° 214,000 copias/ml ó 5.3 log₁₀, 2° 72,400 copias ó 4.7 log₁₀ y 3° 28,200 ó 4.45 log₁₀. Todos los rebotes fueron seguidos por CV indetectable durante el tratamiento. Las cifras de linfocitos T CD8+ se incrementaron durante los rebotes virológicos y una disminución inicial en el número de linfocitos T CD4+ fue seguida por tendencia al incremento. Ocurrió sólo un evento de inmunosupresión severa que fue transitorio. No ocurrió sintomatología relacionada al VIH. Fase 2: No se encontraron mutaciones relacionadas a resistencia a ARV, salvo la mutación K103R que requiere de V179D para inducir resistencia a ITRNN. Fase 3: En una segunda muestra de 6 niños sometidos a IET se observó incremento en la síntesis de IFN- γ por CMNSP al ser expuestas a antígeno de VIH después de las 6 semanas del reinicio de TARAA. Las IET de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento en niños con CV crónicamente indetectable condicionan rebotes virológicos progresivamente menores seguidos por descenso de la CV a niveles indetectables, con un riesgo bajo de inmunosupresión, sin la ocurrencia de síntomas relacionados al VIH, sin la selección de mutaciones relacionadas con resistencia a ARV y con el desarrollo de respuesta inmune específica contra el VIH.

ABSTRACT

The Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) has improved survival and quality of life in AIDS patients, but in the long term has limitations of cost, toxicity and treatment adherence. Structured interruptions of HAART (STI) reduce the toxicity and treatment costs, improve quality of life and could induce the development of a specific immune response; however, information available about STI is concerned almost exclusively to adult patients and is still controversial. The objective was to evaluate (1) the viral, immune and clinical impact, (2) the development of genotypic resistance to antiretroviral drugs (ARVs), and (3) the development of specific immune response versus HIV of a STI program in three cycles of 4 weeks off / 12 weeks on treatment in a cohort of children under chronic viral control. Previous informed consent, through a single group time series design children with HIV and viral load (VL) chronically undetectable by HAART, without immunosuppression and asymptomatic were enrolled to a STI program. Phase 1: CV, T cells and clinical status were assessed at the end of each STI and at 6 and 12 weeks after restarting HAART. Phase 2: The presence of mutations associated with ARV resistance was searched on at the end of each STI period by direct sequencing. Phase 3: The development of a specific immune response was evaluated through the synthesis of IFN- γ by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) exposed to HIV. In phase 1, 4 children receiving AZT+3TC+RTV were included, age 10.3 years (md). After each STI period, the CV was: 1° 214,000 copies/ml (5.3 log₁₀), 2° 72,400 (4.7 log₁₀), and 3° 28,200 (4.45 log₁₀). All viral rebounds were followed by an undetectable VL during HAART. CD8+ lymphocyte numbers increased during viral rebounds and an initial decrease in the number of CD4+ lymphocytes was followed by a tendency to increase. Just one severe immunosuppression event occurred and it was transitory. No HIV-related symptoms occurred. In phase 2, mutations related to ARV resistance were not detected, but K103R that requires V179D to induce resistance to NNRTI was found. In phase 3, an increasing of IFN- γ synthesis by PBMC upon exposure to HIV after 6 weeks of restarting HAART was observed in a second cohort of 6 children underwent STI. The progressive reduction in the magnitude of viral rebounds and the fall of VL at restarting HAART suggested the developing of specific immune response and that STI was not generating ARV resistance. The numbers of T cells during follow-up and the non-occurrence of HIV-related symptoms suggest that STI are clinically and immunologically safe. Although the number of viral rebounds tested was small, our results suggest that the STI program is not generating ARV resistance. The increase in the synthesis of IFN- γ by PBMC upon exposure to HIV also suggests the development of a specific immune response. With these results we can conclude that the STI of HAART in cycles of 4 weeks off/12 weeks on therapy in children with chronically undetectable VL can cause progressively lower viral rebounds followed by a decrease to undetectable levels, with a low risk of severe immunosuppression, without the occurrence of HIV-related symptoms, without the selection of mutations associated to ARV resistance, and with the development of a specific immune response against HIV.

1. INTRODUCCIÓN

La terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) ha incrementado la supervivencia y mejorado la calidad de los niños infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Working Group on Antiretroviral Therapy, 2009; Sánchez-Granados et al., 2003); sin embargo, su alto costo, la toxicidad secundaria a su uso crónico y las fallas en la adherencia al tratamiento que se acumulan conforme pasa el tiempo, son limitaciones importantes que limitan la efectividad de TARAA a largo plazo (Palacios et al., 2002; Sáez-Llorens et al., 1998; Solorzano-Santos et al., 2006; Plebani et al., 2004; Opravil et al., 2004). Los pacientes que llegan a interrumpir TARAA sin indicación médica experimentan un rebote rápido de la carga viral (CV) seguida por depleción en las cifras de linfocitos CD4+ (Deeks et al., 2001; Lori *et al.*, 2001; Fagard et al., 2003; Yerly et al., 2004). Las interrupciones estructuradas (IET ó STI por sus siglas en inglés “*Structured Treatment Interruptions*”) de TARAA, en cambio, inducen incrementos controlados de la replicación viral por períodos cortos de tiempo, que puede estimular el desarrollo de una respuesta inmune específica contra El VIH, lo cual a su vez podría producir rebotes de la CV progresivamente menores (Lori et al., 2000a; Lori et al., 2001). Una estrategia así podría contribuir a reducir la toxicidad crónica de los medicamentos antirretrovirales, disminuir los costos del tratamiento y mejorar calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, la información disponible sobre IET de TARAA es aún controversial y se limita casi exclusivamente a adultos (Lori et al., 2000; Miller et al., 2000; Lori et al., 2000b; Giard et al., 2005; Gibb et al., 2004). Además, la información sobre el riesgo de esta estrategia de inducir la selección de cuasi-especies resistentes a los antirretrovirales en pacientes pediátricos es escasa y tal información en pacientes adultos es también controversial (Lori et al., 2000a,b; Lori et al., 2001; Centers for Disease Control and Prevention, 1994; Lang and Secic, 1997; Borkowsky et al., 2008). Diversos estudios sobre interrupciones estructuradas (IET) y no estructuradas

de TARAA en pacientes adultos han reportado el desarrollo de mutaciones relacionadas a resistencia antirretroviral entre 0.75% y 45% (Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Julg and Goebel, 2006). El objetivo del presente estudio fue evaluar el impacto virológico (carga viral), inmunológico (respuesta proliferativa T CD4+ y CD8+) y clínico de un programa de IET en ciclos de 4 semanas sin /12 semanas con tratamiento en una muestra de niños con SIDA en control virológico crónico, analizar las secuencias de los genes de la proteasa y transcriptasa reversa (TR) en las muestras obtenidas durante los períodos de interrupción de TARAA (rebotes virológicos) para evaluar si ocurre la inducción de mutaciones asociadas a resistencia antirretroviral, y evaluar si durante el programa de IET ocurre la inducción de una respuesta inmune específica contra el VIH medida a través de la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica expuestas a antígeno viral. Se observó que el programa de IET de TARAA en niños probado en este estudio, condiciona la ocurrencia de rebotes virológicos progresivamente menores que son seguidos por el descenso de la CV a niveles indetectables, con un riesgo bajo de eventos de inmunosupresión severa, sin la ocurrencia de síntomas asociados al VIH, sin la inducción de mutaciones relacionadas a resistencia antirretroviral y con la inducción de una respuesta inmune específica contra el VIH.

2. HIPÓTESIS

Las interrupciones estructuras de TARAA, en ciclos de 4 semanas sin y 12 semanas con tratamiento, en niños con Carga Viral (CV) crónicamente indetectable son seguidas por incrementos moderados y transitorios de la CV, sin el desarrollo de inmunosupresión severa, sin la generación de mutaciones asociadas a resistencia a los antirretrovirales y con el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

- 3.1.1** Evaluar el impacto virológico (CV), inmunológico (respuesta proliferativa T CD4+ y T CD8+) y clínico de un programa de IET de TARAA, en ciclos de 4 semanas sin /12 semanas con tratamiento, en una muestra de niños con SIDA en control virológico crónico.
- 3.1.2** Evaluar si los períodos sin antirretrovirales de las IET de TARAA, en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento, en niños con CV crónicamente indetectable generan mutaciones asociadas a resistencia a los antirretrovirales.
- 3.1.3** Evaluar si las IET de TARAA, en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con, en niños con CV crónicamente indetectable inducen el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1** Evaluar si las IET de TARAA, en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con, en niños con CV crónicamente indetectable son seguidas por un incremento de la CV no mayor a 5 log₁₀ y sin descenso de las cifras de linfocitos CD4+ a niveles de inmunosupresión severa.
- 3.2.2** Evaluar si el reinicio del TARAA es seguido por un descenso de la CV > 2 log₁₀ en los tres meses siguientes.

- 3.2.3** Genotipificar el gen de la proteasa y transcriptasa reversa (TR) en las muestras de los períodos de interrupción de TARAA de los pacientes pediátricos infectados con VIH-1 sometidos al programa de IET.
- 3.2.4** Evaluar si dicho programa de IET de TARAA induce el desarrollo de inmunidad tanto inespecífica como específica contra el VIH-1.
- 3.2.5** Determinar el subtipo viral de los niños infectados por VIH incluidos en el programa de IET de TARAA.

4. ANTECEDENTES

4.1 Marco histórico

Los primeros casos de un nuevo síndrome que se presentaba en hombres homosexuales y bisexuales y que se caracterizaba por el desarrollo de infecciones oportunistas y ciertos tipos de neoplasias fueron publicados en 1981, demostrándose que esto se debía a una inmunodeficiencia grave e irreversible principalmente de la inmunidad de tipo celular (Vidal-Lampurdanés and Pumarola-Suñé, 1996). En 1982 este síndrome fue denominado “Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida” (SIDA) por el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC) de Atlanta, Estados Unidos de América (EUA) (Morison, 2001). En 1983 el grupo de Luc Montagnier del Instituto Pasteur en Francia aisló un retrovirus a partir de linfocitos T de sangre periférica de un paciente afectado de linfadenopatía generalizada; este virus poseía linfotropismo para las células T y fue denominado como Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV) (Barré-Sinussi *et al.*, 1983). En 1984 fueron aislados dos virus similares, que recibieron los nombres de Virus Linfotrópico de Células T Humanas tipo III (HTLV-III) y Virus Asociado al SIDA (ARV) obtenidos por el grupo de Robert Gallo en el Instituto Nacional de Salud de EUA y Jay Levy en la Universidad de California en EUA, respectivamente (Gallo and Montagnier, 2003). Los estudios del genoma de los tres aislados demostraron que, aunque presentaban algunas diferencias, se trataba de variantes de un mismo virus cuya asociación al SIDA quedaba plenamente demostrada por estudios seroepidemiológicos. Finalmente, en 1986 el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV) de la Sociedad Internacional de Microbiología acordó denominar al agente etiológico del SIDA “Virus de la Inmunodeficiencia Humana”

(VIH ó HIV por sus siglas en inglés), y en ese mismo año se detectó en países de África Occidental un segundo retrovirus humano en pacientes afectados de SIDA, que fue denominado VIH-2, para distinguirlo del clásico agente del SIDA (VIH-1) (Vidal-Lampurdanés and Pumarola-Suñé, 1996).

Después de que el programa de vigilancia epidemiológica del SIDA fue iniciado en EUA en 1981, el CDC había reportado más de 20,000 casos en 1985, de los cuales 307 correspondían a niños menores de 13 años de edad. Pronto fueron identificados los dos factores principales que condicionaban la infección en niños: el primero fue ser hijo de una mujer seropositiva para VIH, y el segundo haber recibido transfusiones u otros derivados sanguíneos. En ese entonces, el pronóstico y el tiempo de sobrevivencia para un niño con SIDA era pobre, sobre todo en los niños menores de 1 año de edad (Sáez-Llorens and Ramilo, 1998; Sánchez-Granados et al., 2008).

4.2 Situación actual del VIH/SIDA

4.2.1 Situación mundial

La epidemia causada por VIH/SIDA había causado la muerte de cerca de dos millones de personas para el año 2008, y se estima que 2.7 millones fueron infectados por el VIH durante ese año, con lo que la cifra acumulada de personas infectadas con el virus es de 33 millones en todo el mundo. Aunque la epidemia se ha extendido por todo el mundo, en el África Subsahariana habita el 67% de las personas que viven con el VIH, siendo esta región la más afectada, con 22 millones (**Tabla 1**) (ONUSIDA, 2009).

Tabla 1

Resumen de las cifras estimadas de población infectada por VIH-1 a nivel mundial por región geográfica para el año 2008 según la ONUSIDA.

Zona geográfica	Población Infectada
Oceanía	74,000
Región del Caribe	230,000
África del Norte y Oriente Medio	280,000
Europa Oriental y Asia Central	1,500,000
América Latina	1,700,000
América del Norte, Europa Occidental y Central	2,000,000
Asia	5,000,000
África Subsahariana	22,000,000

Fuente: Datos hasta el año 2008 (ONUSIDA, 2009).

Con respecto a la epidemia a nivel infantil, se ha estimado que sólo en el año 2008 ocurrieron 370 000 nuevas infecciones en niños menores de 15 años, con lo que el número de niños infectados con el VIH alcanzó los dos millones a nivel mundial, de los cuales casi el 90% vivía en el África Subsahariana. Además, todas las estimaciones revelan que el número de niños con VIH en el mundo continúa creciendo de manera sostenida. Más del 90% de los niños infectados contrajeron el virus durante el embarazo, el parto o la lactancia, y sólo una pequeña fracción de los infecciones en menores son el resultado de agujas contaminadas, transfusión de sangre o productos sanguíneos infectados, abuso sexual o relaciones sexuales. La cifra de menores de 15 años infectados con el VIH que fallecieron a causa del SIDA en el 2008 fue de 270 000. En los países más afectados, el VIH es la causa de más de un tercio de todos los fallecimientos de niños menores de cinco años. De hecho, sin tratamiento antirretroviral, la progresión de la enfermedad causada por el VIH en niños es particularmente severa y muchos de ellos fallecen a temprana edad (ONUSIDA, 2009).

4.2.2 Situación en México

En México la infección por VIH-1 se ha convertido en un serio problema de salud pública, con múltiples consecuencias sociales, económicas y políticas (CENSIDA, 2009). Se puede decir que el comportamiento de la epidemia es idéntico al de los países industrializados (Rivera-Morales *et al.*, 2001). Desde el inicio de la epidemia, en 1983 y hasta el 30 de Junio del año 2010, se han registrado de manera acumulada en México 141,356 casos de SIDA y se calcula que existen hasta 220,000 personas que viven con este virus (CENSIDA, 2010). La transmisión sexual ha sido el factor de riesgo en el 92.5% de los casos acumulados de SIDA en México, en el 4.9% la infección se originó por vía sanguínea (3.0% por transfusión, 0.4% en hemofílicos, 0.5% donadores, 1.1% usuarios de drogas intravenosas y < 0.1% por exposición ocupacional/laboral). La transmisión perinatal representa el 2.3% del total de casos (**Tabla 2**) (CENSIDA, 2009).

Tabla 2

Índice de casos acumulados de SIDA por categoría de transmisión del VIH/SIDA en México al 30 de Junio de 2010.

CATEGORIAS	PORCENTAJE
Heterosexual	46.6%
Homosexual	45.9%
Sexual	92.5%
Transfusión	3.0%
Hemofílico	0.4%
Donadores	0.5%
Drogas I. V.	1.1%
Ocupacional	<0.1%
Vía Sanguínea	4.9%
Perinatal	2.3%
HSH/UDI	0.3%

Fuente: Censida, con base en el Registro Nacional de Casos de SIDA.

En México la epidemia causada por el VIH se concentra en el grupo de transmisión sexual, en el cual la categoría heterosexual a llegado a ocupar el 46.6% del total de casos acumulados, mientras que la población de homosexuales infectados alcanzó un equivalente al 47.3% hasta marzo de 2009. Con respecto a la clasificación por sexo, el 82.4% (107,874) del total de casos corresponde a hombres mientras que el 17.6% (23,095) a mujeres hasta el 31 de marzo del 2009. También es importante destacar que el 77.5% de los casos acumulados (101,542) corresponden a personas en edades laboralmente productivas que incluyen desde los 15 hasta los 44 años de edad (**Tabla 3**) (CENSIDA, 2009).

Tabla 3

Casos acumulados de SIDA por edad y sexo en México al 30 de Junio de 2009.

Grupo de Edad	Hombres		Mujeres		Total	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
0 - 14	1,664	1.5	1,435	6.2	3,099	2.4
15 - 29	31,314	29.0	7,667	33.2	38,981	29.7
30 - 44	52,930	49.1	9,631	41.7	62,561	47.8
≥ 45	21,069	19.6	4,216	18.3	25,285	19.3
ND*	897	0.8	146	0.6	1,043	0.8
Total	107,874	100	23,095	100	130,969	100

*ND: No Determinado. Fuente: SS/DGE. Registro Nacional de Casos de SIDA.

En los casos de infección infantil, en cambio, la vía de transmisión más frecuente es la perinatal, ya sea durante o después del parto. (**Tabla 4**) (CENSIDA, 2009).

Tabla 4

Casos nuevos y acumulados de SIDA pediátricos por categoría de transmisión y sexo en México al 30 de Junio de 2009.

Categoría	Hombres				Mujeres			
	Casos diagnosticados en el año 2009		Casos acumulados 1983-2009		Casos diagnosticados en el año 2009		Casos acumulados 1983-2009	
	Numero	%	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Perinatal	5	62.5	984	80.5	3	100	995	92.0
Sanguínea	0	0.0	182	14.9	0	0.0	56	5.2
Sexual	3	37.5	56	4.6	0	0.0	31	2.9
ND*	0	0	442	(27.1)	0	(0.0)	353	(25.1)
Total	8	100	1,664	100	3	100	1,435	100

*La categoría "Se desconoce" (ND) se excluyó del cálculo de porcentaje, sin embargo, dicha cifra se muestra entre paréntesis para conocer su magnitud. Fuente: SS/DGE. Registro Nacional de Casos de SIDA.

4.3 Virus de Inmunodeficiencia Humana

4.3.1 Clasificación, estructura y genoma

El VIH es un virus cuyo material genético es de ácido ribonucleico (ARN) y pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Lentiviridae*, cuyos miembros se caracterizan por poseer la capacidad de infectar células del sistema inmunológico y de ser causa de infección persistente que se manifiesta de forma clínica después de prolongados períodos de tiempo (Vidal-Lampurdanés y Pumarola-Suñé, 1996).

La partícula vírica tiene un tamaño que oscila entre 80 y 110 nm e incluye dos copias de ARN monocatenario de polaridad positiva y de aproximadamente 9.5 kb de largo. La organización genómica del VIH-1 es similar a la de otros retrovirus, e incluye los genes que codifican para su estructura y proteínas enzimáticas *gag*, *pol* y *env*. El genoma viral está recubierto por una cápside proteica de simetría icosaédrica constituida por las denominadas proteínas del *core* codificadas por el gen *gag*. El conjunto de ácido nucleico y nucleocápside o *core*, se halla a su vez recubierto por una bicapa lipídica de origen celular, sobre la que se hallan las glicoproteínas de envoltura del virus codificadas por el gen *env*. También posee una enzima codificada por el gen *pol* denominada transcriptasa reversa (TR) que es característica de los retrovirus y que da nombre a esta familia (**Figura 1**) (Preston *et al.*, 1988).

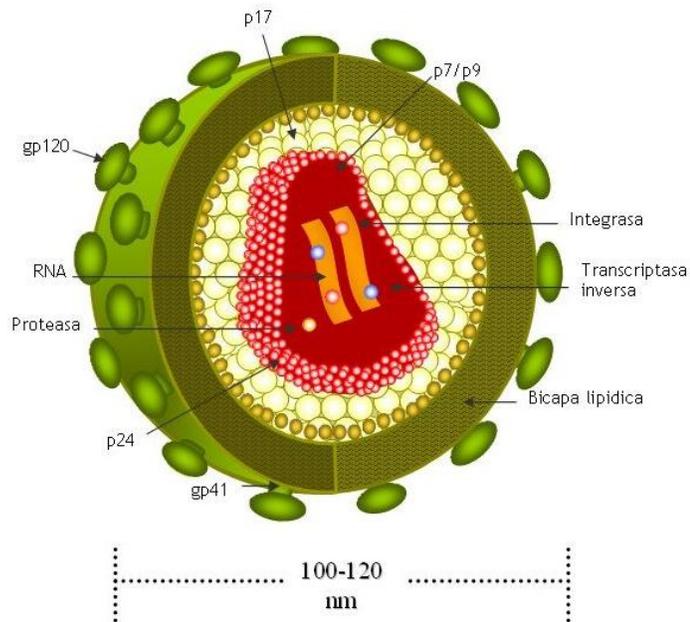


Figura 1. Estructura básica del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Adaptado de: *Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (INAEI), EUA* [Disponible en: www3.niaid.nih.gov].

El genoma del VIH-1 contiene otros genes además de los que codifican para proteínas estructurales y enzimáticas antes mencionados; dos genes reguladores *tat* y *rev*, y genes que codifican para proteínas accesorias y regulatorias *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *vpx* y *tev* (**Tabla 5**) (Vidal-Lampurdanés y Pumarola-Suñé, 1996).

Tabla 5

Genes que constituyen el genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y sus funciones más importantes.

GEN	PROTEÍNA	FUNCIÓN
<i>env</i>	gp160	Precursor
	gp120	Proteína de la envoltura
	gp41	Interacción con receptores y correceptores y fusión de membranas
<i>gag</i>	p55	Precursor
	p24	Proteína de la nucleocápside
	p17	Proteína de la matriz
	p9	Ribonucleoproteínas asociadas al ARN viral
	p6	
<i>pol</i>	Transcriptasa reversa	Retrotranscripción del genoma viral con actividad RNAasa
	Integrasa	Integración del genoma viral retrotranscrito
	Proteasa	Procesamiento de proteínas virales que forman la estructura del virión.
<i>tat</i>	Tat	Transactivación
<i>rev</i>	Rev	Regulación del transporte y procesamiento del ARN
<i>nef</i>	Nef	Retrotranscripción; infectividad
<i>vif</i>	Vif	Infectividad viral
<i>vpr</i>	Vpr	Transactivador
<i>vpu</i>	Vpu	Liberación de viriones
<i>tev</i>	Tev	Activador de tat y rev

Fuente: Vidal-Lampurdanés y Pumarola-Suñé, 1996.

4.3.2 Ciclo de replicación viral

Unión y fusión. La unión del VIH-1 con los linfocitos T y macrófagos requiere la interacción del asa variable 3 (*loop V3*) presente en la glicoproteína de superficie gp120 del VIH con el receptor CD4, además de la interacción con los receptores de quimiocinas CCR5 y/o CXCR4. Esta unión genera un cambio conformacional en la gp120 que expone a la glicoproteína transmembranal gp41, lo que promueve la fusión de membranas entre el VIH y la célula diana con la consecuente liberación del ARN viral junto con los componentes del virus (transcriptasa reversa, integrasa y proteasa) dentro del citoplasma de la célula (**Figura 2**) (Kuhmann *et al.*, 2000).

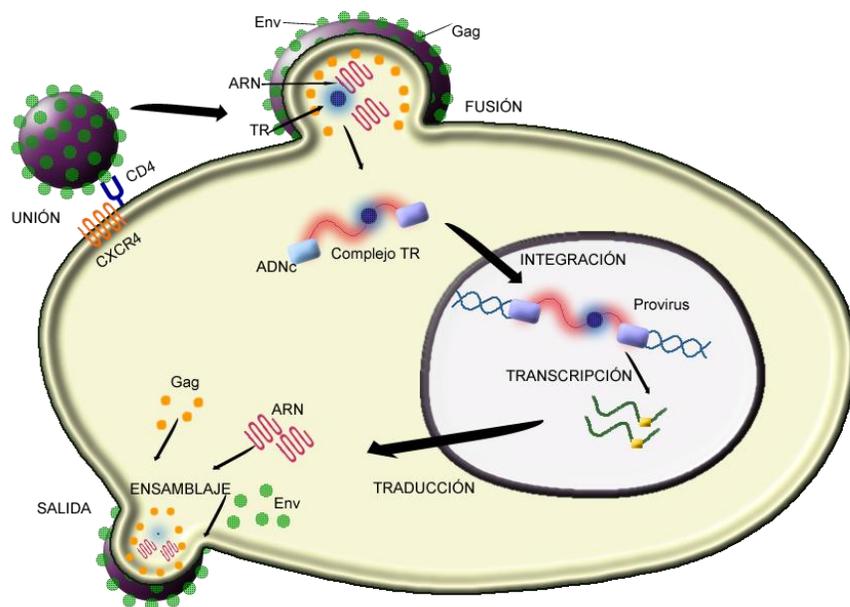


Figura 2. Ciclo de replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1). Adaptado de: *Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (INAEI), EUA* [Disponible en: www3.niaid.nih.gov].

Transcripción inversa. En el citoplasma de la célula huésped, la TR del virus convierte las dos cadenas sencillas de ARN a ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena (ADNds), el cual migra posteriormente hacia el interior del núcleo celular.

Integración. El ADNds viral recién formado ingresa al núcleo celular, donde la enzima viral integrasa lo incorpora al ADN celular en regiones aleatorias del genoma. El ADN viral recién integrado es llamado provirus y permanece inactivo por un período de tiempo variable, en el cual pocas o incluso ninguna copia del VIH es producida.

Transcripción. El provirus en estado de inactivación se expresa cuando la célula huésped recibe un mensaje para activarse. Utiliza a la enzima huésped “ARN polimerasa” para crear copias del material genómico del VIH, así como pequeñas porciones de ARN llamadas ARN mensajero (ARNm) empleadas en la producción de cadenas largas de proteínas virales.

Ensamblaje. El ARN viral recién transcrito es transportado hacia el citoplasma celular para ser traducido en un precursor proteico viral en el ribosoma celular. Entonces la enzima viral proteasa corta el precursor proteico en proteínas funcionales de menor tamaño. De esta manera, se producen y se ensamblan todos los componentes necesarios para la replicación del virus (proteínas estructurales, reguladoras y auxiliares) y las copias de ARN dentro de una nueva partícula viral.

Gemación. Las partículas virales recién formadas migran hacia la membrana plasmática de la célula huésped, de la cual toman parte para formar la cubierta del virión, integrándose a la cubierta del virus las glicoproteínas gp120 y 41. Una vez completado el proceso de gemación, el virión es liberado y es capaz de comenzar la infección de otra célula diana (**Figura 2**) (Kuhmann *et al.*, 2000).

4.3.3 Subtipo viral

El SIDA es causado por dos virus estrechamente relacionados, el VIH-1 y VIH-2. Los análisis epidemiológicos indican que el tipo 1 se ha extendido ampliamente en el mundo y que es el responsable de la pandemia global, mientras que el tipo 2 se encuentra restringido a ciertas regiones de África. El VIH-1 presenta una amplia variación genética y ha sido categorizado en tres grupos; M (*Major*), O (*Outlier*) y N (*New; non-M-non-O*). El grupo M ha sido subdividido a su vez en subtipos genéticos nombrados por letras de la “A” a la “K”, las cuales reflejan el orden en que éstos fueron identificados; además, cada subtipo se presenta en distribuciones geográficas particulares, de modo que en México el subtipo B perteneciente al grupo M del VIH-1 es el subtipo prevalente de acuerdo a diversos estudios epidemiológicos (Rivera-Morales et al; 2001).

4.4 Terapia antirretroviral y resistencia

Existen seis clases de drogas antirretrovirales que en la actualidad están en uso clínico para el tratamiento de la infección por VIH-1 (**Tabla 6**):

4.4.1 Inhibidores de la TR análogos de nucleósidos o de nucleótidos (ITRAN).

Actúan como terminadores de la síntesis de ADN proviral e inhiben la retrotranscripción del genoma viral en ADN, un evento crucial que ocurre en etapas tempranas del ciclo de infección.

4.4.2 Inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos (ITRNN). Se unen directamente a la transcriptasa reversa viral e inhiben su función.

4.4.3 Inhibidores de la proteasa (IP). Están dirigidos a la enzima proteasa involucrada en los procesos de ensamblaje final de los viriones.

- 4.4.4 Inhibidores de fusión (IF).** Bloquean la entrada del virus en la célula blanco.
- 4.4.5 Inhibidores de entrada.** Son antagonistas selectivos del co-receptor de citocinas CCR5. Al impedir la interacción entre la gp120 del VIH y el co-receptor CCR5 impiden la entrada de éste a la célula huésped.
- 4.4.6 Inhibidores de la integrasa.** Al inhibir la función de esta enzima, impiden la integración del DNA proviral en el DNA de la célula huésped (**Tabla 6**) (Clavel and Hance, 2004).

En la actualidad se emplean combinaciones de drogas antiretrovirales para el tratamiento de la infección por VIH-1 que consisten en tres medicamentos; usualmente dos ITRAN más un IP o un ITRNN. Este tratamiento es denominado terapia antirretroviral altamente activa (TARAA ó HAART por sus siglas en Inglés) (Shafer *et al.*, 2000). La terapia combinada de drogas antirretrovirales ha demostrado ser notablemente efectiva en el control de la progresión de la enfermedad del VIH-1, sin embargo, estos beneficios pueden ser limitados debido al desarrollo de resistencia. Las resistencias son consecuencia de mutaciones que emergen en las proteínas virales blanco de los agentes antivirales. Dos conceptos son importantes para comprender el desarrollo de resistencias; primero, la infección por VIH es caracterizada por niveles elevados de producción viral y segundo, la población viral en un individuo infectado es altamente heterogénea (Clavel and Hance, 2004).

Tabla 6

Drogas antirretrovirales actualmente en uso clínico de acuerdo a su mecanismo de acción.

Nombre del Medicamento	Nombre comercial	Nombre alterno	Compañía
Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos Nucleósidos (ITRAN):			
Zidovudina	Retrovir	AZT, ZDV	GSK
Didanosina	Videx	ddI	BMS
Lamivudina	Epivir	3TC	GSK
Stavudina	Zerit	d4T	BMS
Abacavir	Ziagen	ABC	GSK
Tenofovir*	Viread	TDF, PMPA	Gilead
Emtricitabina	Emtriva	FTC	Gilead
Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No-Nucleósidos (ITRNN):			
Delavirdina	Rescriptor	DLV	Pfizer
Efavirenz	Sustiva	EFV	BMS
Etravirina	Intelence	ETV	Tibotec
Nevirapina	Viramune	NVP	Boehringer Ingelheim
Inhibidores de la Proteasa (IP):			
Atazanavir	Reyataz	ATV	BMS
Darunavir	Prezista	DRV	Tibotec
Lopinavir + ritonavir	Kaletra	LPV/r	Abbott
Fosamprenavir	Lexiva	FPV	GSK
Indinavir	Crixivan	IDV	Merck
Nelfinavir	Viracept	NFV	Pfizer
Ritonavir (<i>potenciador</i>)	Norvir	RTV	Abbott
Saquinavir	Invirase	SQV	Roche
Tipranavir	Aptivus	TPV	Boehringer Ingelheim
Inhibidores de la Fusión (IF):			
Enfuvirtide	Fuzeon	T-20, ENF	Roche
Inhibidores de Entrada Viral:			
Maraviroc	Selzentry	MVC	Pfizer
Inhibidores de la Integrasa (INI):			
Raltegravir	Isentress	RAL	Merck
Combinaciones Fijas:			
Abacavir + lamivudina	Epzicom	ABC/3TC	GSK
Aidovudina + lamivudina	Combivir	AZT/3TC	GSK
Abacavir + lamivudina + zidovudina	Trizivir	ABC/3TC/AZT	GSK
Tenofovir + emtricitabina	Truvada	TDF/FTC	Gilead
Tenofovir + emtricitabina + efavirenz	Atripla	TDF/FTC/EFV	Gilead, BMS
Combinaciones Fijas Genéricas:			
Lamivudina + zidovudina	Duovir	3TC/ZDV	Cipla
Nevirapina + lamivudina + zidovudina	Duovir-N	NVP/3TC/ZDV	Cipla
Nevirapina + lamivudina + stavudina	Triomune	NVP/3TC/d4T	Cipla

Adaptado de *HIV-Drug Resistance Database, Stanford University, 2009.*

GSK = GlaxoSmithKline; BMS = Bristol-Myers Squibb. *Análogo de Nucleótido.

Fuente: (Clavel and Hance, 2004; Working Group on Antiretroviral Therapy, 2009).

Diversos mecanismos moleculares describen la resistencia a los antiretrovirales disponibles y es preciso entender el mecanismo de acción de cada droga. Los medicamentos análogos de nucleósidos detienen la síntesis de ADN viral por la transcriptasa reversa. Después de ser fosforilados por las kinasas celulares, éstos compuestos son incorporados por la transcriptasa reversa en la cadena de ADN viral naciente y, debido a la carencia del grupo 3' hidroxilo, no es posible la adición de nucleótidos, por lo que la síntesis de ADN es terminada prematuramente. Se han descrito dos mecanismos distintos involucrados en la resistencia a estas drogas: la incapacidad de incorporar los compuestos análogos en la cadena de ADN o la remoción de los análogos de la cadena prematuramente terminada por un grupo de mutaciones comúnmente denominadas mutaciones análogas de timidina. El cambio M184V que confiere resistencia a 3TC es el mejor ejemplo descrito de éste tipo de mutaciones (Clavel and Hance, 2004).

Los ITRNN son moléculas pequeñas que tienen alta afinidad por una región hidrofóbica cercana al dominio catalítico de la transcriptasa. La unión de estos compuestos afecta directamente la flexibilidad de la enzima, lo cual limita su capacidad para sintetizar ADN. Las mutaciones K103N, Y188C/L, G190A y V106A son comúnmente descritas en la reducción a la afinidad por estos compuestos (Clavel and Hance, 2004).

La estructura química de los IP mimetizan los péptidos que generalmente son reconocidos por la proteasa. La proteasa viral es un homodímero ensamblado de forma simétrica con una cavidad central de unión a sustrato. Los IP exhiben alta afinidad por el sitio activo de la proteasa inhibiendo su capacidad catalítica. La resistencia a estos compuestos es consecuencia de la substitución de los aminoácidos en los sitios activos de la enzima (Clavel and Hance, 2004).

La entrada del virus en la célula blanco se da a través de una secuencia de interacciones entre el complejo de envoltura conformado por la gp120 y gp41 y los receptores específicos en la superficie celular. Algunos cambios en aminoácidos en la gp120 ó gp41 parecen estar asociados a la resistencia al enfuvirtide, único inhibidor de la fusión disponible actualmente (Clavel and Hance, 2004).

Actualmente las pruebas genotípicas de resistencia antirretroviral constituyen una herramienta estándar en la práctica clínica de rutina, y cuyo objetivo es lograr una máxima supresión viral optimizando así el tratamiento de los pacientes (Taylor et al; 2009). Así, actualmente se recomienda realizar pruebas de resistencia al momento que la infección por VIH-1 es diagnosticada como parte del inicio del manejo del paciente (Working Group on Antiretroviral Therapy, 2009).

4.5 Tratamiento antirretroviral en niños

Desde sus inicios en la década de 1980, el tratamiento de la infección pediátrica del VIH ha evolucionado ampliamente. Antes de la disponibilidad de medicamentos antirretrovirales para pacientes pediátricos, la atención se centraba principalmente en la prevención y manejo de las complicaciones oportunitas relacionadas con la inmunosupresión condicionada por la infección, además de la aplicación de cuidados paliativos. Posteriormente, los primeros estudios de monoterapia en niños en la década de los 90's demostraron beneficios clínicos e inmunológicos significativos, pero temporales; investigaciones posteriores demostraron además que el tratamiento combinado (inicialmente tratamiento con dos ITRAN) daba lugar a mejores resultados clínicos, inmunológicos y virológicos, pero también de duración limitada. Actualmente se recomiendan esquemas de combinación de por lo menos tres drogas antirretrovirales, esquemas que producen una supresión viral más profunda y prolongada, lo que se traduce en una mayor supervivencia, reducción en la ocurrencia de infecciones oportunistas y otras complicaciones de la infección por el VIH, mejoría del crecimiento y la función neurocognitiva, y una mejor calidad de vida de los niños (Working group on antiretroviral therapy, 2009; CENSIDA, 2009).

Por otro lado, el desarrollo de virus resistentes a antirretrovirales es posible tanto en niños que recibieron dosis profilácticas de antirretrovirales como en aquellos que recibieron esquemas con uno o dos medicamentos que suprimieron parcialmente la replicación viral. También es factible observar resistencia en niños sin tratamiento previo que han sido infectados de su madre a pesar de la profilaxis antirretroviral

(Cohen et al., 2008). Por lo tanto, las decisiones sobre cuándo comenzar la terapia y qué medicamentos elegir en los niños no tratados previamente y en la elección del tratamiento antirretroviral de niños ya tratados siguen siendo complejas. En este sentido, las diversas guías para el tratamiento de pacientes pediátricos con VIH están evolucionando a medida que los nuevos datos de ensayos clínicos están disponibles. Sin embargo, aunque los ensayos clínicos prospectivos y controlados ofrecen mejores evidencias para la elaboración de guías de tratamiento, la mayoría de los medicamentos antirretrovirales son aprobados para su uso en pacientes pediátricos basándose en datos de eficacia obtenidos de ensayos clínicos en adultos (Working group on antiretroviral therapy, 2009; CENSIDA, 2009).

Hasta hace algunos años se iniciaba tratamiento antirretroviral en todo niño en el que se establecía el diagnóstico de infección por VIH independientemente del estado clínico, inmunológico y virológico (Sáez-Llorens et al., 1998; Palacios et al., 2002; Sánchez-Granados et al., 2003; Working group on antiretroviral therapy, 2009; CENSIDA, 2009). Actualmente, no está indicado iniciar terapia antirretroviral en todos los niños, y la decisión de cuándo y con qué iniciar se toma en base a la edad y el estado clínico, inmunológico y virológico del niños. Para esto, cada paciente es clasificado clínica e inmunológicamente en base a las categorías del CDC de 1994 (**Tablas 7, 8 y 9**) (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994).

Tabla 7

Revisión 2009 de la Clasificación Clínica Pediátrica de la Infección por VIH de 1994 del CDC, EUA.

Categoría N: Sin síntomas	
No presentan síntomas relacionados con la infección por el VIH o aquellos que solamente presentan una condición enlistada en la categoría A.	
Categoría A: Con síntomas leves	
Aquellos que presentan dos o más condiciones aquí enlistadas pero ninguna de la Categoría B y C.	
▪ Linfadenopatía	▪ Dermatitis
▪ Hepatomegalia	▪ Parotiditis
▪ Esplenomegalia	▪ Infección recurrente de vías respiratorias altas, sinusitis u otitis media
Categoría B: Con síntomas moderados	
Aquellos que presentan condiciones sintomáticas diferentes a las presentadas en la categoría A ó C y que son atribuibles a la infección por VIH.	
▪ Anemia (<8 g/dl), neutropenia (<1.000 células/mm ³) o trombocitopenia (<100.000 células/mm ³) persistente ≥ 30 días	
▪ Meningitis bacterial, neumonía o sepsis (en episodio único)	
▪ Candidiasis orofaríngea persistente por más de 2 meses en niños de >6 meses	
▪ Cardiomiopatía	
▪ Infección por Citomegalovirus antes del primer mes de edad	
▪ Diarrea recurrente o crónica	
▪ Hepatitis	
▪ Virus del herpes simple (VHS), estomatitis, recurrente (más de dos episodios en 1 año)	
▪ Bronquitis por VHS, neumonitis o esofagitis antes del primer mes de edad	
▪ Herpes zoster en al menos dos episodios distintos o mas de un dematoma.	
▪ leiomiosarcoma	
▪ Neumonía intersticial linfoide (LIP) o complejo de hiperplasia linfoide pulmonar	
▪ Nefropatía	
▪ Nocardiosis	
▪ Fiebre prolongada por mas de un mes	
▪ Toxoplasmosis antes del primer mes de edad	
▪ Varicela	

Tabla 7 (continuación)

Categoría C: Con síntomas severos

Niños que presentan cualquiera de las siguientes condiciones.

- Infecciones bacterianas graves, múltiples o recurrentes (en un periodo de dos años) de los siguientes tipos: septicemia, neumonía, meningitis, infecciones de huesos o articulaciones, o absceso de un órgano interno o cavidad corporal.
 - Candidiasis esofágica o pulmonar (en bronquios, tráquea, pulmones)
 - Coccidioidomicosis diseminada
 - Criptococosis extrapulmonar
 - Criptosporidiosis o isosporiasis con diarrea persistente por mas de 1 mes
 - Infección por CMV con aparición de los síntomas a la edad > 1 mes (en un sitio que no sea el hígado, el bazo o los ganglios linfáticos)
 - Problemas asociados a encefalopatía
 - Infección por el VHS causando úlcera mucocutánea que persiste por mas de un mes, o bronquitis, neumonitis o esofagitis de cualquier duración que afectan a un niño mayor al mes de edad
 - Histoplasmosis diseminada
 - Sarcoma de Kaposi
 - Linfoma primario en cerebro
 - Linfoma de células pequeñas no hendidas (de Burkitt), o inmunoblástico o linfoma grande de células B o fenotipo inmunológico desconocido
 - Tuberculosis diseminada o pulmonar
 - Infección por *Mycobacterium*, otras especies o especies no identificadas, diseminada (en un lugar distinto o además de pulmones, piel o ganglios linfáticos cervicales o hiliares)
 - Infección diseminada por el complejo *Mycobacterium avium* o *Mycobacterium kansasii*
 - Neumonía por *Pneumocystis jiroveci* (*P. carinii*)
 - Leucoencefalopatía multifocal progresiva
 - Septicemia recurrente por *Salmonella spp.* (no tifoidea)
 - Toxoplasmosis cerebral en niños mayores a un mes de edad
 - Síndrome de desgaste
-

Tabla 8

Categorías inmunológicas de la enfermedad causada por el VIH en la edad pediátrica (CDC 1994).

Categoría inmunológica	Cifras de linfocitos CD4+ de acuerdo a la edad					
	<12 meses		1-5 años		6-12 años	
	No./ml	%	No./ml	%	No./ml	%
1. Sin evidencia de supresión	>1500	> 25 %	>1000	>25%	>500	25%
2. Supresión moderada	750-1499	15-24%	500-999	15-24%	200-499	15-24%
3. Supresión severa	<750	<15%	<500	<15%	<200	<15%

Tabla 9

Clasificación clínico-inmunológica de la enfermedad por VIH en la edad pediátrica (CDC 1994).

Categoría inmunológica	Categoría clínica			
	N: Sin síntomas	A: Síntomas leves	B: Síntomas moderados	C: Síntomas severos
1. Sin evidencia de supresión	N1	A1	B1	C1
2. Supresión moderada	N2	A2	B2	C2
3. Supresión severa	N3	A3	B3	C3

De acuerdo a la *Guía de manejo antirretroviral de las personas que viven con VIH*. CONASIDA, 2009, las recomendaciones para el inicio de terapia antirretroviral en niños depende de la edad, la categoría clínica e inmunológica y la carga viral, como se muestra en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Recomendaciones para el inicio de tratamiento ARV en Pediatría.

Edad	Categoría clínica	Categoría inmunológica	Carga Viral (copias/ml)	Recomendación
< 12 meses	Sintomático (A, B ó C) ó	2 ó 3	Independientemente del resultado	Iniciar TARAA
	Asintomático (N) y	Sin Inmunosupresión	Independientemente del resultado	Considerar o diferir TARAA Seguimiento ^A c/3 meses
12 meses a <13 años	C N ó A ó B* y	2 ó 3	Independientemente del resultado	Iniciar TARAA
	B** y	2 ó	≥ 100,000	Considerar TARAA
	N ó A y	Sin Inmunosupresión y	< 100,000	Diferir TARAA Seguimiento ^B c/3 meses

*Un episodio de infección bacteriana grave o neumonía intersticial linfoidea (NIL).

**Con excepción de los pacientes que cursen con un solo episodio de infección bacteriana grave o NIL.

^A Clínico y cifras de CD4+.

^B Clínico, cifras de CD4+ y CV.

Fuente: *Guía de manejo antirretroviral de las personas que viven con VIH. CONASIDA, 2009.*

4.6 Interrupciones estructuradas del tratamiento en el manejo de la infección por VIH

Aunque el TARAA ha incrementado de forma significativa la sobrevivencia de los pacientes, su elevado costo, aunado a la toxicidad condicionada por su empleo crónico y las fallas en el apego que se acumulan conforme pasa el tiempo, son importantes limitaciones para su efectividad. Aunque es generalmente aceptado que las IET pueden reducir notablemente estas limitaciones (Deeks et al; 2001), la mayoría de la información disponible al respecto corresponde a pacientes adultos y sigue siendo aún controversial (Deeks et al, 2001; Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Yerly et al., 2004; Gibb et al., 2004; Borkowsky et al., 2008).

4.6.1 Beneficios y riesgos potenciales de las Interrupciones Estructuradas.

Las Interrupciones Estructuradas del Tratamiento Antirretroviral (IET) consisten en varias interrupciones del TARAA bajo una planeación cuidadosa y un seguimiento inmunológico, virológico y clínico estrechos. Se han reconocido múltiples posibles riesgos y beneficios de esta estrategia de tratamiento (**Tabla 11**). Entre sus beneficios potenciales están: (1) reducción de la toxicidad crónica medicamentosa, (2) mejoría en el apego al tratamiento, (3) disminución en los costos de la terapia, y (4) por lo menos teóricamente, la posibilidad del desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH. Este último beneficio potencial es conocido como la hipótesis de la auto-vacunación y consiste en que al permitir el incremento de la replicación viral durante períodos breves, se expone al paciente de manera controlada a las poblaciones autólogas del VIH, con el consecuente desarrollo de una respuesta inmune específica (Deeks et al., 2001). Aunque durante las IET existe el riesgo de selección de cuasi-especies resistentes a los antirretrovirales, este riesgo parece ser bajo, ya que el riesgo es mayor cuando hay replicación viral en presencia de niveles sub-terapéuticos de las drogas, lo cual usualmente ocurre cuando hay fallas en la adherencia al tratamiento. Además, las

IET se han incluido dentro de las estrategias dirigidas a mejorar la adherencia al tratamiento (Deeks et al., 2001; Lori et al., 2001).

Tabla 11

Riesgos y beneficios potenciales de las Interrupciones Estructuradas del Tratamiento Antirretroviral.

Riesgos	Beneficios
Pérdida del control viral	Incremento en la respuesta inmune
Desarrollo de resistencia	Rebotes progresivamente menores
Repoblación de reservorios	Retardo progresivo de los rebotes
Síndrome retroviral agudo	Interrupción a largo plazo
	Alivio de la resistencia
Reducción de las cifras de CD4+	Mejoría en la tolerancia medicamentosa
Pérdida de la respuesta inmune	Reducción de la toxicidad medicamentosa
Ocurrencia de eventos clínicos	
Recurrencia efectos adversos agudos	Mejoría en el acceso al tratamiento
Mayor riesgo de transmisión	Mejoría en la adherencia al tratamiento
Aspectos farmacocinéticas	Reducción en los costos del tratamiento.

4.6.2 Interrupciones Estructuradas del TARAA en adultos.

En pacientes adultos las IET han sido probadas en diferentes escenarios, los cuales incluyen infección aguda, infección crónica controlada e infección crónica con falla al tratamiento. De estos escenarios, el de infección aguda es en el que las IET han mostrado los resultados más promisorios. En el caso de infección crónica controlada sus beneficios potenciales parecen centrarse en la reducción de la carga del tratamiento y de la toxicidad y los costos debidos a éste. Para el caso de infección crónica con falla a TARAA se ha mencionado la posibilidad de la ocurrencia de un cambio de las *cuasi*-especies virales predominantes con sustitución de las multi-resistentes por las salvajes, con la posibilidad de restauración de la

sensibilidad a TARAA. No obstante, este posible beneficio por el momento es sólo teórico (Deeks et al., 2001; Julg and Goeber, 2006).

4.6.3 Interrupciones Estructuradas de TARAA en niños.

Con una excepción, la información sobre las IET se limita sólo a pacientes adultos. En el primer estudio publicado en pacientes pediátricos, ocho niños fueron sometidos a IET progresivamente mayores con incrementos de dos días de los períodos libres de tratamiento guiados por las cifras de linfocitos CD4+. Aunque los resultados fueron variables, se observó que los rebotes virológicos fueron progresivamente menores y que hubo un incremento en la síntesis de IFN- γ específico contra el VIH (Borkowsky et al., 2008). En un estudio europeo retrospectivo, 72 niños incurrieron en 82 interrupciones no planeadas de TARAA. En 59 de estas interrupciones se reinició TARAA con otro o el mismo esquema antirretroviral, observando un incremento en las cifras de linfocitos CD4+ a niveles pre-interrupción alrededor de los 6 meses del reinicio y un incremento en la proporción de niños con CV bajo el límite de detección (400 copias/ml) de 15% durante las interrupciones a 46%, concluyendo que el tiempo para la declinación de las cifras de linfocitos CD4+ es importante en el diseño de IET en niños (Gibb et al., 2004).

Debido a la naturaleza crónica y letal de la infección por el VIH, los pacientes con SIDA requieren de tratamiento de por vida, lo que aunado a la toxicidad medicamentosa que se va acumulando con el tiempo, y a la acumulación progresiva de fallas en la adherencia al tratamiento conforme pasan los años de estabilidad clínica, con el consecuente incremento en la frecuencia de mutaciones relacionadas con resistencia a antirretrovirales, es importante evaluar el impacto de las interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en niños, ya que la información disponible hasta el momento en este grupo de edad es limitada, circunscribiéndose casi exclusivamente a pacientes adultos. Una estrategia como las IET, permitiría reducir la toxicidad crónica de los medicamentos antirretrovirales, se traduciría en una mejor calidad de vida de los pacientes y repercutiría en una reducción en los costos del tratamiento. Por otro lado, al permitir un incremento controlado en la

replicación viral se podría favorecer la re-inmunización del paciente contra el VIH, lo que podría promover el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica contra el virus, como ha sido propuesto previamente. El riesgo de seleccionar cepas con mutaciones relacionadas a resistencia a antirretrovirales con esta estrategia es muy bajo, ya que éste es mayor cuando hay replicación viral en presencia de niveles séricos subterapéuticos de dichas drogas. Después de varios años, el tratamiento crónico se acompaña de una mayor probabilidad de fallas en la adherencia al tratamiento, las cuales condicionan replicación en presencia de niveles subterapéuticos y, por lo tanto, la selección de mutantes resistentes. Esto es un motivo adicional que justifica la búsqueda de estrategias que permitan reducir la ocurrencia de fallas en la adherencia, como lo serían las interrupciones estructuradas del tratamiento antirretroviral (IET) en pacientes estables clínica, inmunológica y virológicamente.

5. MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental general

5.1.1 Diseño del estudio. Cuasi-experimental de Series Temporales con experimentación repetida, con retirada y reinicio del tratamiento.

5.1.2 Criterios de selección de la muestra. Fueron elegibles para el estudio los niños que reunían los siguientes criterios:

5.1.2.1 Criterios de Inclusión.

- Menores de 16 años.
- Diagnóstico confirmado de infección por VIH.
- CV crónicamente indetectable por TARAA con cualquiera de los siguientes dos esquemas de tratamiento: RTV+AZT+3TC ó LPV/r+AZT+3TC.
- Asintomáticos.
- Sin evidencia de inmunosupresión de acuerdo a la clasificación del CDC de 1994 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994).
- Consentimiento informado y firmado por los padres o la persona legalmente responsable del paciente.

5.1.2.2 Criterios de Eliminación.

- Falla para completar al menos el 30% de las evaluaciones durante el seguimiento (los pacientes debían completar al menos 6 de las 9 mediciones posibles una vez iniciado el primer ciclo de interrupción/reinicio).
- Retiro voluntario del estudio, por decisión de los padres o de la persona legalmente responsable de su cuidado o del paciente cuando fuera el caso (si

es que no se completaron al menos 6 de las 9 mediciones posibles durante el seguimiento).

5.1.3 Definición operacional de las variables.

5.1.3.1 Variables independientes.

- **Interrupción estructurada del tratamiento antirretroviral.** La suspensión de TARAA por 4 semanas en pacientes con CV crónicamente indetectable (<400 copias/ml de plasma por más de 12 meses).
 - La ocurrencia de rebote en la CV durante las IET de TARAA se vigiló mediante la medición de la CV al término de cada interrupción y a las 6 y 12 semanas después de reiniciado TARAA.
 - Paralelamente se monitorizó el estado inmunológico (cifras de linfocitos T CD4+/CD8+) y el estado clínico de los pacientes en los mismos intervalos de tiempo.
- **Reinicio del tratamiento antirretroviral.** Reinicio de TARAA por un periodo de tiempo de 12 semanas después de cada período de interrupción.
 - Durante este período se continuó la medición de la CV, del estado inmunológico y clínico al reinicio de TARAA y a las 6 y a las 12 semanas de dicho reinicio.

5.1.3.2 Variables dependientes.

- **Respuesta virológica.** Fue evaluada a través de la medición de la Carga Viral (CV) mediante RT-PCR.
 - **Carga viral (CV):** Cantidad de partículas virales expresada en el número de copias y el \log_{10} de dicho número por mililitro de plasma. Se midió utilizando el equipo COBAS Amplicor HIV-1 Monitor test, versión 1.5 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, EUA), cuyo límite de detección es de 400 copias/mL.
 - **CV basal:** Determinación de CV realizada al inicio de la primera interrupción estructurada.

- **CV al reinicio de TARAA:** Determinación de la CV realizada al reinicio de TARAA posterior a cada interrupción.
- **CV indetectable:** Cuando la cantidad de partículas virales fue menor de 400 copias/ml de plasma.
 - CV crónicamente indetectable:** Cuando la carga viral se mantuvo indetectable durante el tratamiento con TARAA al menos durante 12 meses previos al ingreso del estudio.
- **Respuesta inmunológica:** Grado de inmunodeficiencia secundaria a la infección por el VIH, clasificada de acuerdo a las cifras absolutas y al porcentaje de linfocitos CD4+ por edad de acuerdo a los criterios del CDC de Atlanta de 1994 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994). Se midieron por citometría de flujo:
 - **Cifras absolutas de sub-poblaciones de linfocitos T CD4+ y T CD8+:** Cifra de linfocitos CD4+ y CD8+ expresada en números absolutos/mm³.
 - **Porcentaje de linfocitos T CD4+:** Cifra de linfocitos CD4+ expresada en por ciento.
 - **Inmunosupresión severa:** Cuando las cifras absolutas o el porcentaje de linfocitos CD4+ se encontraran en la categoría 3 según los criterios del CDC de Atlanta de 1994 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994).
- **Resistencia genotípica a drogas antirretrovirales:** Se evaluó mediante secuenciación directa al final de cada interrupción, cuando era esperado que ocurrieran los rebotes virológicos, midiendo:
 - Resistencia a Inhibidores de la Proteasa (IP).
 - Resistencia a Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos Nucleósidos (ITRAN).
 - Resistencia a Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No Nucleósidos (ITRNN).

- **Respuesta inmunológica contra el VIH.** Fue evaluada en los mismos momentos que la respuesta virológica (al inicio y al final de cada interrupción y a las 6 y 12 semanas después de cada reinicio de TARAA) de la manera siguiente:
 - **Cifras absolutas de subpoblaciones de linfocitos CD4+/CD8+.** Cantidad de linfocitos T CD4+ y T CD8+ expresada en números absolutos/mm³ de sangre total. Esta cantidad se midió utilizando métodos de citometría de flujo estándar.
 - **Porcentaje de linfocitos CD4+.** Cantidad de linfocitos T CD4+ expresada en por ciento.
 - **Grado de inmunodeficiencia.** Se refiere a la profundidad de la supresión de la respuesta inmune secundaria a la infección por el VIH, clasificada de acuerdo a las cifras absolutas y al porcentaje de linfocitos T CD4+ por edad según los criterios del CDC de Atlanta de 1994 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994).
 - **Inmunosupresión severa.** Cuando las cifras absolutas o el porcentaje de linfocitos CD4+ se encontraban en la categoría 3 según los criterios del CDC de Atlanta de 1994 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994).
 - **Respuesta inmune específica contra el VIH-1.** Se consideró como tal al desarrollo de una respuesta inmunológica dirigida contra el VIH-1. Fue evaluada midiendo la síntesis de interferón gamma (IFN- γ) por células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) de los pacientes inducida por antígeno viral. Para esto se empleó el método de ELISA con el equipo comercial Quantikine Human IFN- γ Immunoassay (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, EUA).
- **Respuesta clínica al programa de IET.** Fue evaluada en los mismos momentos que la respuesta virológica e inmunológica (al inicio y al final de cada interrupción y a las 6 y 12 semanas después de cada reinicio de TARAA) de la manera siguiente:

- **Medición de la ocurrencia de infecciones oportunistas o síntomas relacionados a la infección por VIH.** Se consideraron como tales a los procesos infecciosos que son condicionados de manera directa por el estado de supresión inmunológica del paciente. Se tomaron como tales a aquellos incluidos en las categorías A, B ó C de la Clasificación de la infección por VIH en niños en Categorías Clínicas del CDC de Atlanta 1994 (**Tabla 7**) (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994).

5.1.3.3 Otras variables medidas

- **Toxicidad medicamentosa.** Se consideró como tal a toda reacción adversa a uno o varios de los medicamentos antirretrovirales con o sin riesgo potencial para la vida del paciente (como exantema, dolor abdominal, linfadenopatía, hepatitis, pancreatitis, reacción anafiláctica, etc.), o cualquier alteración en los estudios paraclínicos (como anemia, neutropenia, plaquetopenia, transaminasemia, hiperlipidemia, hiperbilirrubinemia, amilasemia, etc.) (Working Group on Antiretroviral Therapy, 2008; Sáez-Llorens and Ramilo, 1998; Solórzano-Santos et al., 2006). Fue evaluada en cada cita de seguimiento clínicamente y mediante la realización de los estudios paraclínicos respectivos (biometría hemática, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático y pancreático, lípidos y colesterol).
- **Falla en la adherencia al tratamiento.** Faltas en la ingesta de los medicamentos indicados como fue previsto de acuerdo a los ciclos de retiro y reinicio del tratamiento con TARAA. La adherencia al tratamiento fue vigilada en cada paciente durante las citas a la consulta externa a través de las siguientes acciones:
 - Información a los padres o persona legalmente responsable del paciente, y a éste cuando su edad lo permitía, antes del ingreso al estudio y durante el desarrollo del mismo sobre la importancia de la terapia ARV y de la

adherencia a la ingesta de la misma como era indicado, así como sobre los riesgos potenciales de su interrupción sin indicación médica.

- Interrogatorio dirigido a los padres o personas responsables de administrar el tratamiento, o al paciente mismo, sobre la adherencia al tratamiento como se había establecido.
- Conteo del medicamento restante, que se correlacionó con el que teóricamente debió haber consumido el paciente de acuerdo a lo que se prescribió.
- **Co-tratamientos.** Cualquier otro medicamento o maniobra terapéutica diferente a la terapia ARV que el paciente hubiere recibido como parte de otra enfermedad o debido a manifestaciones propias de la misma, y que pudieran haber influido en la evaluación de los resultados al enmascarar uno o más de los efectos de los ARV.

5.1.4 Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo de los resultados se utilizaron frecuencias simples, porcentajes, mediana, valores mínimo y máximo y los cuartiles 25 y 75. Para el análisis inferencial de las variables dependientes cuantitativas (respuesta virológica medida a través de la CV y respuesta inmunológica medida por las sub-poblaciones de linfocitos T CD4+/CD8+ y la síntesis de IFN- γ inducida por VIH) a través del tiempo antes, durante y después de las IET de TARA, se realizó un Análisis Visual Gráfico y se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) para mediciones repetidas de Friedman, considerando como significativo un valor de probabilidad menor de 0.05 ($p < 0.05$) (Lang and Secic, 1997). Para realizar el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) v. 15.0.

5.1.5 Aspectos éticos

El presente estudio se ajustó a los principios éticos de la Declaración de Helsinki y sus desarrollos posteriores y a los Principios de las Buenas Prácticas Clínicas en relación a las investigaciones que se realizan en seres humanos, así como a la normatividad vigente del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. A cada paciente, si la edad de éste lo permitía, y/o a la persona considerada legalmente responsable del paciente, se le solicitó el consentimiento informado por escrito de forma absolutamente esencial para participar en el estudio, una vez que habían recibido la información detallada sobre los posibles riesgos y beneficios potenciales de las IET de TARAA. Además, se garantizó la confidencialidad absoluta sobre la información obtenida de los pacientes en la realización del presente estudio (**Apéndice**).

5.2 Descripción de la estrategia experimental en cada fase del estudio

5.2.1 Fase 1: Estrategia inicial para la evaluación de la respuesta virológica, inmunológica y clínica a las IET de TARAA (Objetivo general 3.1.1).

Para evaluar la respuesta virológica, inmunológica y clínica a las IET se incluyeron niños con infección perinatal por VIH-1 del Departamento de Pediatría e Infectología Pediátrica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 del IMSS. A todos los niños se les dio seguimiento virológico, inmunológico y clínico para asegurar el cumplimiento de los criterios de inclusión durante 12 meses, criterios que a continuación se describen: 1) Carga viral por debajo de los límites de detección (<400 copias/mL ó $<1.69 \log_{10}$), 2) sin supresión inmunológica, y 3) condición asintomática para SIDA al menos durante el último año. Luego de la valoración anual antes mencionada, cuatro niños que cumplieron los requerimientos fueron incluidos en el programa de IET con suspensión del tratamiento antirretroviral durante 4 semanas seguidas de 12 semanas bajo tratamiento hasta completar tres ciclos de interrupción/reinicio. En la Figura 3 se esquematiza la estrategia utilizada en este programa de IET y los momentos en los cuales los pacientes fueron evaluados clínicamente y fueron tomadas las muestras para evaluar la respuesta virológica, inmunológica y de seguridad. No se hicieron cambios en el tratamiento antirretroviral administrado en cada niño durante todo el estudio.

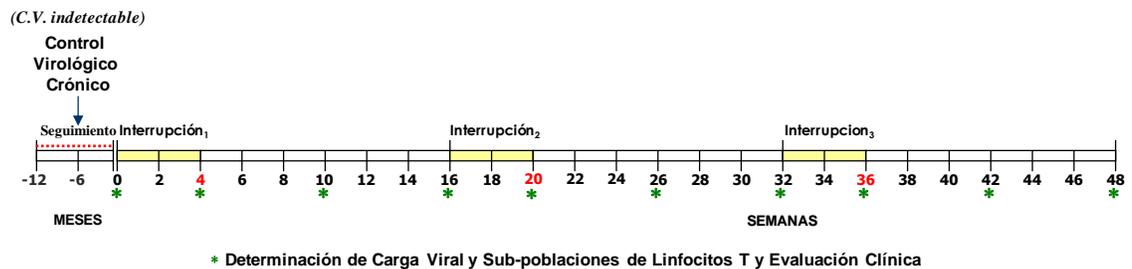


Figura 3. Estrategia empleada para la evaluación clínica e inmunológica durante el programa IET de TARAA. *Evaluación de carga viral, cuentas de linfocitos T y clínica.

5.2.1.1 Evaluación de la respuesta virológica a través de la mediación de la Carga Viral (CV).

La respuesta virológica fue evaluada a través de la medición de la CV mediante RT-PCR, utilizando el equipo COBAS Amplicor HIV-1 Monitor test, versión 1.5 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ), cuyo límite de detección es de 400 copias/mL.

5.2.1.2 Evaluación de la respuesta inmunológica a través de la medición de la respuesta proliferativa celular T CD4+/CD8+.

- **Preparación de la muestra.** Se extrajo sangre asépticamente por punción venosa en un tubo estéril Vacutainer con K₃ EDTA (tapa color lila). Con un mínimo de 1 mL de sangre total, cada muestra se mantuvo a temperatura ambiente (20° a 25° C) y se tiñó dentro de las 6 horas siguientes a la punción venosa. Antes de proceder a la tinción se obtuvo un recuento de leucocitos y una fórmula leucocitaria de la misma muestra de sangre. Un recuento aceptable de glóbulos blancos varía entre 3.5×10^3 y 9.4×10^3 leucocitos por μL . Las muestras con un recuento de leucocitos mayor de 9.4×10^3 se diluyeron con 1X de solución fisiológica tamponada con fosfatos (PBS) conteniendo azida de sodio al 0.1% o con FACS FLOW. Cuando las muestras tenían un recuento menor de 3.5×10^3 leucocitos fue necesario obtener una muestra de sangre mayor y seguir el procedimiento de separación de células para concentrarlas. No se utilizaron muestras de células previamente fijadas y conservadas. Las muestras de sangre entera refrigerada antes de teñirlas pueden dar resultados erróneos. Para obtener resultados óptimos, la sangre se debe teñir dentro de las 6 horas de extraída.

- **Método.** Se rotularon tres tubos de poliestireno de 12 x 15mm (Becton Dickinson 352058) por cada paciente de la siguiente manera CD45/14, CD3/4 y CD3/8. Se siguieron las instrucciones del fabricante como a continuación se describe:

1. Se depositaron 100 μL de sangre total con EDTA en cada tubo.

2. Con la misma puntilla se colocó una gota de sangre completa en un portaobjeto para realizar la extensión y obtener el diferencial que se utiliza para obtener los números absolutos de cada una de las subpoblaciones.
3. Se agregaron 20 μ l de anticuerpos monoclonales a cada tubo por determinación.
4. Se agitó en vortex a baja velocidad.
5. Se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 20 min.
6. Se añadió 1 mL de solución de lisis 1x (FACS™ Lysing solution. Becton Dickinson 349202) y se dejó en oscuridad por 10 min.
7. Centrifugación a 1,300 rpm/5 min.
8. Eliminación del sobrenadante por decantación.
9. Se agregaron 2 ml de PBS 1 x (Modificación Dulbecco, pH7.2; PO₄ 0,01 mol/L; NaCl 0,15 mol/L, se pasó a través de un filtro 0,2 mm y se conservó entre 2° y 8°C).
10. Se eliminó sobrenadante por decantación.
11. Se agregaron 500 μ L de paraformaldehído al 1%.
12. Se realizó lectura en el citómetro de flujo (Altra Beckman Coulter) y registro de los datos obtenidos en porcentaje.

- **Interpretación de los resultados.** Los resultados son expresados en porcentaje y en cuentas absolutas por mm^3 a partir de leucocitos totales y el porcentaje de linfocitos de una biometría hemática. El grado de inmunodeficiencia fue determinado de acuerdo al número absoluto o el porcentaje de linfocitos T CD4+ tomando como base la clasificación en categorías inmunológicas para niños con infección por VIH del CDC de Atlanta de 1994 (**Tabla 9**) (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994).

5.2.1.3 Evaluación de la respuesta clínica.

La respuesta clínica al programa de IET fue evaluada en los mismos momentos que la respuesta virológica e inmunológica (al inicio y al final de cada interrupción y a las 6 y 12 semanas después de cada reinicio de TARAA) a través de la medición de la ocurrencia de infecciones oportunistas y síntomas relacionados a la infección por VIH, considerando como tales a los procesos infecciosos que son condicionados de manera directa por el estado de supresión inmunológica del paciente. Se tomaron como tales a aquellos incluidos en la Clasificación de la infección por VIH en niños en Categorías Clínicas del CDC de Atlanta 1994 (**Tabla 7**) (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994). Además, en esos mismo momentos durante el seguimiento se evaluaron datos clínicos y paraclínicos de toxicidad medicamentosa, así como la adherencia al tratamiento.

5.2.1.4 Criterios de respuesta a la maniobra experimental. Para evaluar la respuesta al programa de IET de TARAA se utilizaron los siguientes criterios:

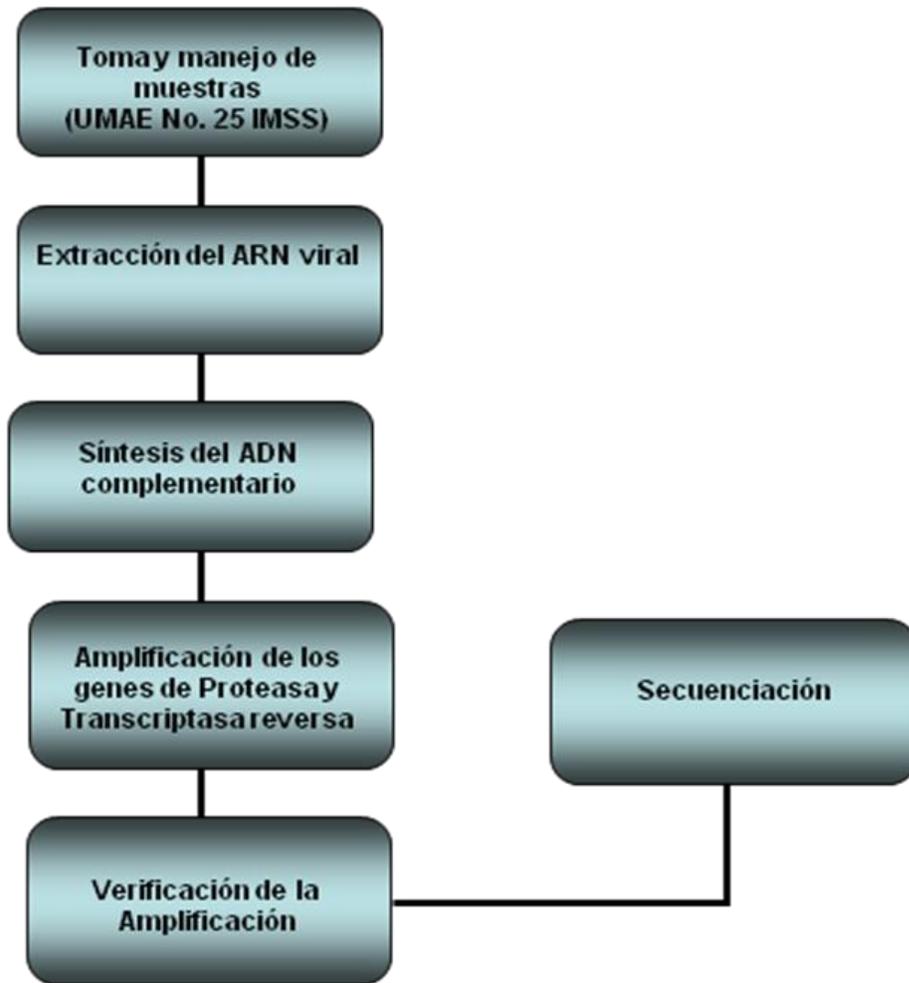
5.2.1.4.1 Criterios referentes a las IET del tratamiento antirretroviral:

- **Criterio de éxito de la interrupción.** Rebote de la CV menor de $5 \log_{10}$ y sin inmunosupresión severa de acuerdo a las cifras de linfocitos CD4+ durante las 4 semanas de interrupción de TARAA.
- **Criterio de falla de la interrupción.** Incremento de la carga viral mayor a $5 \log_{10}$ y/o ocurrencia de inmunosupresión severa de acuerdo a las cifras de linfocitos CD4+ durante las interrupciones de TARAA.

5.2.1.4.2 Criterios referentes al reinicio del tratamiento antirretroviral después de una IET de TARAA:

- **Criterio de éxito del reinicio.** Descenso de la carga viral $> 2 \log_{10}$ dentro de los 3 meses del reinicio de TARAA.
- **Criterio de falla del reinicio.** Descenso de la CV no $> 2 \log_{10}$ dentro de los 3 meses del reinicio de TARAA.

5.2.2 Fase 2: Estrategia para la evaluación de la ocurrencia de mutaciones relacionadas a resistencia antirretroviral al final de los períodos de interrupción de TARAA (Objetivo general 3.1.2).



5.2.2.1 Momento de la toma y características de las muestras para genotipificación.

Al final de cada período de interrupción de TARAA se colectaron 7-10 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante (EDTA) y el plasma fue separado por

centrifugación a 1000 rpm durante 10 min y posteriormente almacenado a -80° C hasta la realización de la genotipificación (**Figura 4**).

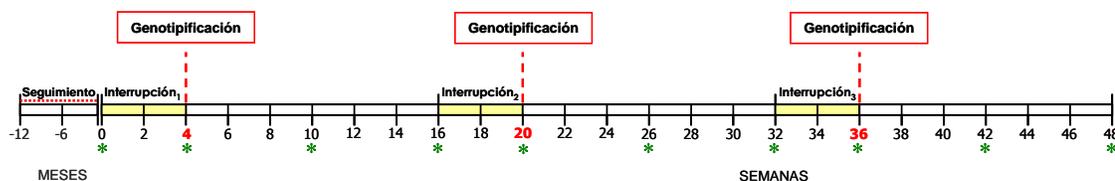


Figura 4. Estrategia empleada en el programa de IET de TARAA que incluye los tiempos en que fue realizada la genotipificación (final de cada período de interrupción).

5.2.2.2 Extracción de ARN viral.

Para obtener el ARN viral a partir del plasma se empleó el *MagMAX Viral RNA Isolation Kit* (Ambion, Austin TX). Se tuvo especial cuidado en la asepsia del lugar y pipetas de trabajo, por lo cual se utilizó “*RNaseZap Solution*” (Ambion; Austin TX) para eliminar posibles ARNasas. El procedimiento se desarrolló bajo las condiciones de bioseguridad pertinentes y siguiendo las instrucciones del fabricante que a continuación se especifican.

5.2.2.3 Preparación de reactivos para la extracción de ARN viral

Se adicionaron 12 mL de alcohol isopropílico al 100% a la botella etiquetada como “*Wash Solution 1 Concentrate*” y se mezcló suavemente por inversión. De igual forma, 44 mL de etanol al 100% fueron añadidos a la botella etiquetada como “*Wash Solution 2 Concentrate*” y se volvió a mezclar gentilmente. Estos reactivos se almacenaron a temperatura ambiente para ser utilizados en cada procedimiento de extracción.

Para cada extracción de ARN los reactivos fueron descongelados a temperatura ambiente, excepto el “*Carrier RNA*” que fue incubado a 37 °C durante 10 min. Se adicionó el “*Carrier RNA*” al “*Lysis/Binding Solution Concentrate*” de la forma en que se indica en la **Tabla 12**. Posteriormente fue añadido alcohol isopropílico al 100%. Esta mezcla es llamada “*Lysis/Binding Solution*” durante el procedimiento de

extracción y se prepara de acuerdo al número de reacciones ya que es estable por un mes a temperatura ambiente y no se recomienda guardar a menor temperatura.

Tabla 12

Mezcla para preparar la “*Lysis/Binding Solution*” para la extracción de ARN viral empleando el “*MagMAX Viral RNA Isolation Protocol*” (Ambion, Austin, TX).

a) Combinar lo siguiente:	Reacción
<i>Lysis/Binding Solution Concentrate</i>	400 µL
<i>Carrier RNA</i>	2 µL
b) Mezclar gentilmente y añadir:	
Alcohol isopropílico al 100%	400 µL
c) Mezclar en vortex suave	

Cada reacción de aislamiento de ARN requiere de 20 µL de *Bead Mix*. Aunque ésta mezcla es estable a 4 °C hasta dos semanas, sólo se preparó la cantidad necesaria para utilizarse, ya que así lo recomienda el fabricante. La mezcla fue preparada como se muestra en la **Tabla 13**. La mezcla fue agitada suavemente en el vortex y colocada en hielo hasta su empleo posterior.

Tabla 13

Componentes para preparar el “*Bead Mix*” para extracción de ARN viral empleando el “*MagMAX Viral RNA Isolation Protocol*” (Ambion, Austin, TX).

Componente	Reacción
<i>RNA Binding Beads</i>	10 µL
<i>Lysis/Binding Enhancer</i>	10 µL

5.2.2.4 Protocolo de extracción de ARN viral

Se colocaron 802 μL de “*Lysis/Binding Solution*” en un tubo eppendorf para microcentrífuga de 1.5 mL y posteriormente se transfirieron 400 μL de la muestra evitando la formación de bioaerosoles. Fue necesario mezclar suavemente para crear una mezcla homogénea y centrifugar durante 5 segundos a velocidad moderada para eliminar residuos en la parte superior del tubo de proceso. A continuación se añadieron 20 μL del “*Bead Mix*” y se incubó a 37 °C durante 4 minutos a 900 rpm. La muestra fue colocada en una gradilla magnética (“*Single Place Magnetic Stand*”; Ambion, Austin, TX) durante 3 minutos. Después del tiempo marcado, se formó una pastilla de “*RNA Binding Beads*” y se eliminó cuidadosamente todo el sobrenadante. Una vez realizado lo anterior, el tubo de la muestra fue retirado de la gradilla magnética. Luego se agregaron 300 μL de “*Wash Solution 1*” a cada muestra y fueron agitadas suavemente durante 30 s seguido de una centrifugación de 5 s a velocidad moderada. A continuación se colocó cada tubo en la gradilla magnética durante 3 min y se eliminó todo el sobrenadante. Este procedimiento fue realizado en dos ocasiones. En seguida, se adicionaron 450 μL de “*Wash Solution 2*” a cada muestra y éstas fueron agitadas suavemente durante 30 s y centrifugadas solo 5 s. Se colocó cada tubo en la gradilla magnética durante 3 min y se eliminó todo el sobrenadante. Este proceso de lavado fue realizado por duplicado. Fue importante eliminar todo los residuos de la solución de lavado 2.

Luego de lo anterior, se dejaron los tubos abiertos durante 2 min para permitir la evaporación de cualquier residuo de alcohol. Se añadieron 35 μL de buffer de elución previamente calentado a 60 a 65 °C y se incubó a 37 °C durante 4 min a 900 rpm. Es importante mencionar que el volumen empleado de la solución de elución puede variar de 20 a 50 μL para lograr la concentración de material genético deseado. Finalmente, se colocaron los tubos en la gradilla magnética durante 3 min para capturar las perlas magnéticas. Se transfirió todo el sobrenadante, el cual contenía el ARN viral, a un tubo libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C.

5.2.2.5 Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADN de cadena sencilla se empleó el método de transcripción reversa con iniciadores aleatorios usando el “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se siguieron las indicaciones del fabricante que a continuación se describen. 10 µL del ARN viral se mezclaron con 10 µL de la mezcla de reacción al 2X cuya composición se describe en la **Tabla 14**. Las condiciones de incubación se programaron en un termociclador (PTC 200, MJ Research/BioRad) y fueron 10 min a 25 °C, seguido de 120 min a 37 °C y finalmente 5 s a 85 °C. El ADNc producido fue almacenado a -20 °C hasta su empleo posterior.

Tabla 14

Mezcla de reacción al 2X para la síntesis de ADNc usando el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Componente	Volumen / Reacción (µL)
<i>10x RT Buffer</i>	2.0
<i>25x dNTP Mix (100 mM)</i>	0.8
<i>10x RT Random Primers</i>	2.0
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	1.0
Agua libre de nucleasas	4.2
Volumen Final	10.0

5.2.2.6 Amplificación de la proteasa y transcriptasa en reversa

La amplificación mediante PCR de los segmentos codificantes para la proteasa y la transcriptasa reversa del gen *pol* fue realizada empleando cuatro pares de oligonucleótidos. En la **Figura 5** se representa el gen al que pertenecen los genes de la proteasa y la transcriptasa reversa y la estrategia en el diseño de los oligonucleótidos.

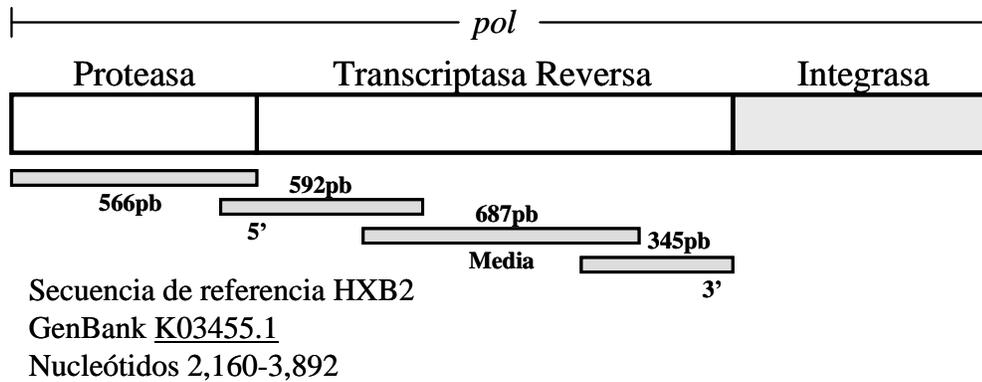


Figura 5. Estrategia de amplificación del gen de la proteasa y transcriptasa reversa. La integrasa no fue incluida en el estudio, en la imagen se muestra para fines esquemáticos.

Para la amplificación de la proteasa completa se utilizaron los iniciadores reportados por Valle-Bahena (**Tabla 15**) (Valle-Bahena et al., 2006). La transcriptasa reversa fue amplificada en tres fragmentos contiguos, el fragmento 5' y 3' empleando los oligonucleótidos reportados, mientras que el fragmento intermedio fue amplificado utilizando iniciadores diseñados de nuevo. Todos los oligonucleótidos fueron probados *in silico* tomando como base la secuencia de referencia HXB2 (*GenBank K03455*) en el programa computacional “*Ampli Fx*” v1.3.6 (*Real Basic* 2004-2005). También se probaron las condiciones de reacción y amplificación mediante gradiente de temperatura y/o magnesio. Todas las reacciones fueron preparadas dentro de una campana de flujo exclusiva para PCR y bajo condiciones de esterilidad.

Tabla 15

Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes de la proteasa y de los fragmentos 5', intermedio y 3' de la transcriptasa reversa.

	Oligonucleótido	Tm	Tamaño	%G-C
<i>Proteasa</i>				
Prot-F	CCC ACC AGA AGA GAG CTT CAG G	68.40°	22	59.1
Prot-R	GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GGC CC	68.60°	26	46.2
<i>Región 5' de la Transcriptasa Reversa</i>				
5'RT-F	CCC ATT AGC CCT ATT GAG ACT G	59.98°	22	50.0
3'RT-R	GCT GCC CTA TTT CTA AGT CAG ATC C	62.73°	25	48.0
<i>Región Intermedia de la Transcriptasa Reversa</i>				
IRT-F	CCA GGG ATT AGA TAT CAG TAC	60.00°	21	42.9
IRT-R	TAA TTG TTT TAC ATC ATT AGT GTG G	64.00°	25	28.0
<i>Región 3' de la Transcriptasa Reversa</i>				
5'RT-F	GCA AGG CCA ATG GAC ATA	57.98°	18	50.0
3'RT-R	CTG TTA GCT GCC CCA TCT AC	57.45°	20	55.0

La mezcla de reacción para la amplificación de los cuatro fragmentos se describe en la **Tabla 16**.

Tabla 16

Condiciones de reacción para la amplificación de los genes de la proteasa y de los fragmento 5' y 3' de la transcriptasa reversa.

Componente de Reacción	Cantidad (μL)
Buffer de Reacción 10x	3.0
MgCl ₂ (25 mM)	1.2
dNTP's mix (100 mM)	0.8
Oligo 5' (10 μM)	0.5
Oligo 3' (10 μM)	0.5
<i>Platinum Taq DNA polimerasa</i> 5 u/μL	0.5
ADNc Templado	2.0
H ₂ O Completar a	30.0

Las condiciones de amplificación fueron programadas en un termociclador (PTC 200, MJ Research/BioRad) teniendo en cuenta la T_m de cada oligonucleótido para la temperatura de alineamiento (**Tabla 17**).

Tabla 17

Condiciones de amplificación para los genes de la proteasa y de los fragmentos 5', intermedio y 3' de la transcriptasa reversa.

Paso	Temperatura en C	Tiempo	Evento
1	94°	00:02:00	Desnaturalización
2	94°	00:00:30	Desnaturalización
	66° 57° 54° 55°	00:01:00	Alineamiento
4	72°	00:01:00	Extensión
5	40 ciclos a partir del paso 2		
6	72°	00:05:00	Extensión final

5.2.2.7 Verificación de los productos de amplificación

Para verificar los productos amplificados se realizó un corrimiento electroforético colocando 5 µL de cada uno de los productos de PCR más 3 µL de jugo azul al 6X (*Invitrogen*) y utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb ("*1kb Ladder*", *Invitrogen*) en gel de agarosa al 1.2 %. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante tinción del gel con Bromuro de Etidio. Los tamaños esperados de amplificación son de 566 pb para la proteasa y de 592, 687 y 345 pb para los fragmentos de la transcriptasa reversa de la región 5', de la región intermedia y de la región 3', respectivamente. Para las muestras en las que no se observó un producto amplificado en el gel de electroforesis se procedió a realizar una reamplificación a partir del tubo de amplicón bajo las condiciones de reacción correspondientes.

5.2.2.8 Verificación del ADNc mediante amplificación por PCR en tiempo real

Para validar la calidad del ADNc de las muestras de los pacientes en los que no se logró obtener un producto amplificado mediante el PCR convencional y reamplificación, se realizó una reacción de PCR en Tiempo Real empleando los oligonucleótidos para la región 3' de la transcriptasa reversa. La mezcla de reactivos para la reacción de PCR en tiempo real se presenta en la **Tabla 18** y la reacción fue realizada en el termociclador *StepOne Real Time PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se respetaron las condiciones de amplificación predeterminadas para *SYBR Green* ajustando solo la temperatura de alineamiento de 55 °C que corresponde al juego de oligonucleótidos.

Tabla 18

Condiciones de amplificación para el fragmento 3' de la transcriptasa reversa mediante PCR en Tiempo Real empleando *SYBR Green*.

Componente	Volumen / Reacción (µL)
<i>SYBR Green</i> Master Mix 2x	7.5
Oligo 5' (10 µM)	1.0
Oligo 3' (10 µM)	1.0
ADNc Templado	1.0
Agua libre de nucleasas	4.5
Volumen Final	15.0

5.2.2.9 Secuenciación y evaluación de las secuencias

La secuenciación directa se llevó a cabo por el método enzimático de Sanger partiendo de los productos amplificados de la proteasa y transcriptasa reversa. Se

siguió el protocolo para *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) utilizando un secuenciador de cuatro capilares *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con la secuencia de referencia HXB2 (*GenBank K03455*) utilizando el programa computacional *Sequencing Analysis v5.2* (Applied Biosystems, 2004) y el *SeqScape v2.5* (Applied Biosystems, 2004). Las condiciones de reacción para marcar los productos a secuenciar se detallan en la **Tabla 19** y fueron realizadas en dirección 5' a 3' y 3' a 5'. Posteriormente se programaron en un termociclador las temperaturas y tiempos de incubación (**Tabla 20**).

Tabla 19

Condiciones de amplificación para la reacción de secuenciación.

Componente de Reacción	≥ 500 pb	≤ 300 pb
Buffer de Reacción5x	4.0 µL	4.0 µL
BigDye	5.0 µL	3.0 µL
Oligos (10 mM) (sentido o antisentido)	1.0 µL	1.0 µL
Producto de PCR Templado	3.0 µL	3.0 µL
H ₂ O	20.0 µL	20.0 µL

Tabla 20

Condiciones para el marcaje de los productos de PCR empleando el *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

Paso	Temperatura	Tiempo (hh:mm:ss)
1	96 °C	00:01:00
2	96 °C	00:00:10
3	50 °C	00:00:05
4	60 °C	00:04:00
5	Go to step 2 for 28 times	--
6	4 °C	

Posterior al marcaje, se prosiguió con la purificación de los productos de acuerdo a las condiciones que se detallan en la **Tabla 21**. Cada componente fue añadido de forma independiente a cada tubo de reacción y se tuvo especial cuidado en evitar una prolongada exposición a la luz.

Tabla 21

Protocolo para la purificación de los productos marcados para la secuenciación.

a)	Agregar lo siguiente:	Por reacción
	EDTA 125 mM	2 μ L
	Acetato de Sodio	2 μ L
	Etanol 100% GM (en frío)	50 μ L
b)	Mezclar gentilmente	
	Incubar 20 min T.A. (no luz)	
	Centrifugar 3 200 xg a 4 °C durante 45 min	
	Decantar y añadir:	
	Etanol al 70% GM (en frío)	70 μ L
c)	Centrifugar 4 200 xg a 4 °C durante 30 min	
	Decantar sobrenadante	
	Dejar evaporar 5 min a T.A.	
	Incubar a 60 °C durante 10 min	
d)	Almacenar a -20 °C cubiertos de la luz o resuspender en:	
	Formamida	12 μ L
	Incubar a 94 °C durante 5 min	

5.2.2.10 Determinación de mutaciones que confieren resistencia a antirretrovirales y evaluación de subtipos

El reporte de las mutaciones y su interpretación se obtuvieron mediante análisis computarizado utilizando el “*HIV Drug Resistance Database*” de la Universidad de Standford. El programa estima los niveles de resistencia a los Inhibidores de la Proteasa (IP) e Inhibidores de la Transcriptasa Reversa (TR) actualmente en uso clínico basándose en las mutaciones encontradas en la secuencia analizada. Ésta

sección estima la resistencia a estas drogas designándole uno de los siguientes cinco niveles:

1. Susceptible (*susceptible*)
2. Resistencia potencial de bajo nivel (*potential low-level resistance*)
3. Resistencia de bajo nivel (*low-level resistance*)
4. Resistencia intermedia (*intermediate resistance*)
5. Resistencia de alto nivel (*high-level resistance*)

El programa también puede identificar inserciones o deleciones.

La determinación del subtipo vial fue realizado empleando la herramienta bioinformática *REGA HIV-1 Subtyping Tool* (de Oliveira et al., 2005).

5.2.2.10.1 Interpretación de resistencia a inhibidores de la proteasa (IP)

Las mutaciones en el gen de la Proteasa son divididas en tres categorías:

1. Mutaciones de Resistencia Mayor a IP
2. Mutaciones de Resistencia Menor a IP
3. Otras mutaciones

Las Mutaciones Mayores son definidas como mutaciones que por sí solas pueden inducir la susceptibilidad a uno o más IP o mutaciones no polimórficas que están ampliamente consideradas como inductoras de resistencia a drogas. Las Mutaciones Menores son mutaciones generalmente consideradas como accesorias. Tanto las Mutaciones Mayores como las Menores reciben una puntuación y se muestra un comentario asociado. Aquellas definidas como “Otras Mutaciones” son mutaciones que no se consideran como inductoras de resistencia y no reciben una puntuación, sin embargo, si se presentan mutaciones inusuales importantes, éstas reciben una puntuación indicándose como mutaciones inusuales en una posición importante.

5.2.2.10.2 Interpretación de resistencia a inhibidores de la transcriptasa reversa (TR)

Las mutaciones en el gen de la transcriptasa reversa (TR) son divididas en tres categorías:

1. Mutaciones de Resistencia a Inhibidores de la TR Análogos Nucleósidos (*NRTI-resistance mutations*).
2. Mutaciones de Resistencia a Inhibidores de la TR No-Nucleósidos (*NNRTI-resistance mutations*).
3. Otras mutaciones (*other mutations*).

5.2.3 Fase 3: Estrategia experimental para la evaluación del desarrollo de respuesta inmune específica contra el VIH a través de la síntesis de IFN- γ inducida por la exposición a antígeno viral (Objetivo general 3.1.3).

5.2.3.1 Momento de la toma y características de las muestras para la evaluación de la síntesis inducida de IFN- γ .

Al principio y final de cada período de interrupción y en el resto de las mediciones a las seis y doce semanas después del reinicio de TARA, se colectaron 5 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante (EDTA), los cuales fueron procesados inmediatamente como se describe más adelante (Figura 6).

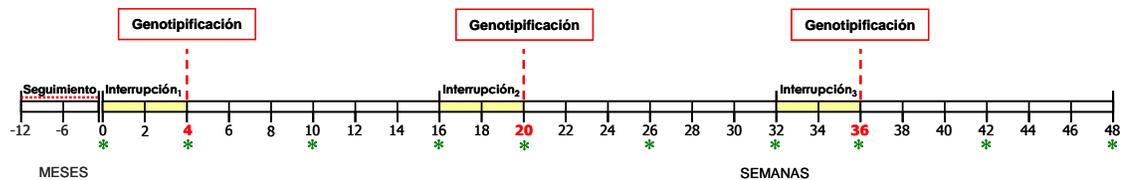


Figura 6. Estrategia empleada en el programa de IET que incluye los tiempos (marcados con un “*”) en que fueron tomadas las muestras para evaluar la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica al ser expuestas a antígeno de VIH.

5.2.3.2 Evaluación del desarrollo de respuesta inmune específica frente al VIH-1 a través de la síntesis inducida de IFN- γ .

5.2.3.2.1 Obtención del antígeno viral a partir de lisado viral.

El antígeno del VIH-1 para estimular a las células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) fue obtenido a partir de una placa comercial de

ELISA (*Vironostika HIV Uni-Form II plus O*, Biomerieux, Boxtel, The Netherlands) que es usada para el diagnóstico clínico de la infección por VIH-1. Se recuperó el antígeno por medio de la adición de 100 µL de saponina al 0.1% a cada pozo, se incubó a 4 °C toda la noche, se colectó la solución y se sometió a diálisis con PBS por 48 h. Posteriormente el antígeno fue purificado con isopropanol frío en una relación 2:1, se incubó por 20 min a 4°C y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. El paquete se lavó con etanol al 100%, se disolvió en PBS y se determinó la concentración de antígeno proteico por el método para la determinación de la concentración de proteínas de Stanford.

5.2.3.2.2 Extracción de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP). La sangre diluida 1:1 con solución salina (0.85%) fue depositada suavemente sobre 6 a 8 mL de *Ficoll-Paque Plus* (*Amersham Biosciences*) para formar un gradiente de densidad. Posteriormente, siguiendo el protocolo del fabricante, se centrifugó a 1200 rpm durante 30 min a temperatura ambiente (*Centrífuga Beckman GRP*). Al final de este procedimiento se forma un anillo de CMSP en la interfase, el cual fue recuperado empleando una micropipeta estéril desechable. Las CMSP fueron lavadas utilizando Alsever a 2500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente en 3 ocasiones.

5.2.3.2.3 Estimulación de las CMNSP con antígeno viral

El paquete celular fue resuspendido en 1 mL de RPMI-1640 suplementado con antibiótico (penicilina y estreptomina), ajustando las células a una concentración de 2×10^6 . Luego se depositaron 200 µL en placas de cultivo de 96 pozos (Costar) por triplicado y se adicionaron 10 µL del antígeno crudo recombinante a una concentración de 8 µg/10 µL. Como control positivo se utilizó PHA a una concentración de 20 mg/ml. Las mezclas fueron incubadas a 37°C por 24 h con humedad y CO₂ controlados. Posteriormente se realizó la determinación de la síntesis de INF-γ por duplicado.

5.2.3.2.4 Determinación cuantitativa de IFN- γ . La síntesis de interferón gamma (IFN- γ) por las CMSP inducida por el antígeno viral se evaluó utilizando el método de ELISA con el equipo comercial *Quantikine Human IFN- γ Immunoassay* (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN).

6. RESULTADOS

6.1 Fase 1: Evaluación inicial de la respuesta virológica, inmunológica y clínica al programa de IET.

6.1.1 Características generales de los pacientes incluidos. Después de un año de permanecer con CV bajo el límite de detección, sin inmunosupresión y asintomáticos, en Mayo de 2005 se incluyeron cuatro niños, tres del sexo femenino y uno del masculino, con una edad de 10.3 años (mediana, límites de 6.5 – 11.2 años). Los cuatro niños adquirieron la infección por VIH por vía perinatal. Las categorías clínico-inmunológicas de estos niños fueron: A1 (n = 2), A2 (n = 1), y B3 (n = 1). Los cuatro niños estaban en tratamiento antirretroviral con zidovudina (AZT) + lamivudina (3TC) + ritonavir (RTV) a las dosis pediátricas recomendadas (Working Group on Antiretroviral Therapy, 2008; Palacios et al., 2002). El uso de RTV a dosis completas como único inhibidor de la proteasa era aún recomendado para el tratamiento inicial de niños con infección por VIH en México cuando el estudio inició (Palacios et al., 2002; Solórzano-Santos et al., 2006; CENSIDA, 2009). Uno de los pacientes había recibido previamente dos esquemas antirretrovirales, el último de ellos a base de indinavir (IDV) + AZT + 3TC. El IDV se cambió a RTV debido a toxicidad medicamentosa (**Tabla 22**).

Tabla 22

Características basales de cuatro niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Edad (años)	6.5	11.2	7.3	8.4
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino	Masculino
Tratamiento AR previo (meses)	–	AZT+ddC (28)	–	–
Esquema TARAA ^a (meses)	RTV+AZT+3TC (53)	RTV+AZT+3TC (8)	RTV+AZT+3TC (36)	RTV+AZT+3TC (29)
Carga viral	<400 copias/mL (<2.6 log ₁₀ /mL)			
Categoría Clínico- inmunológica ^b	A2	A1	B3	A1

^aAl ingreso al programa de STI.

^bDe acuerdo a la clasificación del CDC de 1994 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994).

AR: Antirretroviral; AZT: Zidovudina; ddI: Didanosina; IDV: Indinavir; 3TC: Lamivudina; RTV: Ritonavir.

6.1.2 Respuesta virológica. Los cuatro niños tuvieron una CV bajo el límite de detección durante por lo menos 12 meses antes de iniciar los ciclos de interrupción/reinicio de TARAA. Al final del primer período de 4 semanas de interrupción de TARAA, el rebote virológico fue de 214,000 copias/ml (mediana, límites 27,400-616,000) ó 5.3 log₁₀ (límites 4.4-5.8). La CV cayó bajo el límite de detección a las 6 semanas de haber reiniciado el TARAA y se mantuvo así en la medición de las 12 semanas posterior al reinicio de TARAA. Debido a que este primer rebote virológico fue más alto de lo esperado pero la CV cayó a niveles indetectables

después del reinicio del tratamiento, se solicitó autorización para continuar con los siguientes ciclos de interrupción/reinicio al Comité de Ética e Investigación del Hospital de Especialidades No. 25. Los investigadores esperaban que los rebotes de la CV fueran no mayores a $4 \log_{10}$ al final de cada período de cuatro semanas de interrupción de TARAA (Borkowsky et al., 2008; Marchou et al., 2007). El Comité de Ética e Investigación decidió aprobar la continuación del ensayo en base a la reducción de la CV a niveles indetectables después del reinicio de TARAA. Con la segunda interrupción la CV incrementó a 72,400 copias/ml (mediana, límites 17,800-126,000) ó $4.7 \log_{10}$ (4.2-5.1), lo cual corresponde a un rebote virológico $0.6 \log_{10}$ menor que el primero ($p=0.068$). Al final del tercer período de interrupción el rebote de la CV fue de 28,200 copias (5370-140,000) ó $4.45 \log_{10}$ (3.7-5.1), un rebote $0.85 \log_{10}$ menor que el primero ($p=0.050$). Todos los rebotes virológicos fueron seguidos por una reducción de la CV a niveles indetectables durante los períodos con TARAA, con excepción de una de las niñas que tuvo una CV de 9530 copias/ml ($3.98 \log_{10}$) a las 12 semanas del tercer reinicio de TARAA, el cual coincidió con un cuadro infeccioso de vías aéreas superiores catalogado clínicamente como de etiología probablemente viral; sin embargo, no se determinó la etiología. La CV de este paciente llegó a ser indetectable seis semanas después (**Tabla 23** y **Figura 7**).

Tabla 23

Carga viral^a y linfocitos T^b de cuatro niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento.

	Tiempo de seguimiento											
	Meses			↓	Semanas			↓				
	-12	-6	0	4	10	16	20	26	32	36	42	48
	TARAA		IET ^c		TARAA		IET		TARAA		IET	
Paciente 1:												
CV	<400	<400	<400	616000	<400	<400	17800	<400	<400	25100	<400	9530
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	5.79	<2.6	<2.6	4.25	<2.6	<2.6	4.4	<2.6	3.98
CD4+ %	33.3	51	44	18	ND	32.2	22	ND	21	26	35	36
CD4+ (No.)	829	927	858	648	ND	711	585	ND	673	485	534	692
CD8+ (No.)	815	838	1029	2865	ND	963	1975	ND	2387	1280	958	1124
Paciente 2:												
CV	<400	<400	<400	27400	<400	<400	19800	<400	<400	5370	ND	<400
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	4.44	<2.6	<2.6	4.3	<2.6	<2.6	3.73	ND	<2.6
CD4+ %	41.9	39.9	34.7	34	ND	25.2	ND	43	49	47	52	ND
CD4+ (No.)	1199	1435	553	1445	ND	685	ND	1567	1729	1388	2004	ND
CD8+ (No.)	746	1032	511	2559	ND	635	ND	1818	1585	1434	1681	ND
Paciente 3:												
CV	<400	<400	<400	269000	<400	<400	126000	<400	ND	31300	ND	<400
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	5.43	<2.6	<2.6	5.1	<2.6	ND	4.5	ND	<2.6
CD4+ %	30.4	33.8	40	14	ND	34.3	16	38	ND	24	ND	35
CD4+ (No.)	890	546	1215	308	ND	763	493	766	ND	623	ND	489
CD8+ (No.)	1121	670	1619	1846	ND	871	2370	1166	ND	1775	ND	814
Paciente 4:												
CV	<400	<400	<400	159000	<400	<400	125000	<400	ND	140000	ND	<400
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	5.2	<2.6	<2.6	5.1	<2.6	ND	5.15	ND	<2.6
CD4+ %	42.5	36.2	47	22	ND	36.9	33	39	ND	27	ND	25
CD4+ (No.)	1186	415	1168	887	ND	1115	895	796	ND	677	ND	572
CD8+ (No.)	1159	511	1197	2896	ND	1117	1689	1125	ND	1960	ND	1483

TARAA: Terapia Antirretroviral Altamente Activa; IET: Interrupción Estructurada del Tratamiento; CV: Carga viral; ND: No determinado.

^aMedida por el número de copias de RNA viral /mL y el log₁₀ de dicho número.

^bMedidos por el porcentaje de células CD4+ y el número absoluto de células CD4+ and CD8+/ μ l.

^cLas mediciones correspondientes a las STI fueron realizadas al final de cada período de 4 semanas sin tratamiento. Las flechas corresponden al inicio de cada período de interrupción.

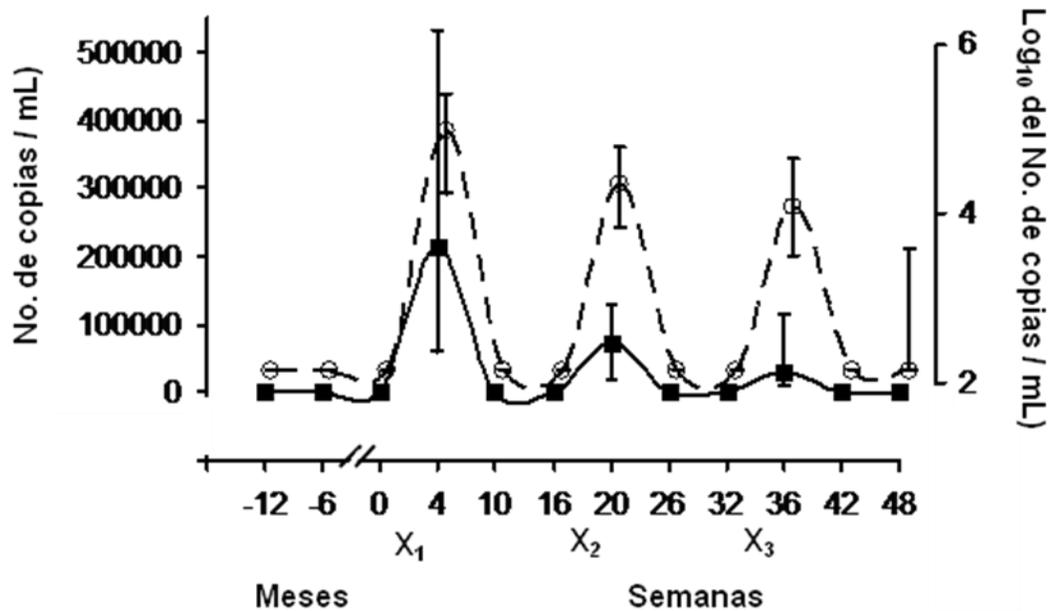


Figura 7. Carga viral en número de copias de RNA / mL (cuadros llenos) y en \log_{10} de dicho número (círculos vacíos) de cuatro niños infectados con VIH-1 en un programa de interrupciones estructuradas del tratamiento (IET) en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con TARAA. X_n son los períodos de 4 semanas de interrupción del tratamiento. Los valores corresponden a la mediana y cuartiles 25 y 75.

6.1.3 Respuesta inmunológica. Se observaron incrementos importantes en las cifras de linfocitos T CD8+ durante los períodos de interrupción del tratamiento que coincidieron con los rebotes virológicos. Esta respuesta se acompañó de un descenso inicial en las cifras de linfocitos T CD4+, lo que condicionó una inversión en la relación linfocitos T CD4+/CD8+. Después del segundo período de interrupción, las cifras de linfocitos T CD4+ mostraron una tendencia al incremento hasta incluso superar las cifras de linfocitos T CD8+ (**Tabla 23** y **Figura 8**). De acuerdo a las cifras absolutas de linfocitos T CD4+, sólo un paciente cursó con inmunosupresión moderada (308-493 cells/ μ L) al final de los dos primeros

períodos de interrupción y ningún niño desarrollo inmunosupresión severa durante el seguimiento (**Tabla 23**). Por otro lado, de acuerdo a los porcentajes de linfocitos T CD4+ ocurrieron seis eventos de inmunosupresión moderada, cinco de ellos durante los rebotes virológicos, y aunque todos los niños presentaron declinaciones en los porcentajes de linfocitos T CD4+ durante el seguimiento, sólo ocurrió un evento de inmunosupresión severa (linfocitos CD4+ <15%). De esta manera, el nadir ocurrió usualmente durante los rebotes virológicos y fue de 18% para el paciente No. 1, de 25% para el paciente No. 2, de 14% y 16% para el paciente No. 3 y de 22% para el paciente No.4 (**Tabla 23**).

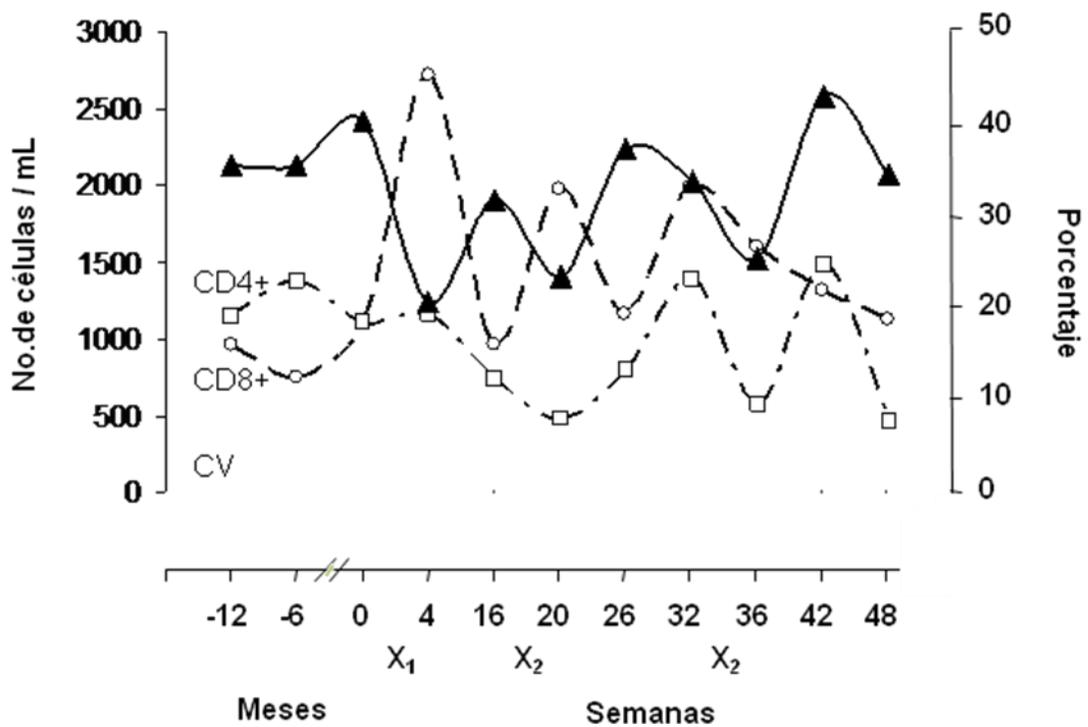


Figura 8. Porcentaje de linfocitos T CD4+ (triángulos llenos) y conteos absolutos de linfocitos T CD4+ (cuadros vacíos) y CD8+ (círculos vacíos) de cuatro niños infectos con VIH-1 en un programa de interrupciones estructuradas del tratamiento (IET) en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con TARAA. X_n son los períodos de 4 semanas de interrupción del tratamiento. Los valores corresponden a la mediana.

6.1.4 Respuesta clínica y adherencia al tratamiento. No ocurrió sintomatología relacionada a la infección por el VIH y tampoco se detectaron eventos adversos relacionados al TARAA. Al final del primer ciclo de interrupción, la paciente No. 1 cursó con un cuadro infeccioso de vías aéreas superiores con rinorrea, tos, hiperemia faríngea y adenomegalias cervicales. Este cuadro se consideró como probablemente viral, pero no se determinó la etiología. Dos pacientes más tuvieron cuadros agudos de infección de vías aéreas superiores de etiología no determinada, incluyendo la paciente cuyo rebote de la carga viral en la semana 48 de seguimiento coincidió con uno de tales cuadros (Paciente No. 1). No ocurrieron otros síntomas durante el seguimiento. La media de peso de los pacientes al inicio del primer período de interrupción fue de 27.1 Kg (límites 19.2-37.2) y a la semana 48 de seguimiento de 31.25 Kg (límites 24-40.1) ($p=0.068$). La mediana de estatura al inicio del primer período de interrupción fue de 129 cm (límites 113-146) y a la semana 48 de seguimiento de 132 cm (límites 121-154) ($p=0.66$). No se detectó ningún problema con la adherencia al tratamiento.

6.2 Fase 2: Determinación de mutaciones relacionadas con resistencia antirretroviral al final de los períodos de interrupción del tratamiento.

Para esta parte del estudio se evaluaron las muestras tomadas al final de los períodos de interrupción (rebotes virológicos) de los cuatro pacientes pediátricos con infección por VIH-1 incluidos. De cada paciente se obtuvieron 3 muestras de sangre al final de cada interrupción, teniendo un total de 12 muestras para analizar (**Tabla 24**).

Tabla 24

Muestras de los rebotes virológicos incluidas en la evaluación de mutaciones relacionadas con resistencia a antirretrovirales de cuatro niños incluidos en el programa de interrupciones estructuradas (IET) en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con TARAA. Las muestras fueron tomadas al final de cada período de interrupción de TARAA de cuatro semanas.

Rebote viral	Fecha de Toma	Registro	Copias RNA / mL
Paciente-01			
1	14-Jun-05	6338-CV	616 000
2	18-Oct-05	6930-CV	17 800
3	14-Mar-06	7642-CV	25 100
Paciente-02			
1	21-Jun-05	6366-CV	27 400
2	4-Nov-05	7009-CV	19 800
3	18-Abr-06	7820-CV	5 370
Paciente-03			
1	14-Jun-05	6347-CV	269 000
2	25-Oct-05	6965-CV	126 000
3	28-Feb-06	7547-CV	31 300
Paciente-04			
1	14-Jun-05	6343-CV	159 000
2	25-Oct-05	6964-CV	125 000
3	28-Feb-06	7548-CV	140 000

6.2.1 Amplificación de los genes de la proteasa y transcriptasa reversa

Después de obtener el ARN y de haber sintetizado el ADNc, se amplificaron por medio del PCR convencional los genes de la proteasa y transcriptasa en reversa (TR), ésta última por ser un fragmento de 1320 pb se amplificó en tres fragmentos. Para las muestras correspondientes a los tres períodos de interrupción (rebotes virológicos) del paciente No. 1 (Muestras 6338, 6930 y 7642) no fue posible amplificar ningún fragmento de la proteasa ni de la TR. Con respecto al paciente No. 2, solamente fue posible amplificar el fragmento 3' RT de la muestra correspondiente al tercer período de interrupción (3^{er} rebote viral) (**Figura 9**); sin embargo, para las muestras correspondientes a los dos primeros períodos de interrupción (rebotes virológicos 1 y 2) del mismo paciente (Muestras 6366 y 7820) no se logró amplificación alguna. Debido a

lo anterior, en esta parte del estudio se incluyeron las muestras de cinco rebotes virológicos de dos de los pacientes (No. 3 y 4) para evaluar el desarrollo de mutaciones relacionadas con resistencia a antirretrovirales durante el programa de interrupciones estructuradas de TARAA.

En cuanto a las características clínicas de estos dos pacientes (3 y 4), uno era del sexo femenino y el otro del masculino, con edades de 7 y 8 años, categorías clínico-inmunológicas B3 y A1, ambos infectados con VIH-1 por vía perinatal, y ambos recibiendo TARAA a base de ritonavir (RTV) + zidovudina (AZT) + lamivudina (3TC) a las dosis pediátricas recomendadas (**Tabla 22**) (Working Group on Antiretroviral Therapy, 2008; Palacios et al., 2002).

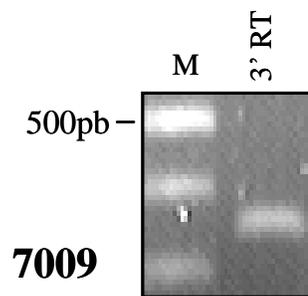


Figura 9. Amplificación del fragmento 3' del gen de la transcriptasa reversa (RT) de la muestra correspondiente al segundo rebote virológico del paciente No. 2 (Muestra 7009) en gel de agarosa al 1.3%, teñido con bromuro de etidio. Marcador (M) de 100 pb (*Promega*, Madison WI, EUA).

Del paciente No. 3 se amplificaron los genes de la proteasa y los tres fragmentos de la TR de las muestras de los tres períodos de interrupción (muestras 6347, 6965 y 7547) (**Figura 10**). Para lograr una banda visible en el gel de electroforesis fue necesario realizar reamplificación del producto de PCR de la proteasa de los tres períodos, así como de la región media de la TR de la muestra correspondiente al primer período de interrupción.

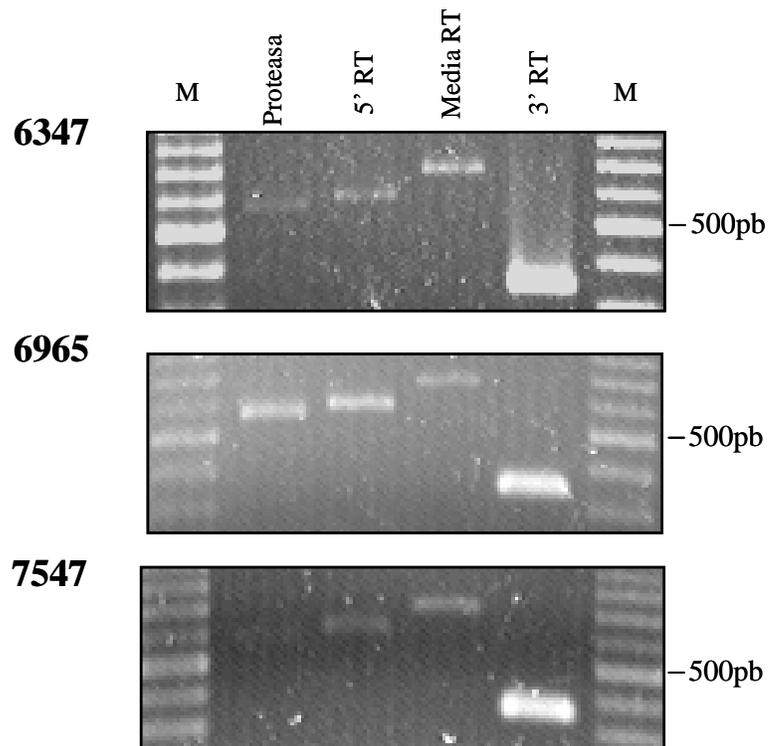


Figura 10. Amplificación de los genes de la proteasa y de la transcriptasa reversa (RT) de las muestras correspondientes a los tres períodos de interrupción de TARAA (rebotes virales) del paciente No. 3. Se observa la amplificación de la proteasa (566 pb), y los fragmentos de la RT 5' (592 pb), medio (631 pb) y 3' (345pb). Electroforesis en gel agarosa al 1.3 % y marcador (M) de peso molecular de 100 pb (*Promega*, Madison WI, EUA).

Del paciente No. 4 se amplificaron los genes de la proteasa y de la región media de la TR de la muestra correspondiente al primer período de interrupción (muestra 6343) empleando la estrategia de reamplificación de productos de PCR. Los fragmentos restantes fueron obtenidos mediante una sola reacción de PCR (muestras 6343, 6964 y 7548) (**Figura 11**).

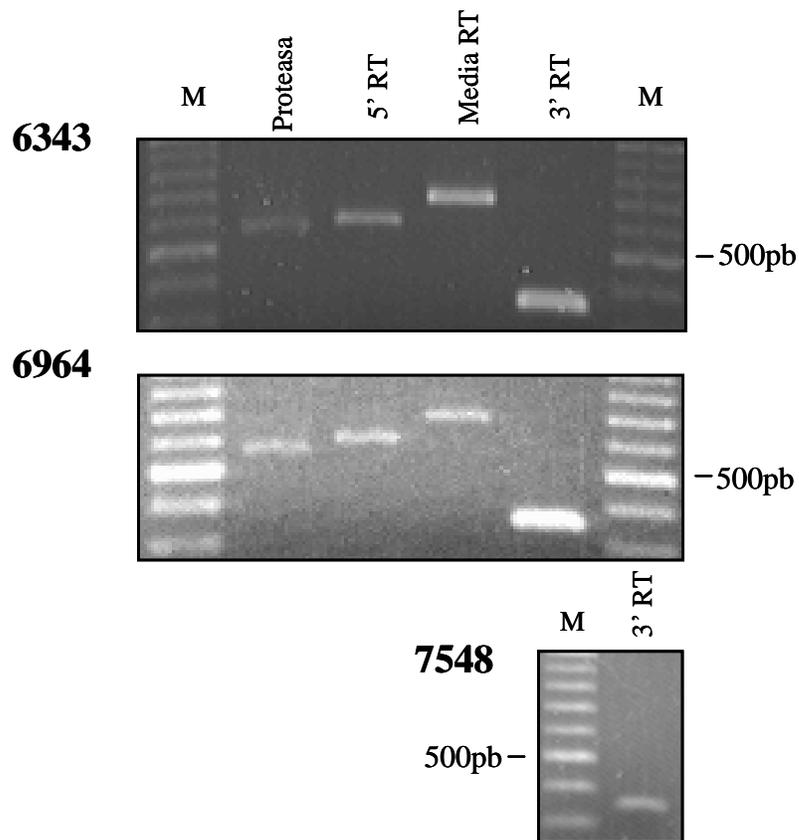


Figura 11. Amplificación de los genes de la proteasa y de la transcriptasa reversa (RT) de las muestras correspondientes a los tres períodos de interrupción de TARAA (rebotes virales) del paciente No. 4. Se observa la amplificación de la proteasa (566 pb) y de los fragmentos de la RT 5' (592 pb), medio (631 pb) y 3' (345pb). Electroforesis en gel agarosa al 1.3 % y marcador (M) de peso molecular de 100 pb (*Promega*, Madison WI, EUA).

6.2.2 Verificación por PCR en tiempo real de la calidad de las muestras de ADNc

Las muestras llevadas a reacción de tiempo real fueron la 6338, 6930 y 7642 del paciente No. 1, así como las muestras 6366, 7009 y 7820 del Paciente No. 2. La muestra 7009 del paciente No. 2 fue utilizada como control positivo ya que ésta fue la única muestra de estos dos pacientes de la que fue posible lograr una amplificación mediante PCR convencional. Solamente se obtuvo curva de amplificación por tiempo real de la muestra 7009 con un valor de C_T de 7.021 (**Figura 12**).

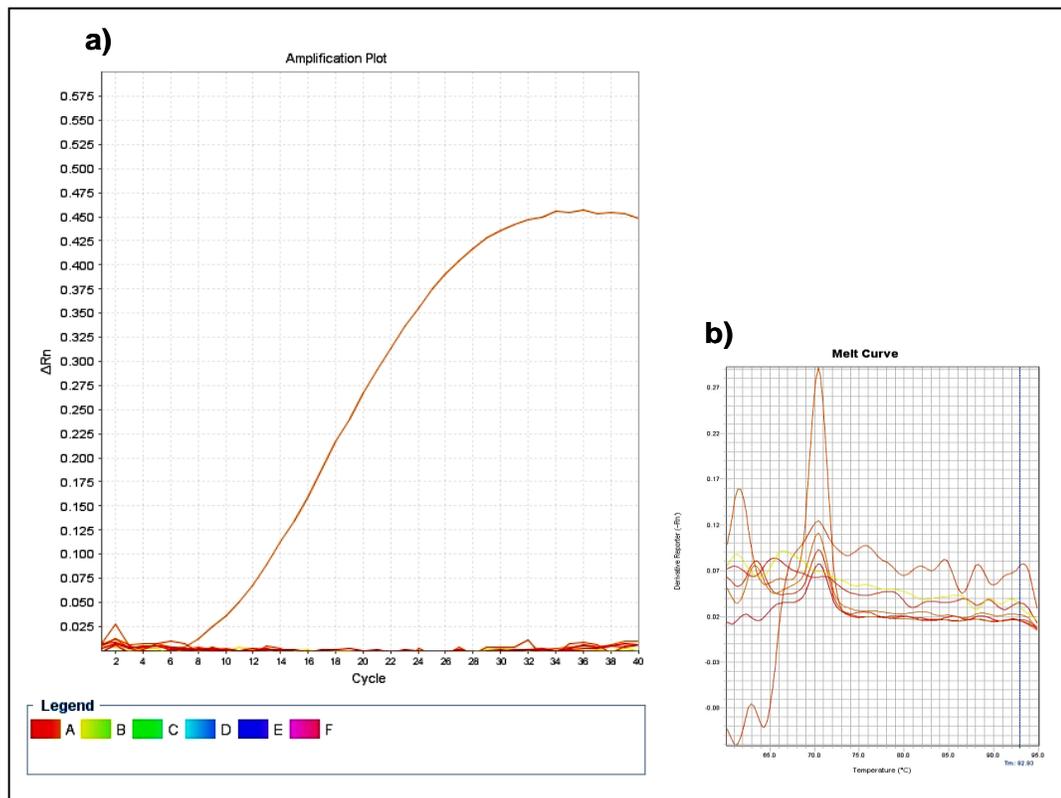


Figura 12. Validación por PCR en tiempo real de la calidad de las muestras de ADNc. a) Curva de amplificación mediante PCR en tiempo real de las muestras de los pacientes No. 1 y No. 2. La única amplificación que se puede observar corresponde a la región 3' de la RT de la muestra 7009. b) Curva de disociación; el pico único que se observa corresponde a la muestra 7009 del paciente No. 2. La reacción fue realizada empleando la tecnología *SYBR Green* en el termociclador *StepOne Real Time PCR* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA).

6.2.3 Análisis de secuencias de la proteasa y la transcriptasa reversa (TR)

Sólo se realizó la secuenciación de las amplificaciones visibles en el gel de electroforesis (**Figura 13**). Se obtuvieron las secuencias completas de la proteasa de las muestras 6347, 6965 y 7547 del paciente No. 3, así como de las muestras 6343 y 6964 del paciente No. 4 (**Figura 14**). Para la región de la TR se obtuvieron secuencias incompletas en alguno de los tres fragmentos (**Figura 15**). Todas las secuencias obtenidas de cada muestra fueron comparadas con la HXB2 de referencia empleando un alineamiento múltiple con el programa computacional *ClustalW*.

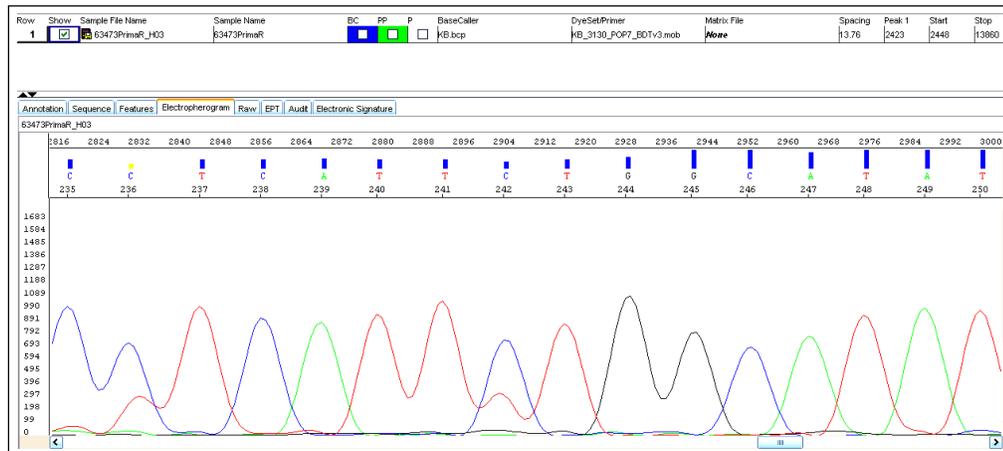


Figura 13. Electroferograma obtenido de una de las reacciones de secuenciación. El análisis de secuencias fue realizando empleando el *Sequencing Analysis v5.2* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

>Muestra 6347, Paciente No. 3
 CCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAGGAGACAACCTCCCTCTCAGAAACAGGAGCCAATAGACAGGGACAAGGAG
 ATGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTAGCAACGACCCCTTGTCAACAATAAAGATAGGGGGGCAACTAAAGGA
 AGCTTTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAATTTGCCAGGAAAATGGAAAGCCAAAAATGATA
 GGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAAATACCCATAGAAATCTGTGGACACAGAGCCATAGGTA
 CAGTGTTAATAGGACCTACACCTGTCAACATCATTGGAAGAAATTTGTTGACTCAACTTGGTTGCACCTTAAATTTCCC
 CATTAGTCCATTGAAACTGTACCAGTAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACA
 GAAGAAAAATAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGAAAAATTTCAAAAATAGGGCCTGAAA
 ATCCATACAATACTCC

>Muestra 6965, Paciente No. 3
 CCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAGGAGACAACCTCCCTCTCAGAAACAGGAGCTAACAGACAGGGACAAGGAG
 ATGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTCAACAATAAAGATAGGGGGGCAACTAAAGGA
 AGCTTTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAATTTGCCAGGAAAATGGAAAGCCAAAAATGATA
 GGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAAATACCCATAGAAATCTGTGGACACAGAGCCATAGGTA
 CAGTGTTAATAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATTTGTTGACTCAACTTGGTTGCACCTTAAATTTCCC
 TATTAGTCCATTGAAACTGTACCAGTAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTTAAACAATGGCCATTGACA
 GAAGAAAAATAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGAAAAATTTCAAAAATAGGGCCTGAAA
 ATCCATACAATA???

>Muestra 7547, Paciente No. 3
 CTTACAGGTTtGGGGAGGAGACAACCTCCCTCTCAGAAACAGGAGCCAAtAGaCagGgCaAGGgAgAAgtATCCTTTAGCC
 TCCTTCAGATCACTCTTtGGAACGACCCCTtGTCaCAATAAAGATAGGGGGGCAACTAAAGGAAGCTTTATTAGATACA
 GGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAAtgAATTTGCCAGGAAAATGGAAAGCCAAAAATGAtAGGGGGAAATTGGAGGTT
 TTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAAATACCCATAGAAAATCTGTGGACACAGAGCCATAGGTACAGTGTAAATAGGACC
 TACGCCCTGTCAACATAATTGGAAGAAATTTGTTGACTcTtCtTtgCTGCACCTTAAATTTCCCCATTAGTCCATTGAA
 ACTGTACCAGTAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCaAAAGTTAAACAATGGCCATTGaCAGAAGAAAAATAAAG
 CATTAGtAGAAATTTGtAcAGAGATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATAGGGCCTGaAAATCCATACAATaCTcC

>Muestra 6343, Paciente No. 4
 CAACTCCcTCTCAGAAACAGGAGGCAATgGACAAGGAaCGGCcTCCTTTGgCTTCCCTCAgATCACTCTTTGgCAACGA
 CCCCTcGTCACAATAAAGgTgGGGGGCAgCTgAAGGAAGCTtTATTAGATACAGGgGCAGATGATACAGTATTAGAAG
 AAATGAATTTGCCAGGAAaATGGAAAGCCAAAAATGATAGGGGAAATTGGAGGTTTATCAAaGtaAGACAGTATGATCA
 ggTAtCCATAGAAATCTGTGGACATAAAGCcATAGGTgCAGTATTaATAGGACCTACACCTGTCaacATAAtTGGAAAG
 AATtTGTTGACTCAgaTTGGTTGCACCTTAAATTTtCCCATTAcTCCTATTGAAACTGTACCAGtAAAATTAaAGCTAg
 AAATTTGTaCAGAGATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATtGGGCCTGAAAATCCAACAATACTCC

>Muestra 6964, Paciente No. 4
 CCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAGGAGACAACCTCCCTCTCAGAAACAGGAaCCAATAGACaAGGAgATGTAT
 CCTTTgGCTTCCCTCAAATCACTCTTTgGcAACGAcCcTGTGTCACAATAAAGATAGGGGGGAGCTAAAGGAAGCTTT
 ATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATgAATTTGCCAGGAAGATGGAAgCCAAAAATGATAGGGGGA
 ATTGGAGGTTTATCAAAGtGgAGACAGTATGATCAAATACCCATAGAAATCTGTGGACATAAAGCCATAGGTACAGTAT
 TAATAGGACCTAcCCTGTCAACATAATTGGAAGAAATTTGTTGACTCAACTTGGTTGCACCTTAAATTTcCCCATTAG
 TCCTATTGAAACTGTACCagTAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCaTTGACAGAAGAA
 AAAATAAAGCATTaCTAGACATTTgTACAGAGATGGAAAAGGAaGGaAAAAATTTcaaaAAttGGCCTGAgAATCCAT
 ACAATACTCC

Figura 14. Secuencias obtenidas del gen de la proteasa a partir de las muestras de los pacientes No. 3 y No. 4.

>Muestra 6347, Paciente No. 3
 CCCATTAGTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAA
 AATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGAAAAATTTCAAAAATAGGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAG
 TATTTGCTATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAATAGTAGATTTTCAGAGAATTAATAAGAGAATCAAGACTTCTGGGAA
 GTTCAATTAGGAATACCACATCCAGCAGGGTTGAAAAAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCC
 CTTAGATCCAGACTTCAGAAAATGTAAGTGCATTCACCATACCTAGTATAAAACAATGAGACACCCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGC
 TTCCACAGGGATGAAAAGGATCACCAGCAATATCCAAAGCAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTCAGAAAACAAAATCCAGAAAA
 GTTATCTATCAATACATGGATGATTTATGTAGGATCTGACTTA...GCAAGGCCAATGGACATATCAAAATTTATCAAGGCCAAT
 TAAAAATCTGAAAACAGGAAAAATATGCCAGAATGAGGGGTGCCACACCAATGATGTAAGACAACCTAACAGAGGCAGTCAAAAAATAA
 CCACAGAGAGCATAGTAATATGGGGAAGACTCCTAAATTTAAATACCCATACAAAAAGAAAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTAT
 TGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAATTTATGGTACCAGTTAGAGAAAAGAACCCATAGA
 AGGAGCAGAAAACCTTCTATGTAGATGGG

>Muestra 6965, Paciente No 3
 CCCTATTAGTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAA
 AATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGAAAAATTTCAAAAATAGGGCCTGAAAATCCATACAATA...
 GGTGAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATCCAGACTTACAGGAATGATCT
 GCATTCACCATACCTAGTATAAAACAATGAGACACCCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGAAAAGGATCACCAGC
 AATATTTCAAAGCAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTCAGAAAACAAAATCCAGAAATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTAT
 ATGTAGGGTCTGACTTAGAGATAGGGCAGCATAGACAAAAAATAGAGGAATGAGACAACCTCTGTAGAGTGGGATTTACACACCA
 GAAAAAGCATCAGAAAGAGCCTCCATTTCCCTTTGGATGGGCTATGACTCCATCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGTGCC
 AGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATAGTGGGAAAAATTTAAATTTGGGCAAGTCAAGTTTACCAGGGGATTAAGTAA
 GGCAATTTGTAAACTCCTTAGGGGAACCAAGCACTAACAGAAATTAATATCTCTAAACAAGAAAGCAGAGTTAGAATTTAGAACTGGCAGAAA
 AGGAAATTTCAAAAAGAACAGTACATGGAGTGTACTATGACCCATCGAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCA
 ATGGACATATCAAAATTTATCAAGAGCCATATAAAAAATCTGAAAACAGGAAAAATGCCAGAATGAGGGGTGCCACACCAATGATGTA
 GCAACTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAACACAGAGAGCATAGTAAATATGGGGAAGACTCCTAAATTTAAATACCCATACCCATACAAAA
 GAAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGATTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAATTT
 ATGGTACCAGTTAGAAAAAGAACCCATAGAAGGAGCAGAAAACCTTCTATGTAGATGGG

>Muestra 7547, Paciente No. 3
 CCCATTAGTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAA
 AATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGAAAAATTTCAAAAATAGGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAG
 TATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAATAGTAGATTTTCAGAGAATTAATAAGAGAATCAAGACTTCTGGGAA
 GTTCAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGGTTAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCC
 CTTAGATCCAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTCACCATACCTAGTATAAAACAATGAGACACCCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGC
 TTCCACAGGGATGAAAAGGATCACCAGCAATATCCAAAGCAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTCAGAAAACAAAATCCAGAAAA
 GTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGG...CAAGGCCAATGGACATATCAAAATTTATCA
 AGGCCATATAAAAAATCTGAAAACAGGAAAAATATGCCAAAATGAGGGGTGCCACACCAATGATGTAAGACAACCTAACAGAGGCAGTGC
 AAAAAATAACACAGAGAGCATAGTAAATATGGGGAAGACTCCTAAATTTAAATACCCATACAAAAAGAAAACATGGGAAACATGGTGG
 ACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAATTTATGGTACCAGTTAGAGAAAAG
 ACCATAGAAAGGAGCAGAAAACCTTCTATGTAGATGGGGCAGCTAACAG

>Muestra 6343, Paciente No. 4
 CCCATTACTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGC...TAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGAAAAATTTCAAAA
 ATTGGCCCTGAAAATCCAAACATACTCCAGTCTTTGCCATAAAGAAAAAGGACAGTACTAAATGGAGAAAATAGTAGATTTTCAGAGA
 ACTTAATAAGAAAACCTAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGAAATACCACATCCCGCAGGGTTGAAAACAGGAAAAATCAGTAAACAGTAC
 TGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATCCAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTCACCATACCTAGTATAAAACAATGAG
 ACACAGGGATAGATATCAGTACATGTGCTCCACAGGGATGAAAAGGATCACCAGCAATATTTCCAAAGCAGCATGACAAAAATCTT
 AGAGCCTTTTCAGAAAACAAAATCCAGAAATAGTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGGTCTGACTTAGAAATTTAGGGAAC
 ATAGAGCAAAAAATAAGGAACCTGAGACAACATCTGTTGAAATGGGGATTTACCACACCCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCCCATTT
 CTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGTGCCAGAAAAAGACAGCTGCCACTGTCAATGACAT
 ACAGAAATTTAGTGGGAAAAATTAATTTGGCAAGTCAAGTTTACCAGGGATTAAGTAAGGCAATTTATGCAACTTCTTAGGGGAGCCA
 AAGCACTAACAGAGGTAATATCTCTATCAAAAAGAGCAGAGTGAACATGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACAGTACATGGA
 GTGTACTATGACCCATCGAAAAGACTTTAATAGCAGAAATACCGAAGCCGTGGCAAGGCCAATGGACATATCAAAATTTATCAAGAGCCATT
 TAAAAATCTGAAAACAGGAAAAATATGCCAGAATGAGGGGTGCTCACATTAATGATGTAAAAACAACCTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAG
 CCACAGAAAGCATAGTAAATATGGGGAAGACTCCTAAATTTAAATACCCATACAAAAAGAAAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTAT
 TGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAATTTATGGTACCAGTTAGAGAAAAGAACCCATAGC
 AGGAGCAGAAAACCTTCTATGTAGATGGG

>Muestra 6964, Paciente No. 4
 CCCTATTAGTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAA
 AATAAAAGCATTACTAGACATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGAAAAATTTCAAAAATAGGGCCTGAGAAATCCATACAATACTCCAG
 TATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAATAGTAGATTTTCAGAGAATTAATAAGAAAATCAAGACTTCTGGGAA
 GTTCAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGGTTGAAACAGAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCC
 CTTAGATCCAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTCACCATACCTAGTATAAAACAATGAGACACCCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGC
 TTCCACAGGGATGAAAAGGATCACCAGCAATATCCAAAGCAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTCAGAAAACAAAATCCAGAAAA
 GTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGGTCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAGCAAAAAATAGAGGAACCTGAGACAACA
 TCTGTTGAGATGGGGATTTACCACCCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCCCATCTCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCTGATA
 AATGGACAGTACAGCCTATAGTGTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGCAATGACATACAGAAGTTAGTGGGAAAAATTAATTTGGGCA
 AGTCAAGATTTACCAGGGATTAAGTAAGGCAATTTATGAACTCCTTAGGGGAACCAAGCACTAACAGAGGTAATATCTCTAAACAAA
 AGAAGCAGAGCTAGAATGGCAGAAAACAGGAAAAATTTAAAAGAACAGTACATGGGGTGTACTATGACCCATCGAAAGACTTAAATAG
 CAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAAATATGCCAGA
 ATGAGGGGTGCCACACTAATGATGTAAGACAACCTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAACACAGAAAAGCATAGTAAATATGGGGAAGAC
 TCCATAATTTAAACTACCCATACAAAAAGAAAACATGGGAAACGTTGGTGGACAGAGTATGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGT
 TTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAATTTATGGTACCAGTTAGAGAAAAGAACCCATAGCAGGAGCAGAAAACCTTCTATGTAGATGGG

Figura 15. Secuencias obtenidas del gen de la transcriptasa reversa a partir de las muestras de los pacientes No. 3 y No. 4. Los puntos indican ausencia de bases en la secuencia.

6.2.4 Determinación del subtipo viral

Todas las secuencias correspondieron al Subtipo B, con una similaridad de alrededor del 99% y fueron ubicadas dentro del gen *gag* y *pol* del genoma del VIH-1 (Figura 16).

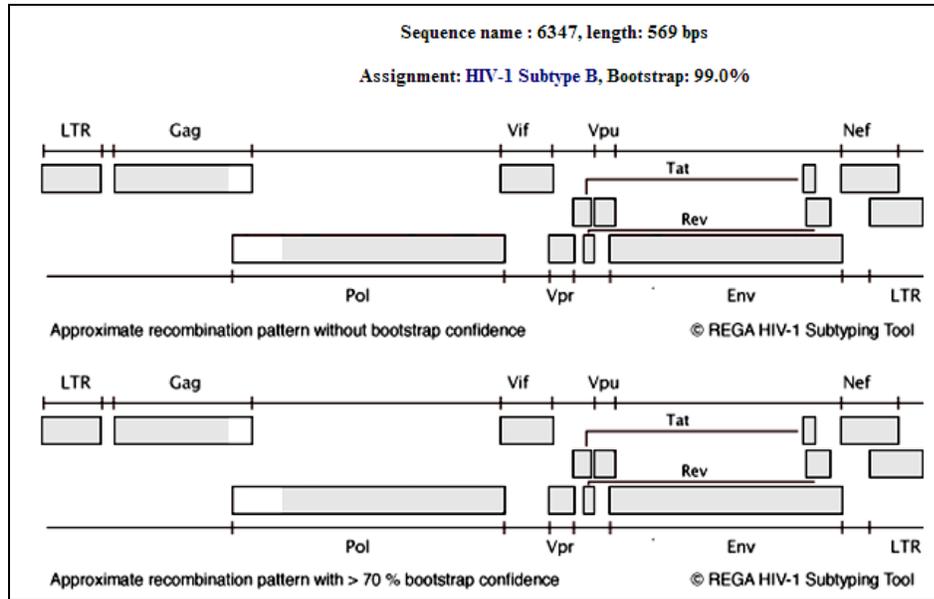


Figura 16. Asignación de subtipo viral empleando la herramienta *REGA HIV-1 Subtyping Tool*. Se muestra el dato de salida para la muestra 6347 correspondiente al primer rebote viral del paciente No. 3.

6.2.5 Interpretación genotípica de susceptibilidad a inhibidores de la proteasa

De todas las secuencias obtenidas fue posible completar los 99 codones que conforman la secuencia completa de la proteasa. No se observaron mutaciones mayores o menores y los reportes indicaron susceptibilidad a todos los inhibidores de la proteasa disponibles actualmente en el mercado (Tablas 25 y 26).

Tabla 25

Interpretación genotípica de resistencia a Inhibidores de la Proteasa (IP) en las muestras correspondientes a los tres rebotes virológicos del paciente No. 3. *HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Universidad de Stanford.*

Muestra	Codones incluidos	Resistencia mayor a IP	Resistencia menor a IP	Otras mutaciones	Comentarios
6347	1-99 (99)	Ninguna	Ninguna	W6*, R41K, L63P, K70R, V77I, I93L	<ul style="list-style-type: none"> - L63P: Polimorfismo común en pacientes que reciben IP. - V77I: Polimorfismo común asociado a terapia con NFV. - I93L: Polimorfismo común; residuo consenso en muchos subtipos. En el subtipo B está asociado al tratamiento con IP.
6965	1-99 (99)	Ninguna	Ninguna	R41K, L63P, K70R, V77I, I93L	
7547	1-99 (99)	Ninguna	Ninguna	Q7X, R41K, L63P, K70R, V77I, Q92L, I93L	

Tabla 26

Interpretación genotípica de resistencia a Inhibidores de la Proteasa (IP) en las muestras correspondientes a los dos primeros rebotes virológicos del paciente No. 4. *HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Universidad de Stanford.*

Muestra	Codones incluidos	Resistencia mayor a IP	Resistencia menor a IP	Otras mutaciones	Comentarios
6343	1-99 (99)	Ninguna	Ninguna	I15V R41K I62V L63S T74A V77I	- I62V es una mutación altamente polimórfica común en pacientes tratados con IP. - V77I es un polimorfismo común asociado a terapia con NFV.
6964	1-99 (99)	Ninguna	Ninguna	L63P V77I I93L	- L63P es un polimorfismo común en pacientes que reciben IP. - I93L es un polimorfismo común; es un residuo consenso en muchos subtipos. En el subtipo B esta asociado al tratamiento con IP.

6.2.6 Interpretación genotípica de susceptibilidad a inhibidores de la transcriptasa reversa (TR)

Se observó una mutación posiblemente asociada a resistencia a ITRNN en las dos secuencias del paciente No. 4. Sin embargo, el reporte no indicó ninguna resistencia a los inhibidores de la TR para las secuencias analizadas (**Tablas 27 y 28**). El análisis de las mutaciones en la TR se realizó sólo en los codones de las secuencias de la TR que fueron obtenidos.

Tabla 27

Interpretación genotípica de resistencia a Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Nucleósidos (ITRAN) y no nucleósidos (ITRNN) en las muestras correspondientes a los tres rebotes virológicos del paciente No. 3. *HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Universidad de Stanford.*

Muestra	Codones Incluidos	Resistencia a ITRAN	Resistencia a ITRNN	Otras Mutaciones	Comentarios
6347	1-193 (560)	Ninguna	Ninguna	K122P, D177E	
6965	100-444 (560)	Ninguna	Ninguna	K122P, D177E, A272P, K277R, P294S, E297K, F346Y, K366R, A376T, A400T, V435E	
7547	1-196 (560)	Ninguna	Ninguna	K122P, D177E	

Tabla 28

Interpretación genotípica de resistencia a Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Nucleósidos (ITRAN) y no nucleósidos (ITRNN) en las muestras correspondientes a los tres rebotes virológicos del paciente No. 4. *HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm, Universidad de Stanford.*

Muestra	Codones Incluidos	Resistencia a ITRAN	Resistencia a ITRNN	Otras Mutaciones	Comentarios
6343	36-444 (560)	Ninguna	K103R	Y56N, R83K, K102Q, K122P, D177E, T200A, E203K, R211K, A272P, K277R, T286A, P294S, T296S, E297K, Q330P, Q332P, G333W, A400T, V435A	K103R se produce alrededor del 1-2% de los pacientes no tratados y por sí sola no tiene ningún efecto sobre la susceptibilidad a ITRNN. Sin embargo, la combinación de K103R + V179D, reduce alrededor de 15 veces la susceptibilidad a NVP, DLV y EFV.
6964	1-444 (560)	Ninguna	K103R	V35L, E36D, R83K, K102Q, K122P, D177E, T200A, A272P, K277R, P294S, E297K, K366R, A376T, A400T, V435A	K103R se produce alrededor del 1-2% de los pacientes no tratados y por sí sola no tiene ningún efecto sobre la susceptibilidad a ITRNN. Sin embargo, la combinación de K103R + V179D, reduce alrededor de 15 veces la susceptibilidad a NVP, DLV y EFV.

NVP: Nevirapina; DLV: Delavirdina; EFV: Efavirens.

6.3 Fase 3: Desarrollo de respuesta inmune específica contra VIH medida por la síntesis inducida de IFN- γ

Para esta parte del estudio se siguieron virológica, inmunológica y clínicamente a diez niños hasta que contaran con CV indetectable y estuvieran sin inmunosupresión y asintomáticos para VIH durante por lo menos 12 meses. De estos niños, se incluyeron seis para evaluar la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) inducida por VIH.

6.3.1 Características generales de los pacientes incluidos en esta etapa

Estos seis niños se incluyeron en el estudio entre Noviembre de 2009 y Marzo de 2010, cuatro fueron del sexo masculino y dos del femenino, con una edad de 14.4 años (mediana, límites de 6.5 – 15.7 años). Los seis niños adquirieron la infección por VIH por vía perinatal. Las categorías clínico-inmunológicas de estos niños fueron: A2 (n=1), A3 (n = 2), B2 (n = 1), y B3 (n = 2). Los seis niños estaban en tratamiento antirretroviral basado en un IP (lopinavir reforzado con dosis bajas de ritonavir [LPV/r] ó ritonavir a dosis completas [RTV]) más dos ITRAN (zidovudina [(AZT) + lamivudina [3TC]) a las dosis pediátricas recomendadas (**Tabla 29**) (Working Group on Antiretroviral Therapy, 2008; Palacios et al., 2002).

Tabla 29

Características basales de seis niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento para evaluar la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica inducida por un lisado de VIH-1.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6
Edad (años)	15.7	13.9	6.5	15	12	15
Sexo	Masculino	Femenino	Masculino	Masculino	Masculino	Femenino
Tratamiento AR previo (meses)	–	–	–	–	AZT+3TC+RTV (24)	3TC+d4T+IDV (60)
Esquema TARAA ^a (meses)	AZT+3TC+RTV (68)	AZT+3TC+RTV (88)	AZT+3TC+RTV (68)	AZT+3TC+LPV/r (38)	AZT+3TC+LPV/r (24)	Combivir+RTV (54)
Carga viral	<400 copias/mL (<2.6 log ₁₀ /mL)					
Categoría Clínico-inmunológica ^b	A3	B3	B3	B2	A3	A2

^aAl ingreso al programa de IET.

^bDe acuerdo a la clasificación del CDC de 1994.

AR: Antirretroviral; AZT: Zidovudina; 3TC: Lamivudina; RTV: Ritonavir; LPV/r: Lopinavir reforzado con dosis bajas de RTV.

6.3.2 Seguimiento virológico y de la respuesta inmune proliferativa de los pacientes

Dos de estos niños completaron el seguimiento sólo hasta el primer ciclo de interrupción/reinicio de TARAA. El paciente No. 1 fue eliminado en la semana 16 de seguimiento porque presentó descenso en los porcentajes de linfocitos T CD4+ a niveles de inmunosupresión severa (8.1%). Además, este porcentaje continuó en esos niveles incluso a las 12 semanas del reinicio del tratamiento. Aún así, este paciente se siguió de manera paralela a los otros pacientes aún cuando ya no participó en los ciclos de interrupción/reinicio de TARAA. El paciente 6 fue eliminado del estudio por problemas de adherencia al tratamiento y por solicitud propia del paciente, por lo que de este paciente sólo se cuenta con los datos basales y los correspondientes al primer rebote virológico. Las cifras de CV y linfocitos T CD4+ y CD8+ durante el programa de IET se muestran en la **Tabla 30**.

Tabla 30

Carga viral^a y linfocitos T CD4+/CD8+^b de seis niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento para medir la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica inducida por VIH.

	Tiempo de seguimiento												
	Meses			↓	↓ Semanas				↓				
	-12	-6	0		4	10	16	20		26	32	36	42
	TARAA			IET ^c	TARAA		IET	TARAA		IET	TARAA		
Paciente 1:													
CV	<400	<400	<50	80700	<50	<50	<50	<50	62.4	47.9			
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	4.91	<2.6	<2.6	<2.6	<2.6	62.4	47.9			
CD4+ %	10%	11%	25%	8.1%	6.4%	12.2%	10.6%	10.6%	12.6%	10.6%			
CD4+ (No.)	174	249	610	226	151	335	221	353	532	273			
CD8+ (No.)	1377	NR	1694	1575	1068	1565	1247	1927	1569	1265			
Paciente 2:													
CV	<400	<400	<50	9730	<50	<50	<50	135	<50	2660			
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	3.99	<2.6	<2.6	<2.6	2.13	<2.6	3.43			
CD4+ %	51%	56%	53%	43%	35.3%	46.6%	20.3%	30.4%	25.6%	22.5%			
CD4+ (No.)	1157	1241	1255	412	719	749	361	895	807	465			
CD8+ (No.)	1368	1778	1561	997	987	1586	840	1161	1419	819			
Paciente 3:													
CV	<400	<400	<50	81100	728	187000	1320						
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	4.91	2.86	5.27	3.12						
CD4+ %	23%	44%	22%	17.08%	27.8%	NR	25.8%						
CD4+ (No.)	1522	1209	727	818	798	NR	640						
CD8+ (No.)	4427	1277	1062	2010	1049	NR	851						
Paciente 4:													
CV	<400	<400	119	NR	723	88800							
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	2.08	NR	2.86	4.95							
CD4+ %	61%	NR	35%	4.86%	33.8%	14.3%							
CD4+ (No.)	1022	923	560	147	723	345							
CD8+ (No.)	611	616	523	2055	600	1566							
Paciente 5:													
CV	<400	<400	256	484	5010	627							
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	2.41	2.68	3.70	2.80							
CD4+ %	33%	30%	17%	19.7%	17.6%	21%							
CD4+ (No.)	858	747	479	422	345	530							
CD8+ (No.)	1621	1612	1369	1078	953	1305							
Paciente 6:													
CV	<400	<400	<400	985									
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	2.99									
CD4+ %	45%	48%	17%	23.6%									
CD4+ (No.)	1987	1357	449	849									
CD8+ (No.)	2225	1338	955	1650									

TARAA: Terapia Antirretroviral Altamente Activa; IET: Interrupción Estructurada del Tratamiento; CV: Carga viral; ND: No determinado.

^aMedida por el número de copias de RNA viral /mL y el log₁₀ de dicho número.

^bMedidos por el porcentaje de células CD4+ y el número absoluto de células CD4+ and CD8+/ μ L.

^cLas mediciones correspondientes a las IET fueron realizadas al final de cada período de 4 semanas sin tratamiento. Las flechas corresponden al inicio de cada período de interrupción de TARAA.

Las celdillas sombreadas corresponden al seguimiento del paciente una vez eliminado del programa de IET.

6.3.3 Síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica expuestas a VIH

La síntesis de IFN- γ se mantuvo estable durante el primer período de interrupción de TARAA (12.95 pg/mL mediana basal [límites: 12.63-13.71] contra 13.17 [12.46-13.54] a las 4 semanas sin TARAA), incluso llegaron a descender ligeramente después del reinicio del tratamiento en la semana 10 de seguimiento (12.15 pg/mL [11.33-20.73]); sin embargo, posteriormente se observó un incremento en la síntesis de IFN- γ hasta la semana 16 (14.4 pg/mL [10.63-20.39]), para luego volver a descender durante el segundo período de interrupción del tratamiento, incluso por debajo los valores basales (13.78 y 9.59 pg/mL en las semanas 20 y 26 del seguimiento, respectivamente) ($p=0.145$). Después de las seis semanas del segundo rebote virológico, se observó un incremento en los niveles de IFN- γ por encima del pico anterior (17.7 y 16.3 pg/mL en las semanas 32 y 36 del seguimiento, respectivamente) (**Tabla 31 y Figura 17**).

Tabla 31

Niveles de IFN- γ (pg/mL) en el sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica expuestas a un lisado de VIH 1. Las células fueron obtenidas de seis niños infectados con VIH-1 incluidos en un programa de interrupciones estructuradas (IET) de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con tratamiento.

	Tiempo de seguimiento									
	↓		↓ Semanas				↓			
	0	4	10	16	20	26	32	36	42	48
	Basal	IET ^c	TARAA	IET	TARAA	IET	TARAA	IET	TARAA	
Paciente 1 VRJF	–	13.10	11.41	20.39	12.15	–	151.60	10.38	10.37	–
Paciente 2 VRVM	–	13.57	12.15	16.07	13.78	–	17.70	16.31	12.12	–
Paciente 3 TMSI	12.63	13.17	11.33	10.63	□	–	–	–	–	–
Paciente 4 TABI	12.81	13.51	20.73	□	□	9.59	–	–	–	–
Paciente 5 MLBO	13.10	□	15.87	12.73	□	–	–	–	–	–
Paciente 6 VCVC	13.71	11.82	□	□	□	–	–	–	–	–

TARAA: Terapia Antirretroviral Altamente Activa; IET: Interrupción Estructurada del Tratamiento.

^cLas mediciones correspondientes a las IET fueron realizadas al final de cada período de 4 semanas sin tratamiento. Las flechas corresponden al inicio de cada período de interrupción.

Las celdillas sombreadas corresponden al seguimiento del paciente una vez eliminado del programa de IET.

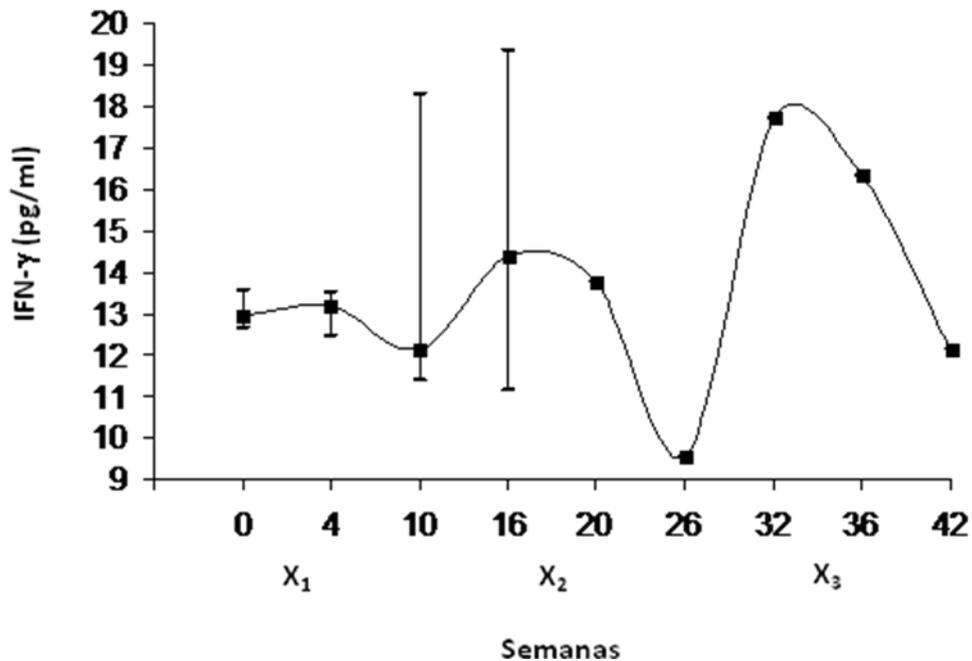


Figura 17. Síntesis de Interferón-gamma (IFN- γ) por células mononucleares de sangre periférica expuestas a VIH-1 de seis niños infectados con VIH-1 sometidos a un programa de interrupciones estructuradas (IET) en ciclos de 4 semanas con / 12 semanas sin TARAA. X_# son los períodos de IET de 4 semanas. Los valores corresponden a la mediana y cuartiles 25 y 75.

Al comparar la síntesis de IFN- γ con la respuesta virológica, los niveles de esta citocina se mantuvieron estables a pesar del incremento en la CV durante el primer período de interrupción de TARAA (rebote virológico), pero al comparar estos niveles con las cifras de linfocitos T CD4+, los cuales disminuyeron durante el rebote virológico como ocurrió en el primer grupo de pacientes, el inicio en el incremento en los niveles de IFN- γ a las seis semanas del reinicio de TARAA coincidió con el incremento en las cifras de estas células. Lo mismo ocurrió a las seis semanas después del segundo período de interrupción de TARAA, pero en este caso el incremento de los niveles de IFN- γ y células T CD4+ fue superior al observado después del primer rebote virológico. Los picos en los niveles de IFN- γ coincidieron con los picos en los conteos de células T CD8+ (**Figura 18**).

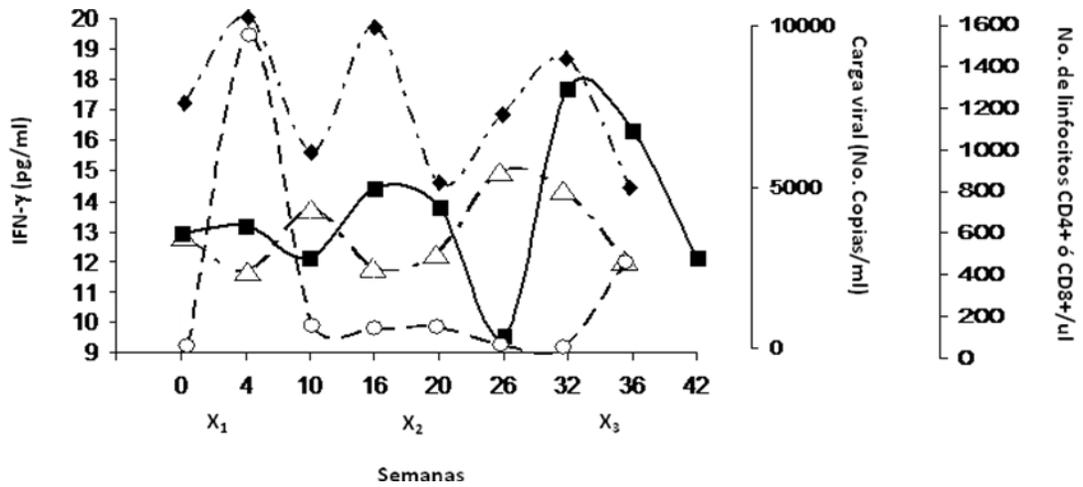


Figura 18. Síntesis de Interferón-gamma (IFN- γ) por células mononucleares de sangre periférica expuestas a VIH-1 (cuadros llenos), carga viral (círculos vacíos) y cifras absolutas de linfocitos T CD8+ (rombos llenos) y T CD4+ (triángulos vacíos) en seis niños infectados con VIH-1 en un programa de interrupciones estructuradas (IET) en ciclos de 4 semanas con / 12 semanas sin TARAA. X_# son los períodos de IET de 4 semanas. Los valores corresponden a la mediana.

7. DISCUSIÓN

7.1 Discusión (Fase 1).

Aunque el TARAA ha aumentado la sobrevida de los pacientes infectados con el VIH, su alto costo, la toxicidad condicionada por su uso crónico y las fallas en la adherencia que se acumulan al pasar el tiempo son limitantes importantes de su eficacia a largo plazo (Deeks et al., 2001; Palacios et al., 2002; Sánchez.Granados et al., 2003; Plebani et al., 2004; Solórzano-Santos et al., 2006; Working Group on Antiretroviral Therapy, 2008;). Las interrupciones estructuradas del tratamiento (IET) pueden reducir el impacto de estas tres limitantes del TARAA; sin embargo, puesto que deben ser cuidadosamente planeadas y realizadas bajo seguimiento clínico, inmunológico y virológico estrecho, su uso debe reservarse a estudios de investigación (Lori et al., 2000; Lori et al., 2001; Miller et al., 2000; Giard et al., 2005; Gibb et al., 2004; Julg and Goebel, 2006; Marchou et al., 2007; Borkowsky et al., 2008a,b). No obstante, se ha sugerido que las IET podrían facilitar el tratamiento a largo plazo, ya que pueden resultar en un incremento de la tolerancia individual a los esquemas terapéuticos al disminuir la toxicidad asociada al uso crónico de los antirretrovirales, reducir la carga del tratamiento, reducir los costos del mismo, mejorar la adherencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes sin poner en riesgo la eficacia del tratamiento (Lori et al., 2000; Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Opravil et al., 2004). A pesar de que en los últimos años se ha publicado abundante información sobre las IET de TARAA, la mayoría de esta información se limita a pacientes adultos y es aún controversial (Lori et al., 2000; Deeks et al., 2001; Ortiz et al., 2001; Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Gibb et al., 2004; Bongiovanni et al., 2006; Julg and Goebel, 2006; Pai et al., 2005; Arnedo-Valero et al., 2005). Así, aunque el estudio SMART mostró que la terapia antirretroviral “episódica” guiada por las cifras de linfocitos T CD4+ en pacientes adultos incrementa el riesgo de enfermedades oportunistas y muerte debido a la caída de los conteos de CD4+ y al incremento en la CV, diversos aspectos relacionadas con las IET siguen sin resolverse, como es el hecho de si las IET pueden ser apropiadas en circunstancias diferentes a las usadas en el estudio SMART (Julg and Goebel, 2006; The Strategies for

Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group; 2006; Hirschel and Flanigan, 2009). Por otro lado, debido al hecho de que la enfermedad causada por el VIH tiende a ser de progresión más rápida en niños que en adultos (Palacios et al, 2002; Working Group on Antiretroviral Therapy, 2009; CENSIDA, 2009), no se ha demostrado de manera concluyente si las estrategias de interrupción del tratamiento funcionan también en la población pediátrica y, en consecuencia, la información disponible acerca de las IET para este tipo de pacientes es limitada (Gibb et al., 2004; Borkowsky et al., 2008a,b). En el presente estudio se evaluó el impacto virológico, inmunológico y clínico de un programa de STI de TARAA en tres ciclos de 4 semanas sin (off) y 12 semanas con (on) en una muestra de niños con SIDA en control virológico crónico.

La magnitud del rebote virológico al completar el primer período de interrupción llegó a sugerir a los investigadores que este programa de IET no era seguro; sin embargo, debido a que el seguimiento a 6 y 12 semanas después de reiniciar TARAA debía ser completado y como la CV cayó a niveles indetectables en estas dos mediciones, se decidió continuar con los siguientes dos ciclos de interrupción/reinicio.

La duración de los ciclos sin/con (“off / on”) de TARAA en el presente estudio fue elegida debido a que en los estudios prospectivos realizados en adultos se han utilizado períodos de IET tan largos como tres meses, o tan cortos como dos semanas (Opravil et al., 2004; Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Yerly et al., 2004; Sabnine et al., 2004). Además, un estudio de interrupciones no estructuradas de TARAA por problemas intercurrentes en pacientes con infección crónica controlada y CV no detectable, demostró que interrupciones no mayores de cuatro semanas parecen ser seguras (Opravil et al., 2004), y un estudio prospectivo reciente que evaluó pacientes pediátricos también demostró que períodos de interrupción de cuatro semanas parecen ser seguras (Borkowsky et al., 2008a).

Los rebotes virológicos progresivamente menores al finalizar los dos siguientes períodos de interrupción podrían sugerir que la exposición temporal del paciente al VIH induce el desarrollo de una respuesta inmune específica, la cual sería la responsable de una menor magnitud de la replicación en dichos rebotes (Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Opravil et al., 2004), y que si continuara esta tendencia durante un seguimiento

más largo, podría eventualmente retardarse la ocurrencia de los rebotes y, por lo tanto, se podría dejar sin tratamiento a los pacientes por períodos más largos de tiempo. En pacientes adultos, las IET parecen ofrecer mayores beneficios en los casos de infección aguda, cuando el sistema inmune está aún intacto (Lori et al., 2000a,b; Lori et al., 2001). Los resultados de algunos estudios en adultos sometidos a IET en la fase aguda de la enfermedad han reportado un aumento en el control viral de la infección debido a un incremento cuantitativo en la respuesta inmune específica mediada por células T, lo que ha sugerido la posibilidad de auto-inmunización. Sin embargo, los resultados no han sido consistentes de un estudio a otro (Lori et al., 2000a,b; Deeks et al., 2001; Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Giard et al., 2005). En un estudio pediátrico retrospectivo de 72 niños que incurrieron en 82 interrupciones no planeadas de TARAA, se observó un incremento en las cifras de linfocitos CD4+ a niveles pre-interrupción alrededor de los 6 meses después del reinicio de TARAA con otro o el mismo esquema antirretroviral, y un aumento en la proporción de niños con CV bajo el límite de detección (<400 copias/ml) de 15% durante las interrupciones a 46% después del reinicio del tratamiento (Gibb et al., 2004). Por otro lado, un estudio prospectivo pediátrico que incluyó a ocho niños sometidos a interrupciones del tratamiento antirretroviral progresivamente más largas demostró un aumento significativo en la respuesta inmune específica contra el VIH con reducción de los niveles de ARN viral en los niños sometidos a más de 10 ciclos de IET (Borkowsky et al., 2008). En cambio, en el estudio PENTA 11 que incluyó 109 niños con infección crónica por el VIH procedentes de nueve países, 56 fueron asignados aleatoriamente para someterse a una o dos IET guiadas por las cifras de linfocitos CD4 + durante más de 48 semanas. Aunque las reducciones en los conteos de CD4 + fueron mayores en los niños sometidos a IET, sólo cuatro de ellos tuvieron un resultado final de interés (“endpoint”) para las cifras de CD4+ (<15%, y en los mayores de 7 años <200 células/mm³) contra uno en el grupo en terapia continua. Sin embargo, después de 72 semanas de seguimiento, el 94% en terapia continua contra 81% en IET permanecían con supresión de la CV <400 copias de ARN/mL (Gibb et al., 2008).

En esta fase del estudio, todos los rebotes virológicos fueron seguidos por un descenso de la CV a cifras indetectables durante los períodos de tratamiento en los cuatro pacientes, con una sola excepción al final del seguimiento (Paciente No. 1).

Todos los niños llenaron así el criterio de éxito de la interrupción y del reinicio. Estos hallazgos sugerían que los rebotes virológicos transitorios no inducen la selección de cuasi-especies resistentes a antirretrovirales. El riesgo de que esto ocurra es mayor cuando hay replicación viral en presencia de niveles sub-terapéuticos de tales drogas, como ocurre cuando hay falla en la adherencia al tratamiento (Deeks et al., 2001; Lori et al., 2001; Miller et al., 2000). Aunque en esta primera etapa no se realizó la búsqueda de mutaciones relacionadas con resistencia a antirretrovirales, los resultados obtenidos sugerían que el riesgo del desarrollo de resistencia y de pérdida secundaria del control viral era bajo, ya que salvo en las primeras horas de los períodos de interrupción, no ocurrió replicación viral en presencia de droga circulante (Deeks et al., 2001; Lori et al., 2001; Miller et al., 2000). Los estudios de interrupciones estructuradas y no estructuradas de TARAA en pacientes adultos han reportado que la ocurrencia de mutaciones relacionadas a resistencia antirretroviral oscila entre 0.75% y 45% (Lori et al., 2001; Fagar et al., 2003; The Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group, 2006). La CV de los niños del presente estudio no hubiera descendido a niveles indetectables de manera tan consistente de haber ocurrido la selección de *cuasi*-especies con este tipo de mutaciones. Sin embargo, a este punto del estudio era posible que hubieran ocurrido mutaciones asociadas a resistencia, de manera particular la mutación M184V que confiere resistencia a 3TC, y como otros autores han sugerido también era posible que M184V pudiera haber resultado en un virus menos apto, lo cual podría explicar los rebotes virológicos progresivamente menores (Diallo et al., 2003; Triyedi et al., 2008). La única excepción en cuanto a la ausencia de CV detectable durante los períodos de tratamiento (“on”) fue una niña en la última medición (Paciente No. 1). Durante la toma de la muestra para esta determinación, la niña estaba cursando con un cuadro infeccioso de vías respiratorias superiores. Aunque no se hicieron estudios para determinar la etiología de dicho cuadro, muy probablemente fue de etiología viral. La CV de esta paciente llegó a ser nuevamente indetectable en la siguiente medición. Se ha demostrado que eventos como estos inducen incrementos transitorios de la replicación que ceden una vez que el proceso infeccioso intercurrente se resuelve (Shearer et al., 1997; McIntosh et al., 1996).

La reducción progresiva en la magnitud de los rebotes con respecto al primero podría ser atribuida a variaciones en los niveles de ARN viral debidas a variabilidad del ensayo y variabilidad biológica. Aunque la mayoría de esta variabilidad se debe a variación biológica y aunque en pacientes adultos esta variabilidad puede ser tan alta como 3 veces ($0.5 \log_{10}$), cambios mayores de $0.5 \log_{10}$ (3 veces) deben ser considerados clínica y biológicamente significativo en niños mayores de 2 años de edad (McIntosh et al., 1996; Shearer et al., 1997; Hughes et al., 1997; Bartlett et al., 1998; Working Group on Antiretroviral Therapy, 2008). La mediana de las reducciones en la magnitud de los rebotes fue mayor que los $0.5 \log_{10}$ atribuidos a esta variabilidad biológica, sobre todo la magnitud del tercer rebote con respecto al primero ($0.8 \log_{10}$). Estas reducciones también permitieron que la carga viral al final del tercer rebote se estableciera por lo menos en el logaritmo inmediato inferior al del primer rebote, y siempre regresando a niveles indetectables una vez reiniciado el tratamiento. Por lo tanto, es poco probable que la reducción en la magnitud de los rebotes observada fuera debida exclusivamente a la variabilidad biológica en los niveles de ARN viral (Hughes et al., 1997; Bartlett et al., 1998).

Los incrementos importantes en las cifras de linfocitos T CD8+ observados en la mayoría de los períodos de interrupción del tratamiento y que coincidieron con los rebotes virológicos, sugieren el desarrollo de una respuesta T citotóxica vigorosa al estímulo viral, como ha sido demostrado en algunos estudios previos (Deeks et al., 2001; Lori et al., 2001; Borkowsky et al., 2008b; Arnedo-Valero et al., 2005). Sin embargo, este hallazgo no ha sido consistente en los diferentes estudios (Lori et al., 2000a,b; Deeks et al., 2001; Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Gibb et al., 2004; Giard et al., 2005). En el presente estudio, esta respuesta T CD8+ vigorosa se acompañó de un descenso inicial en los conteos y porcentajes de linfocitos T CD4+. A pesar de esto, los incrementos progresivos en las cifras de linfocitos T CD4+ después del segundo período de interrupción, llegando incluso a superar las cifras de linfocitos T CD8+, sugieren que el riesgo de pérdida del control de la respuesta inmune con el desarrollo ulterior de eventos clínicos secundarios es bajo. Por otro lado, los rebotes virológicos progresivamente menores parecían apoyar uno de los posibles beneficios de las STI, incremento en la respuesta inmune específica. Con la suspensión del TARA,

la replicación limitada y temporal de virus autólogo permitiría la inducción de una respuesta inmune específica contra el VIH. Si los ciclos de retiro y reinicio de TARAA fueran aplicados de una manera continua, se podría producir un retardo en el rebote de la CV, el cual podría incrementar con cada interrupción (Lori et al., 2000a; Lori et al., 2001; Fagard et al., 2003; Borkowsky et al., 2008a,b). Sin embargo, las reducciones en los porcentajes de linfocitos CD4+ observados en el presente estudio podrían ser preocupantes debido a la posibilidad del desarrollo de inmunosupresión si los pacientes fueran sometidos a más ciclos durante un seguimiento más largo. Borkowsky et al., demostraron el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH, con reducciones progresivas de la CV en niños que fueron sometidos a más de 10 interrupciones del tratamiento antirretroviral de duración progresivamente más largas (Borkowsky et al., 2008b). Aunque en esta etapa del estudio no se evaluó la respuesta inmune a un nivel que permitiera distinguir si los cambios observados eran respuestas específicas contra el VIH que estaban suprimiendo la replicación viral o si solo representaban activación inmune inespecífica, los resultados obtenidos sugerían que es posible el desarrollo de una respuesta inmune específica que podría limitar la replicación viral de una manera temprana y utilizando esquemas de interrupción del tratamiento más simples que el utilizado por Borkowsky et al. Además, debido a que sólo ocurrió un evento de inmunosupresión severa, el cual fue transitorio, temprano durante el seguimiento y sin síntomas, los resultados obtenidos sugerían que las IET de TARAA aplicadas a los niños en las condiciones probadas en esta fase del presente estudio son seguras desde el punto de vista inmunológico.

Con la excepción de un paciente, no ocurrió ningún síntoma relacionado a la infección por el VIH en la muestra de niños evaluada en esta parte del estudio. Aunque los estudios en adultos sometidos a IET de TARAA han mostrado resultados contrastantes, incluyendo series con ausencia de síntomas y series que han reportado diversos síntomas relacionados con el reinicio del tratamiento antirretroviral, como exantema, urticaria, linfadenopatía, fatiga y otros (Kilby et al., 2000; Ortiz et al., 2001; Fagard et al., 2003; Giard et al., 2005; Arnedo-Valero et al., 2005), los resultados del presente estudio sugieren que el riesgo de desarrollar eventos clínicos agudos, como el

síndrome retroviral agudo, y eventos clínicos oportunistas es bajo con este programa de IET en niños con infección crónica controlada.

Aunque el número de pacientes fue pequeño, la consistencia de los resultados obtenidos sugería que un programa de IET de TARAA como el probado en esta fase del estudio en niños con CV crónicamente indetectable, condiciona rebotes virológicos progresivamente menores seguidos por el descenso de la CV a niveles indetectables y el desarrollo de una respuesta T CD8+ vigorosa, con un descenso inicial en la respuesta T ayudadora que es seguida por ascensos progresivos de la misma. Todo esto sugería que la exposición temporal y repetida al VIH podría inducir el desarrollo de una respuesta inmune específica, y puesto que ningún paciente cursó con inmunosupresión severa ni con eventos clínicos relacionados al VIH, estos resultados también parecen indicar que este programa de STI es seguro desde el punto de vista inmunológico y clínico. Sin embargo, se requiere de estudios con un mayor número de niños seguidos por más tiempo, que incluyan diferentes esquemas antirretrovirales, y sobre todo ensayos clínicos controlados para poder sacar conclusiones definitivas sobre los beneficios y la seguridad de las IET de TARAA en niños.

7.2 Discusión (Fase 2).

En esta parte del estudio se investigó la ocurrencia de mutaciones relacionadas con resistencia antirretroviral durante los rebotes virológicos de los niños sometidos al programa de IET de TARAA en la primera fase. Aunque los resultados virológicos, inmunológicos y clínicos concordaban con algunos de los estudios previos en pacientes adultos y uno realizado en niños, era posible que algunas mutaciones relacionadas a resistencia antirretroviral pudieran haber sido inducidas por los niveles sub-terapéuticos de los antirretrovirales al inicio y al final de cada período de interrupción (Lori et al., 2000b; Giard et al., 2005; Van Rompay et al., 2006; Borkowsky et al., 2008a).

Un estudio previo hace referencia al riesgo de la utilización de las interrupciones de tratamiento antirretroviral, sobre todo debido a la inducción de variantes resistentes y propone limitar su uso sólo a aquellos pacientes con condiciones inmunológicas favorables (Aiuti and Giovannetti, 2003). Los pacientes incluidos en el estudio no

mostraron inmunosupresión (de acuerdo con la clasificación de los CDC [Centers for Disease Control and Prevention, 1994]) y estuvieron asintomáticos de acuerdo con el seguimiento de un año antes del inicio de las STI.

Las secuencias de la proteasa y transcriptasa reversa (TR) de las muestras de los rebotes virológicos de los dos niños incluidos en esta parte del estudio fueron analizadas utilizando la base de datos de resistencia a drogas antirretrovirales de la Universidad de Stanford (Stanford University HIV Drug Resistance Database) (Rhee et al., 2000), no encontrando evidencia de mutaciones asociadas a resistencia para cualquiera de los inhibidores de la proteasa y TR actualmente disponibles en el mercado. Debido al hecho que después de todos los rebotes virológicos la CV cayó a niveles indetectables al reanudar el TARAA, era poco probable que hubieran ocurrido este tipo de mutaciones. Esto contrasta con los resultados de un estudio previo en el que ocho niños fueron sometidos a interrupciones del tratamiento antirretroviral progresivamente más largos, en los cuales mutaciones de resistencia antirretroviral se detectaron en tres (M184V; M184V, V82A; M184V, V82A, and I84I/V). A pesar de esto, la replicación viral fue suprimida a <50 copias/mL después de la reanudación de la terapia antirretroviral (Borkowsky et al., 2008a). Debe ser reconocido, sin embargo, que a pesar de que mutaciones asociadas con resistencia a los antirretrovirales no fueron detectadas en el presente estudio, su ausencia no puede ser asegurada, ya que puede haber *cuasi*-especies resistentes que no fueron detectadas por el análisis genotípico llevado a cabo. La magnitud de los rebotes virológicos durante la ausencia de tratamiento, los cuales incrementaron de niveles indetectables hasta >100,000 copias/mL al final de todos los períodos de interrupción probados, con la excepción del 3^{er} período de interrupción de la paciente No. 3, puede haber reducido la probabilidad de detección de variantes resistentes. Se ha demostrado que *cuasi*-especies resistentes tienen una menor capacidad de replicación en ausencia de la presión selectiva ejercida por los fármacos antirretrovirales, lo que pudo haber favorecido el predominio de las cepas de tipo salvaje en el momento del muestreo al final de cada período de interrupción del tratamiento (Valle-Bahena et al., 2006, Borkowsky et al., 2008a).

Una evaluación inicial para la predicción fenotípica de resistencia a antirretrovirales resultaría de gran utilidad en éste tipo de estudios ya que es posible la

presencia de algunas mutaciones en los niños antes de ser iniciados en el programa de IET. A los cuatro pacientes incluidos se les proporcionó seguimiento clínico previo; todos ellos fueron seguidos durante los 12 meses antes de la primera interrupción con CV viral inferior al límite de detección (<400 copias/mL) por TARA. El hecho de que al inicio de las IET la CV es indetectable limita la posibilidad de realizar la genotipificación, aunque en un estudio anterior se demuestra la posibilidad de realizar el ensayo genotípico en muestras de plasma con niveles de ARN viral menores de 75 copias/mL, logrando la predicción de resistencias en la secuencia completa de la proteasa y los primeros 300 residuos de la TR (Mitsuya et al; 2006).

Aunque en las secuencias de la proteasa que fueron analizadas con la base de datos de la Universidad de Stanford no se encontraron mutaciones asociadas a resistencia antirretroviral, se encontraron otras mutaciones no asociadas a dicha resistencia. Valle-Bahena et al, mediante la evaluación de pacientes naïve (no tratados previamente) encontraron la presencia de tres mutaciones clasificadas como secundarias en las posiciones 63, 77 y 93. Los cambios L63P, V77L y I93L fueron los más frecuentes en dicho estudio, y estuvieron presentes en todas las muestras del presente estudio (Valle-Bahena et al., 2006). Aunque se ha sugerido que los pacientes con cepas virales que contienen múltiples mutaciones secundarias pueden tener un mayor riesgo de fracaso virológico durante el tratamiento con IP (Valle-Bahena et al., 2006; Borkowsky et al., 2008a; Delaugerre et al., 2009), la CV de los dos pacientes de esta fase del estudio regresó a niveles indetectables una vez que se reanudó el TARA a pesar de la

Con el fin de predecir las mutaciones en la TR, el presencia de tales mutaciones.

El algoritmo VIH-DB de la Universidad de Stanford indica 560 codones que completan la región de la TR; sin embargo, sólo fue posible evaluar secuencias incompletas de ella, lo cual coincide con un estudio previo en el que sólo se reportaron las secuencias de 444 codones (Valle-Bahena et al., 2006), y con otro trabajo en el que se reportaron las mutaciones mediante el análisis de la secuencia completa de la proteasa (codones 1-99), pero sólo la secuencia de los codones 1 a 305 de la TR (Delaugerre et al., 2009). Actualmente, las pruebas para resistencia a antirretrovirales se han convertido en un estándar para el manejo de la infección por el VIH (Taylor et al; 2009). Una alternativa

aprobada por la FDA para la práctica clínica en EUA es el empleo del *TruGene HIV-1 Genotyping Test* (Visible Genetics, Suwanee, GA EUA) el cual realiza el ensayo genotípico en muestras plasmáticas de forma automática analizando los 99 codones de la proteasa y solamente los codones 40-247 de la TR. A diferencia de lo anterior, la estrategia de genotipificación utilizada en el presente estudio posibilita que un mayor número de codones de la TR sean incluidos en el análisis de resistencia y, aunado a esto, el elevado costo de la prueba comercial limita su aplicación en estudios como el que aquí se presenta.

En el presente estudio se encontraron diversas mutaciones clasificadas como "otras mutaciones", que no corresponden con las asociadas resistencia a los ITRAN e ITRNN (Shafer et al., 2007). Hay que destacar que aunque se encontró el cambio K103R en las dos muestras del paciente No. 4 y que el algoritmo VIH-DB de la Universidad de Stanford lo presenta como una mutación posiblemente asociada con resistencia a ITRNN, por sí sola no tiene ningún efecto sobre la susceptibilidad a estos fármacos. Se ha demostrado que la combinación K103R + V179D reduce aproximadamente en 15 veces la susceptibilidad a la nevirapina (NVP), delavirdina (DLV) y Efavirens (EFV); sin embargo, la segunda mutación (V179D) no se detectó en los rebotes virales de los pacientes en el presente estudio. Además, hay un estudio en el que la mutación K103R asociada a resistencia a NVP fue más común en adultos, mientras que la mutación Y181C asociada a posible resistencia a NVP lo fue en niños (Eshleman et al., 2001). Dado que la mutación K103R se encontraba presente desde el primer periodo de interrupción del tratamiento en el paciente No. 4, es posible que dicha mutación no se haya generado por el proceso de interrupción del tratamiento, sino que ya estaba presente en el niño antes de su inclusión en el estudio; no obstante, no se cuenta con las secuencias pre-tratamiento. Por otro lado, también es posible la transmisión vertical de variantes resistentes a NVP, especialmente con el uso profiláctico en dosis única (Eshleman et al., 2001), lo que hace posible que la madre hubiera transmitido esta mutación a este niño. Sin embargo, la madre de este paciente era naïve a cualquier medicamento antirretroviral antes del parto.

Aunque sólo cinco rebotes virales de dos niños fueron examinados, el hecho de que no se haya encontrado ninguna mutación asociada a resistencia a los

antirretrovirales, los resultados obtenidos en esta parte del estudio sugieren que las interrupciones estructuradas de TARAA, como fueron planeadas en este estudio, tienen un bajo riesgo de inducir resistencia a los antirretrovirales; sin embargo, se requiere de estudios con muestras mayores de niños, que incluyan diferentes esquemas antirretrovirales, e incluso con un mayor número de ciclos de interrupción/reinicio de TARAA para demostrar la consistencia de los resultados observados.

7.3 Discusión Fase 3.

Después de seguir virológica, inmunológica y clínicamente a los diez niños de la segunda muestra, se incluyeron seis con el criterio de infección crónica controlada por TARAA para evaluar la síntesis de IFN- γ por células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) inducida por VIH. Los procesos infecciosos que tienen un curso crónico se caracterizan por una respuesta inmune específica ineficaz contra el patógeno agresor, lo cual permite su persistencia. Puesto que el VIH es uno de esos patógenos, este es el caso de los niños incluidos en el presente estudio. Diversas estrategias han sido utilizadas con la finalidad de mejorar la actividad inmunológica contra el VIH, algunas han tratado de inducir anticuerpos neutralizantes, el reconocimiento por células T CD4+, la producción de citocinas o la función citotóxica mediada por células T CD8+. La vacunación terapéutica contra el VIH ha tenido un éxito limitado en cuanto a estas respuestas (Harrer et al., 2005; Tubiana et al., 2005; Kran et al., 2005; Smith et al., 2007), ya que la eficacia de cualquier vacuna se ha visto obstaculizada por la gran heterogeneidad de las cepas del VIH de un paciente a otro y aún en un mismo paciente. En un estudio previo se logró un buen control de la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia simiana (SIV) mediante la inmunización con virus inactivado completo idéntico al virus infectante (Lu et al., 2003). Esta estrategia sería impráctica en la clínica, ya que cada persona infectada tiene una población heteróloga de virus con múltiples cuasi-especies. Un enfoque alternativo para "inmunizar" con poblaciones virales autólogas a una persona infectada es someterla a un proceso de interrupciones del tratamiento antirretroviral, lo cual permitiría la replicación de las especies virales

endógenas que actuarían como un estímulo inmunológico después de la supresión virológica causada por el TARAA, tal es el caso de las IET.

Varios investigadores han evaluado este abordaje en pacientes adultos con infección crónica por VIH utilizando diversos esquemas de interrupción y un número variado de períodos de interrupción con el objeto de inducir el desarrollo de inmunidad específica contra el VIH. Los efectos han sido generalmente evaluados utilizando parámetros inmunológicos surrogados y la medición de la CV. Sin embargo, los resultados no han sido consistentes en poblaciones adultas y la información en niños es limitada (Papasavvas et al., 2000; Carcelain et al., 2001; Ortiz et al., 2001; Oxenius et al., 2002; Frost et al., 2002; Lori et al., 2002; Gibb et al., 2004; Borkowsky et al., 2008a,b). La síntesis de IFN- γ se mantuvo estable durante el primer período de interrupción de TARAA hasta la semana 10 del reinicio del tratamiento. Posteriormente se observó un incremento importante en la síntesis de esta citocina hasta la semana 16 para luego volver a descender durante el segundo período de interrupción del tratamiento. Un incremento superior al primero se observó después del segundo período de interrupción del TARAA, otra vez a las seis semanas del reinicio del tratamiento. Borkowsky et al, demostraron el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH con una reducción progresiva de la CV en niños que fueron sometidos a más de 10 interrupciones del tratamiento antirretroviral progresivamente mayores (Borkowsky et al., 2008). Los resultados de esta fase del presente estudio sugieren que los cambios observados aún desde la primera fase (reducción progresiva de la CV, incremento en la respuesta proliferativa T CD8+, descenso inicial con aumento posterior de la respuesta T CD4+ e incremento de la síntesis de IFN- γ durante los rebotes virológicos) parecen corresponder a respuestas específicas contra el VIH dirigidas a suprimir la replicación viral. Los resultado sugieren, por lo tanto, que tal respuesta inmune específica contra el VIH podría hacer posible restringir la replicación viral tempranamente y con un esquema de interrupciones más sencillo que el utilizado por Borkowsky et al, como fue comentado antes.

En esta muestra, uno de los niños fue eliminado durante el seguimiento debido a que presentó inmunosupresión severa. Este paciente parece haber sido un mal candidato desde antes de entrar al estudio debido a que sus cifras de linfocitos CD4+ basales eran

realmente bajas. Fuera de este caso, debido a que no hubo otros eventos de inmunosupresión severa, los resultados obtenidos en esta fase del estudio también sugieren que el programa de IET de TARAA en las condiciones ensayadas en este estudio parece ser inmunológicamente seguro. Aunque se observó un descenso en la magnitud del segundo rebote virológico con respecto al primero, varias fallas en la adherencia al tratamiento en las que incurrieron los pacientes condicionaron incrementos en las cifras de la CV aún durante los períodos con TARAA.

En el presente estudio se observó un incremento en las cifras de células T CD4+ que coincidió con el inicio del incremento en los niveles de IFN- γ . Un estudio de interrupción del tratamiento antirretroviral realizado en adultos tratados con TARAA poco después de ocurrida la infección primaria, demostró mejoría en la actividad y longevidad de la actividad anti-VIH mediada por células T CD4+, así como reducción en la carga viral, sin embargo, el éxito se vio limitado al pasar el tiempo (Altfeld et al., 2001). La incapacidad de las personas infectadas por el VIH para controlar la viremia en ausencia de terapia antirretroviral eficaz ha estimulado el desarrollo de estrategias dirigidas a aumentar la inmunidad “natural” contra el VIH a través del uso de vacunas “terapéuticas”. Dos estudios en los que se usaron vacunas inactivadas con propósitos terapéuticos demostraron que ocurre un incremento en las respuestas inmunes T CD4+ específicas contra el VIH pero sin beneficio virológico (Kundu et al., 1997; Kahn et al., 2001). Sin embargo, la presencia de respuestas específicas T CD4+ contra el VIH en algunos pacientes “progresores lentos”, respuestas vistas con menor frecuencia en pacientes con enfermedad progresiva, ha mantenido interés en el objetivo de incrementar las respuestas T CD4+.

En la primera etapa del estudio se pudo documentar una reducción progresiva en la magnitud de los rebotes virológicos condicionados por los períodos de interrupción de TARAA. Este cambio en la trayectoria de la carga viral podría estar relacionado al hallazgo de la tercera etapa del estudio, incremento de la síntesis de IFN- γ inducida por el VIH, lo que sugiere el desarrollo de inmunidad específica contra dicho virus. Borkowsky et al, encontraron una relación similar en cuatro de los niños que sometieron a interrupciones progresivas de TARAA (Borkowsky et al., 2008b). Sin embargo, en dicho estudio los autores concluyeron que se necesitan ocho o más exposiciones para

poder observar incrementos en la respuesta inmune específica contra el VIH. En contraste con esto, la necesidad de múltiples exposiciones a virus autólogo para observar efecto sobre el comportamiento de la viremia, en el presente estudio se observó una reducción progresiva en la magnitud del rebote viral desde el segundo período de interrupción del tratamiento, lo cual puede ser secundario al desarrollo de inmunidad específica, como se propuso desde la primera etapa del estudio. Borkowsky et al., también sugieren que otros estudios han fallado debido a un número insuficiente de períodos de interrupción del tratamiento (menos de seis) y que otras estrategias inmunoterapéuticas que involucran el empleo de vacunas pueden requerir de un gran número de inmunizaciones para lograr el control virológico. Aunque la inmunoterapia vacunal contra el VIH puede ser una opción para tratar de controlar la replicación viral, un estudio reciente de terapia con una vacuna contra el VIH basada en el poxvirus de canario “*canary-pox*”, con o sin interrupción del tratamiento, demostró que las interrupciones retardan más el rebote viral que la misma vacuna (Jacobson et al., 2006; Borkowsky et al., 2008b). Este hallazgo también sugiere que en la exposición a virus autólogo, como ocurre en las IET, es más probable el control de la viremia que en la exposición a virus heterólogos. Por lo tanto, el incremento en la síntesis de IFN- γ por CMNSP al ser estimuladas por antígeno de VIH, sugiere que las IET de TARAA pueden inducir el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH, lo cual parece apoyar la llamada hipótesis de la “auto-vacunación”, en la que el desarrollo de inmunidad específica inducida por la exposición a poblaciones virales autólogas puede estar condicionando las reducciones progresivas en la magnitud de los rebotes virológicos.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio sugieren que las Interrupciones Estructuradas (IET) de TARAA en niños en control virológico crónico como fueron probadas en el presente estudio:

- Condicionan rebotes virológicos progresivamente menores, los cuales son seguidos por descenso de la CV a niveles indetectables. Aunque es posible que la reducción progresiva en la magnitud de los rebotes haya sido debida al predominio temporal de poblaciones virales con menor capacidad de replicación, lo más probable es que haya sido secundaria al desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH.
- Conllevan un riesgo bajo de condicionar inmunosupresión severa. Aunque ocurrieron eventos de reducción en las cifras de linfocitos T CD4+ a niveles de supresión severa, sobre todo en la segunda muestra de niños evaluada, la mayoría de los rebotes virológicos no condicionaron tales eventos.
- No inducen el desarrollo de sintomatología asociada al VIH. Los únicos eventos clínicos detectados durante el desarrollo del programa de IET no pueden ser atribuidos al tratamiento ARV.
- No parecen inducir la aparición de mutaciones relacionadas a resistencia ARV. La mutación K103R encontrada en dos de los rebotes virológicos evaluados y que se ha asociado a resistencia a los ITRNN, sólo condiciona tal resistencia en presencia de la mutación V179D, la cual no fue encontrada en los rebotes virológicos examinados. El resto de las mutaciones encontradas fueron clasificadas como menores y no asociadas a resistencia ARV.
- Las conclusiones anteriores sugieren que el programa de IET, como fue probado en el presente estudio, es clínica, virológica e inmunológicamente seguro.
- El incremento en la síntesis de IFN- γ por CMNSP al ser estimuladas por antígeno de VIH, sugiere que las IET de TARAA pueden inducir el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH. Este hallazgo parece apoyar la primera conclusión de este estudio y la así llamada hipótesis de la “auto-vacunación”, en la cual el

desarrollo de inmunidad específica inducida por la exposición a poblaciones virales autólogas puede estar condicionando las reducciones progresivas en la magnitud de los rebotes virológicos, esto podría dar lugar eventualmente a retardos mayores en el inicio de tales rebotes.

- Las conclusiones anteriores sugieren que el programa de IET, como fue probado en el presente estudio, es clínica, virológica e inmunológicamente seguro, con los beneficios potenciales de la inducción de rebotes virológicos progresivamente menores probablemente condicionados por el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el VIH y con un riesgo bajo de inducción de resistencia a los ARV. Sin embargo, se requiere la realización de nuevas investigaciones con un mayor número de niños seguidos por más tiempo, con periodos de interrupción/reinicio adicionales y que incluyan diferentes esquemas antirretrovirales para poder sacar conclusiones definitivas sobre los beneficios y la seguridad de las IET de TARAA en niños.

APÉNDICE

Anexo 1.

Instituto Mexicano Del Seguro Social
Centro Médico Noreste
UMAE Hospital de Especialidades No. 25
Departamento de Pediatría
Consulta Externa de Infectología Pediátrica

“CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO”

Carta de consentimiento informado para el protocolo de investigación: “Evaluación de un programa de interrupciones estructuradas de HAART en ciclos de 4/12 semanas en niños con SIDA y carga viral crónicamente indetectable”

Fecha: A ____ de _____ del 200 ____.

DATOS DEL PACIENTE:

Nombre: _____
Edad: _____ Afiliación: _____
Dirección: _____
Teléfono: _____

JUSTIFICACIÓN:

La infección causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), es una enfermedad crónica que requiere tratamiento de por vida con medicamentos conocidos como Antirretrovirales. En niños la combinación de dos grupos de estos medicamentos, lo que se conoce como Terapia Antirretroviral Altamente Activa (TARAA en Español o HAART en Inglés), es el mejor tratamiento. Sin embargo pueden presentarse efectos secundarios de estos medicamentos, conocidos como toxicidad medicamentosa, los cuales se van acumulando conforme pasa el tiempo. Por otro lado, a medida que se va controlando la enfermedad, los familiares responsables de administrar el tratamiento o los pacientes mismos, incurren en fallas en la administración de los medicamentos, al suspenderlos en forma espontánea sin indicación médica, lo que se conoce como falla en la adherencia al tratamiento. Debido a estos problemas se considera importante evaluar el efecto de interrumpir el tratamiento antirretroviral en forma controlada con vigilancia virológica (de la multiplicación del VIH), inmunológica (de la afectación del sistema inmunológico) y clínica en ciclos temporales seguidos de reinicio del tratamiento. Una estrategia como ésta, conocida como “Interrupciones estructuradas del tratamiento” permitiría reducir la toxicidad crónica de los medicamentos y los costos del tratamiento, y se traduciría en una mejor calidad de vida de los pacientes, y en una mejoría en la adherencia al tratamiento antirretroviral.

OBJETIVO:

Evaluar si las interrupciones estructuras del tratamiento antirretroviral por 4 semanas en niños con enfermedad bajo control por tener carga viral crónicamente indetectable en sangre (por más de 6 meses), producen un incremento de la carga viral (cantidad de virus

en sangre) no mayor a $5 \log^{10}$ (cien miles) que disminuye más de $2 \log^{10}$ cuando se reinicia el tratamiento sin haber repercusión en el sistema inmunológico.

PROCEDIMIENTOS A REALIZAR EN EL PACIENTE:

- 1) Toma de muestras: sangre de vena necesaria para realizar las diferentes pruebas (aprox. 7 ml), que incluyen determinación de carga viral, cantidad de glóbulos blancos (células CD4+ y CD8+), otras pruebas inmunológicas y búsqueda de mutaciones en el virus. Se tienen programadas 9 determinaciones en el seguimiento de un año.
- 2) Retiro de tratamiento antirretroviral, a partir de la fecha indicada por un periodo de 4 semanas como se establece en el presente protocolo, lo que corresponde a la interrupción estructurada.
- 3) Reinicio de tratamiento antirretroviral: se realizará posterior a la interrupción estructurada, con el reinicio de la terapia antirretroviral por 12 semanas.
- 4) Se llevarán cabo tres ciclos de retiro-reinicio.

RIESGOS PARA EL PACIENTE:

- 1) Es posible que ocurra sangrado y formación de una equimosis “moretón” en el sitio donde se tomará la muestra.
- 2) La posibilidad de que después de la interrupción la carga viral (número de virus en la sangre) no se reduzca a los niveles previos es muy baja, ya que en un estudio previo de cuatro niños, en todos la CV regreso a niveles indetectables después de los tres reinicios del tratamiento antirretroviral.
- 3) El riesgo de que el VIH que infecta al paciente se haga resistente a los medicamentos antirretrovirales es también muy bajo, ya que el desarrollo de mutaciones que hacen a este virus resistentes usualmente ocurre cuando el virus se está multiplicando y el paciente tiene cantidades bajas de los medicamentos en sangre, lo cual sucede cuando hay falla en la adherencia al tratamiento.

BENEFICIOS DE LAS INTERRUPCIONES ESTRCUTURADAS:

- 1) Mejoría en la tolerancia (aceptación) de los medicamentos al disminuir los efectos secundarios al uso crónico de los medicamentos antirretrovirales.
- 2) La suspensión controlada del tratamiento antirretroviral permitiría la replicación del virus (VIH) silvestre (que es sensible a los medicamentos), lo cual en teoría activaría el sistema inmune del paciente de manera creciente con cada ciclo de interrupción controlada (teoría de auto-vacunación). ESTE POSIBLE BENEFICIO ES SOLO TEORICO.
- 3) Demora de la replicación viral, que incrementa con cada interrupción.

BENEFICIOS PARA LA SOCIEDAD Y PARA EL AVANCE DEL CONOCIMIENTO:

La información disponible hasta el momento a nivel nacional e internacional de esta modalidad de tratamiento es limitada y se refiere sólo a pacientes adultos, por lo que es importante realizar el presente estudio y conocer el comportamiento de las interrupciones estructuradas en pacientes pediátricos.

LIBERTAD DE PARTICIPACIÓN:

El familiar o persona legalmente responsable del paciente o el mismo paciente tendrán la libertad de decidir si desean ingresar o no al presente estudio, o una vez incluidos en él, podrán decidir si desean continuar o no participando en el mismo sin que por ello haya repercusiones en su derechohabencia, continuando el tratamiento antirretroviral previo al ingreso al protocolo, o el adecuado a cada caso de acuerdo a la opinión de su médico tratante.

GARANTIA DE RESPUESTA A DUDAS:

Si existieran dudas acerca del tratamiento, o de cualquier situación referente al presente estudio por parte del paciente, los familiares o tutores de éste, podrán realizar todas las preguntas que deseen, a las cuales se dará respuesta en forma sencilla, verídica y completa.

GARANTIA DE CONFIDENCIALIDAD:

Los datos personales de los participantes serán analizados exclusivamente por el grupo de investigadores de este protocolo, manteniendo dicha información en total confidencialidad.

GARANTIA DE INFORMACIÓN DE TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS:

Si durante el tiempo en que un paciente esté participando en el presente estudio, surge(n) otro(s) tratamiento(s) alternativo(s), que demuestre(n) su eficacia, los investigadores se comprometen a informar sobre la posibilidad de dicho tratamiento a los padres, tutores o al paciente.

LUGAR DE REALIZACION:

IMSS-UMAE Hospital de Especialidades No. 25 Centro Médico del Noreste, Monterrey, Nuevo León.

Doy por entendido lo que se me ha explicado referente a la evolución y complicaciones propias de la enfermedad, así como del tratamiento que se implementará, y de que si fuera mi voluntad no continuar con dicho seguimiento estaré en la plena libertad de así decidirlo; y por medio de la presente autorizo al departamento de pediatría, Consulta Externa de Infectología Pediátrica, una vez que me han brindado información completa y clara de este protocolo de estudio, y de los riesgos y beneficios posibles que pueden presentarse durante el desarrollo del mismo; para que:

Pueda ser incluido en el programa de interrupciones estructuradas de HAART, durante el cual se suspende la terapia antirretroviral por 4 semanas, seguidas del reinicio de la misma en las 12 semanas siguientes, periodos durante los cuales se realizará vigilancia de la replicación viral y del estado inmunológico (determinación de carga viral y niveles de linfocitos CD4+ y CD8+) y de igual forma me comprometo a seguir de forma estricta las indicaciones relacionadas con la fecha de inicio y de interrupción del tratamiento antirretroviral, así como a acudir a las citas programadas para vigilancia clínica, virológica e inmunológica.

PERSONA RESPONSABLE DEL PACIENTE QUE BRINDA AUTORIZACIÓN:

Nombre y firma: _____
Edad : _____ Parentesco : _____ Domicilio : _____

TESTIGOS:

Nombre y firma: _____
Edad: _____ Relación con el paciente: _____
Domicilio: _____

Nombre y firma: _____
Edad: _____ Relación con el paciente: _____
Domicilio: _____

INVESTIGADORES:

_____ Dr. Gerardo Palacios Saucedo _____ Dra. María de la Luz Sánchez Sánchez
_____ Dra. Ana Paola Salas Villar _____

EN CASO DE DUDAS RESPECTO AL PRESENTE ESTUDIO, puede acudir con :
Dra. María de la Luz Sánchez o Dr. Gerardo Palacios Saucedo.
Teléfono: 8371 4100 Extensión: 41749, 41750, 41751, 41752 (Servicio de pediatría HE No. 25)

EN CASO DE REQUERIR ATENCIÓN MEDICA:
Teléfono: 837-4100 Extensión: 41749, 41750, 41751, 41752 (Servicio de pediatría HE No. 25)

LITERATURA CITADA

Abiodun M.O., Ijaiya M.A. y Aboyeji P.A. Transmission of HIV among pregnant women. *J Nat Med Assoc* 2007; 99:758-763.

Aiuti F y Giovannetti A. Structured interruptions of therapy: looking for the best protocol. *AIDS* 2003, 17:2257-2258.

Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, Mukherjee JS, Hecht FM, Eldridge RL, *et al.* Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* 2001;193(2):169-180.

Amellal B., Katlama C. y Calvez V. Evaluation of the use of dried spots and of different storage conditions of plasma for HIV-1 RNA quantification. *HIV Med* 2007, 8:396-400.

Arnedo-Valero M, Garcia F, Gil C, *et al.* Risk of selecting de novo drug-resistance mutations during structured treatment interruptions in patients with chronic HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2005;41:883-890.

Barré-Sinussi F., Chermann J.C., Rey F., Chamaret N.S, Gruest J., Dauguet C. y Axler-Blin. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983, 220:868-871.

Bartlett JA, DeMasi R, Dawson D, Hill A. Variability in repeated consecutive measurements of plasma human immunodeficiency virus RNA in persons receiving stable nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy or no treatment. *J Infect Dis* 1998;178:1803-1805.

Bennett D.E., Camacho R.J., Otelea D., Kuritzkes D.R., Fleury H., Kiuchi M., Heneine W., Kantor R., Jordan M.R., Schapiro J.M., Vandamme A.M., Sandstrom P., Boucher C.A.B., van de Vijver D., Rhee S.Y., Liu T.F., Pillay D y Shafer R.W. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 2009, 4:4724-4732.

Bongiovanni M, Casana M, Tincati C, d'Arminio Monforte A. Treatment interruptions in HIV-infected subjects. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:502-505.

Borkowsky W., Yogev R., Muresan P., Mcfarland E., Frenkel L., Fenton T., Capparelli E., Moye J., Harding P., Ellis N., Heckman B. y Kraimer J. Planned multiple exposures to autologous virus in HIV type 1-infected pediatric populations increases HIV specific immunity and reduces HIV viremia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008, 24:401-411.

Borkowsky W, Yogev R, Muresan P, *et al.* Structured treatment interruptions (STIs) in HIV-1 infected pediatric populations increases interferon gamma production and reduces viremia. *Vaccine* 2008;26:3086-3089.

Brindeiro P.A., Brindeiro R.M., Mortensen C., Hertogs K., De Vroey V., Rubini N.P.M., Sion F.S., De Sá C.A.M., Machado D.M., Succi R.C.M., y Tanuri A. Testing genotypic and phenotypic resistance in human immunodeficiency virus type 1 isolates of clade B and other clades from children failing antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 4512-4519.

Carcelain G, Tubiana R, Samri, *et al.* Transient mobilization of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4 helper T cells fails to control virus rebounds during intermittent antiretroviral therapy in chronic HIV type 1 infection. *J Virol* 2001;75:234-241.

Centro Nacional para la Prevención y el Control del SIDA (CENSIDA). Secretaría de Salud. Cifras al 30 de Junio de 2010. México. Disponible en línea: <http://www.salud.gob.mx/conasida> .

Centro Nacional para la Prevención y el Control del SIDA (CENSIDA). Secretaría de Salud. Guía de manejo antirretroviral de las personas que viven con el VIH. 4ª ed. México: Secretaría de Salud; 2009. Available at: <http://www.censida.salud.gob.mx/>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1994 Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR Recomm Rep* 1994; 43(RR-12):1-10.

Chew C.B., Potter S.J., Wang B., Wang Y.M., Shaw C.O., Dwyer D.E., y Saksena N.K. Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. *J Clin Virol* 2005, 33: 206-216.

Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004, 350:1023-1035.

Cohen M.S., Hellmann N., Levy J.A., DeCock K., y Lange J. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. *J Clin Invest* 2008, 118:1244-1254.

de Oliveira T., Deforche K., Cassol S., Salminen M., Paraskevis D., Seebregts C., Snoeck J., van Rensburg E.J., Wensing A.M.J., van de Vijver D.A., Boucher C.A., Camacho R. y Vandamme A.M. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005, 21: 3797-3800.

Deeks S, Wrin T, Liegler T, *et al.* Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patient with detectable viremia. *N Engl J Med* 2001;344:472-480.

Delaugerre C, Chaix ML, Blanche S, *et al.* Perinatal acquisition of drug-resistant HIV-1 infection: mechanisms and long-term outcome. *Retrovirology* 2009; 6: 85-98.

Diallo K, Go'tte M, Wainberg MA. Molecular impact of the M184 V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3377-3383.

Drechsler H. y Powderly W.G. Switching effective antiretroviral therapy: a review. *Clin Infect Dis* 2002, 35:1219-1230.

Eshleman SH, Mracna M, Guay LA, *et al.* Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET 012). *AIDS* 2001;15:1951-1957.

Espy M.J., Uhl J.R. Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F. Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill III F.R. y Smith T.F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006, 19:165-256.

Fagard C, Oxenius A, Günthard H, *et al.* A prospective trial of structured treatment interruptions in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Arch Intern Med* 2003;163:1220-1226.

Frost SD, Martinez-Picado J, Ruiz L, Clotet B, and Brown AJ. Viral dynamics during structured treatment interruptions of chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2002;76(3):968-979.

Gallo RC, Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med* 2003, 349:2283-2285.

Giard M, Boibieux A, Ponceau B, *et al.* Treatment interruption in HIV infected patients: clinical and biological evolution. *Med Malad Infect* 2005;35:525-529.

Gibb D, Trinh D, Leclezio V, *et al.* Immunologic changes during unplanned treatment interruptions of highly active antiretroviral therapy in children with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:446-450.

Gibb DM, Compagnucci A, Green H, *et al.* Treatment interruption in children with chronic HIV-infection: the results of the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 11 trial. 9th International Congress on Drug Therapy in HIV infection. Glasgow, Scotland. November 9-13, 2008. *J Intern AIDS Soc* 2008;11(Suppl 1):O21.

Gifford R.J., Liu T.F., Rhee S.Y., *et al.* The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics Advance Access* 2009, 25:1197-1198.

Ginocchio C.C., Wang X.P., Kaplan M.H., Mulligan G., Witt D., Romano J.W. Cronin M. y Carroll R. Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on

stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1997, 35:2886-2893.

Gonzales M.J., Johnson E., Dupnik K.M., Imamichi T., y Shafer R.W. Colinearity of reverse transcriptase inhibitors resistance mutations detected by population-based sequencing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003, 34: 398-402.

Harrer E, Bauerle M, Ferstl B, Chaplin P, Petzold B, et al. Therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with a recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: Safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. *Antiviral Ther* 2005;10(2):285-300.

Hirschel B y Flanigan T. Is it smart to continue to study treatment interruptions? *AIDS* 2009, 23:757-759.

Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MMS, Bremer MJW, Elbeik T, Erice A, et al. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response ACTG 241 Protocol Virology Substudy Team. *Ann Intern Med* 1997;126:929-938.

Jacobson JM, Bucy RP, Spritzler J, Saag MS, Eron JJ Jr, et al. Evidence that intermittent structured treatment interruption, but not immunization with ALVAC-HIV vCP1452, promotes host control of HIV replication: The results of AIDS Clinical Trials Group 5068. *J Infect Dis* 2006;194:623-632.

Johnson V.A., Brun-Vézinet F., Clotet B., Günthard H.F., Kuritzkes D.R., Pillay D., Schapiro J.M., y Richman D.D. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: december 2008. *Top HIV Med* 2008, 16:138:145.

Julg B, Goebel FD. Treatment interruption in HIV therapy: a SMART strategy? *Infection* 2006;34:186-188.

Kahn JO, Cherng DW, Mayer K, Murray H, and Lagakos S: Evaluation of HIV-1 immunogen, an immunologic modifier, administered to patients infected with HIV having 300 to 549 x 10(6)/L CD4 cell counts: A randomized controlled trial. *JAMA* 2000;284:2193–2202. [Erratum appears in *JAMA* 2001;285(17):2197.

Kantor R., Shafer R.W., Follansbee S., Taylor J., Shilane D., Hurley L., Nguyen D.P., Katzenstein D. y Fessel W.J. Evolution of resistance to drugs in HIV-1-infected patients failing antiretroviral therapy. *AIDS* 2004, 18: 1503-1511

Kilby JM, Goepfert PA, Miller AP, Gnann JW, Sillers M, Saag MS, et al. Recurrence of the acute HIV syndrome after interruption of antiretroviral therapy in a patient with chronic HIV infection: a case report. *Ann Intern Med* 2000;133:435-438.

Kran, AM, Sommerfelt MA, Sorensen B, Nyhus J, Baksaas I, Bruun JN, and Kvale D: Reduced viral burden amongst high responder patients following HIV-1 p24 peptide-based therapeutic immunization. *Vaccine* 2005;23(31):4011-4015.

Kuhmann S.E., Platt E.J., Kozak S.L. y Kabat D., Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2000, 74: 7005-7015.

Kundu SK, Katzenstein D, Valentine FT, Spino C, Efron B, Merigan TC. Effect of therapeutic immunization with recombinant gp160 HIV-1 vaccine on HIV-1 proviral DNA and plasma RNA: Relationship to cellular immune responses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;15:269-274.

Lang T, Secic M, editors. How to report statistics in medicine. Annotated guidelines for authors and reviewers. Philadelphia: American College of Physicians series; 1997.

Larru B., Mendoza C., Bellón J.M., de José M.I., Mellado M.J., Soriano V., Muñoz-Fernandez M.A. y Ramos J.T. Predictive factors of virological success to salvage regimens containing protease inhibitors in HIV-1 infected children. *BMC Infect Dis* 2007, 7:55-60.

Lengauer T. Analyzing resistance phenomena in HIV with bioinformatics methods. *Bioinformatics* 2003, 19:ii92.

Liu T.F. y Shafer R.W. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis* 2006, 42:1608-1618.

Lori F, Foli A, and Lisziwicz J. Control of HIV during a structured treatment interruption in chronically infected individuals with vigorous T cell responses. *HIV Clin Trials* 2002;3:115-124.

Lori F, Lewis M, Xu J, et al. Control of HIV rebound through structured treatment interruptions during early infection. *Science* 2000;290:1591-1593.

Lori F, Maserati R, Foli A, Seminari E, Timpone J y Lisziewicz J. Structured treatment interruptions to control HIV-1 infection. *Lancet* 2000, 355: 287-288

Lori F, Lisziewicz, Julianna P. Structured treatment interruptions for the management of HIV Infection. *JAMA* 2001;286:2981-2987.

Lu W, Wu X, Lu Y, Guo W, and Andrieu JM: Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. *Nat Med* 2003;9(1):27-33.

Malhotra A., Gaur S., Whitley-Williams P., Loomis C. y Petrova A. Protease inhibitor associated mutations compromise the efficacy of therapy in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infected pediatric patients: a cross-sectional study. *AIDS Res Ther* 2007, 4:15-21.

Marchou B, Tangre P, Charreau I, Izopet J, Girard PM, May T, et al. Intermittent antiretroviral therapy in patients with controlled HIV infection. *AIDS* 2007;21:457-466.

McIntosh K, Shevitz A, Zaknun D, Kornegay J, Chatis P, Karthas N, et al. Age- and time-related changes in extracellular viral load in children vertically infected by human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:1087-1091.

Miller V, Sabin C, Hertogs K, et al. Virological and immunological effects of treatment interruptions in HIV-1 infected patients with treatment failure. *AIDS* 2000;14:2857-2867.

Mitsuya Y., Winters M.A., Fessel WJ., Rhee S.Y., Slome S., Flamm J., Horberg M., Hurley L., Klein D. y Shafer R.W. HIV-1 drug resistance genotype results in patients with plasma samples with HIV-1 RNA levels less than 75 copies/mL. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006, 43:56-59.

Monpoux F., Tricoire J., Lalande M., Reliquet V., Bebine B. y Thuret I. Treatment interruption for virological failure or as sparing regimen in children with chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2004, 18:2401-2409.

Morison L. The global epidemiology of HIV/AIDS. *Br Med Bull* 2001, 58:7-18

Moyle G.J. Current knowledge of HIV-1 reverse transcriptase mutations selected during nucleoside analogue therapy: the potential to use resistance data to guide clinical decisions. *J Antimicrob Chemother* 1997, 40:765-777.

Naar-King S, Arfken C, Frey M, Harris M, Secord E, Ellis D. Psychosocial factors and treatment adherence in paediatric HIV/AIDS. *AIDS Care* 2006; 18: 621-628.

Nesheim S.R., Kapogiannis B.G. Soe M.M., Sullivan K.M., Abrams E., Farley J., Palumbo P., Koenig L.J. y Bulterys M. Trends in Opportunistic Infections in the Pre and Post Highly Active Antiretroviral Therapy Eras Among HIV-Infected Children in the Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study, 1986-2004. *Pediatrics* 2007, 120:100-109.

Nettles R.E., Kieffer T.L., Kwon P., Monie D., Han Y, Parsons T., Cofrancesco J., Gallant J.E., Quinn T.C., Jackson B., Flexner C., Carson K., Ray S., Deborah Persaud D. y Siliciano R.F. Intermittent HIV-1 viremia (Blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA* 2005, 293:817-829.

Opravil M, Baumann D, Chave JP, et al. Long-term efficacy after switch from protease inhibitor-containing highly active antiretroviral therapy to abacavir, lamivudine, and zidovudine. *AIDS* 2004;18:2213-2215.

Ortiz GM, Wellons M, Brancato J, et al. Structured antiretroviral treatment interruptions in chronically HIV-1-infected subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13288-13293.

Oxenius A, Price DA, Gunthard HF, Dawson SJ, Fagard C, Perrin L, et al. Stimulation of HIV-specific cellular immunity by structured treatment interruption fails to enhance viral control in chronic HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(21):13747-13752.

Pai NP, Tulsy JP, Lawrence J, Colford JM, Reingold AL. Structured treatment interruptions (STI) in chronic suppressed HIV infection in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005; Issue 4. Art. No.:CD005482.

Palacios GC, Palafox VL, Alvarez MT, y col. Response to two consecutive proteasa inhibitor combination therapy regimens in a cohort of HIV-1 infected children. *Scand J Infect Dis* 2002;34:41-44.

Papasavvas E, Ortiz RM, Sun J, et al. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 and CD8 T cell responses in chronically infected persons after temporary treatment interruption. *J Infect Dis* 2000;182:766-775.

Petersen M.L., Wang Y., van der Laan M.J., Rhee S.Y., Shafer R.W. y Fessel W.J. Virologic efficacy of boosted double versus boosted single protease inhibitors therapy. *AIDS* 2007, 21:1547-1554.

Plebani A, Esposito S, Raffaella P, y col. Effect of highly active antiretroviral therapy on cardiovascular involvement in children with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:559-563.

Preston B.D., Poiesz B.J. y Loeb L.A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988; 242: 1168-1170.

Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y Organización Mundial de la Salud (OMS). Situación de la Epidemia de SIDA Noviembre de 2009. Disponible en línea: <http://www.unaids.org/es/default.asp>.

Puthanakit T., Oberdorfer A., Akarathum N., Kanjanavanit S., Wannarit P., Sirisanthana T. y Sirisanthana V. Efficacy of highly active antiretroviral therapy in HIV-infected children participating in Thailand's national access to antiretroviral program. *Clin Infect Dis* 2005, 41:100-107.

Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 2003;31: 298-303.

Rhee S.Y., Fessel W.J., Zolopa A.R., Hurley L., Liu T., Taylor J., Nguyen D.P., Slome S., Klein D., Horberg M., Flamm J., Follansbee S., Schapiro J.M. y Shafer R.W. HIV-1 protease and reverse-transcriptase mutations: correlations with antiretroviral therapy ins subtype B isolates and implications for drug-resistance surveillance. *J Infect Dis* 2005; 192:456-465.

Rhee S.Y., Taylor J., Wadhwa G., Ben-Hur A., Brutlag D.L., Shafer R.W. Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:17355-17360.

Rhee S.Y., Liu T.F., Holmes S.P. y Shafer R.W. HIV-1 subtype B protease and reverse transcriptase amino acid covariation. *PLoS Comput Biol* 2007; 3:87-94.

Rhee S.Y., Liu T.F., Kiuchi M., Zioni R., Gifford R.J., Holmes S.P. y Shafer R.W. Natural variation of HIV-1 group M integrase: implication for a new class of antiretroviral inhibitors. *Retrovirology* 2008, 5:74-84.

Rhee S.Y., Fessel W.J., Liu T.F., Marlowe N.M., Rowland C.M., Rode R.A., Vandamme A.M., Laethem K.V., Brun-Vezinet F., Calvez V., Taylor J., Hurley L., Horberg M. y Shafer R.W. Predictive value of HIV-1 genotypic resistance test interpretation algorithms. *J Infect Dis* 2009, 200:453-463.

Rivera-Morales L.G., Novitsky V.A., Trujillo J.R., Lavallo-Montalvo C., Cano-Dominguez C., Ramos-Jimenez J., Jimenez-Rios E., Flores-Flores L., Lopez-Guillen P., Gilbert P., Vannberg F., Tamez-Guerra R., Rodriguez-Padilla C., Essex M. The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:87-89.

Sabine Y, Huldrych G, Catherine F, et al. Proviral HIV-DNA predicts viral rebound and viral setpoint after structured treatment interruptions. *AIDS* 2004;18:1951-1953.

Sáez-Llorens X, Ramilo O. Early experience with protease inhibitors in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:728-738.

Saitoh A., Foca M., Viani R., Heffernan-Vacca S., Vaida F., Lujan-Zilbermann J., Emmanuel P.J., Deville J.G. y Spector S.A. Clinical outcomes after an unstructured treatment interruptions in children and adolescents with perinatally acquired HIV infection. *Pediatrics* 2008, 121:513-521

Sánchez-Granados JM, Ramos-Amador JT, Fernández-de-Miguel S, González-Tomé MI, Rojo-Conejo P, Vivas PF, et al. Impact of highly active antiretroviral therapy on the morbidity and mortality in Spanish human immunodeficiency virus infected children. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:863-867.

Schuval S.J. Pharmacotherapy of pediatric and adolescent HIV infection. *Ther Clin Risk Manag* 2009; 5:469-484.

Shafer R.W. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:247-277.

Shafer R.W. Kantor R. y Gonzalez M.J. The genetic basis of HIV-1 resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors. *AIDS Rev* 2000, 2:211-228.

Shafer R.W. Low-abundance drug resistant HIV-1 variants: finding significance in an era of abundant diagnostic and therapeutic options. *J Infect Dis* 2009, 199:610-612.

Shafer R.W. The challenge of antiretroviral drug resistance in HIV-1 infected children. *J Pediatr* 2009; 85:91-94.

Shafer RW, Schapiro JM. Drug resistance and antiretroviral drug development. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 817-820.

Shafer RW, Schapiro JM. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev* 2008;10:67-84

Shafer R.W., Rhee S.Y. y Bennett D.E. Consensus drug resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. *Antivir Ther* 2008, 13:59-68.

Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS* 2007;21:215-223.

Shah C.A. Adherence to high activity antiretroviral therapy (HAART) in pediatric patients infected with HIV: issues and interventions. *Indian J Pediatr* 2007, 74:55-60.

Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew JF, Mofenson L, Almy S, et al. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1 Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 1997;336:1337-1342.

Smith KA, Andjelic S, Popmihajlov Z, Kelly-Rossini L, Sass A, Lesser M, Benkert S, Waters C, Ruitenber J, and Bellman P: Immunotherapy with canarypox vaccine and interleukin-2 for HIV-1 infection: Termination of a randomized trial. *PLoS Clin Trials* 2007; 2(1);e5.

Solórzano-Santos F, Gochicoa-Rangel LG, Palacios-Saucedo G, Vázquez-Rosales G, Miranda-Novales MG. Hypertriglyceridemia and hipercolesterolemia in human immunodeficiency virus-infected children treated with protease inhibitors. *Arch Med Res* 2006;37:129-132.

Taylor B.S., Sobieszczyk M.E., McCutchan F.E. y Hammer S.M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008, 15:1590-1602.

Taylor S., Jayasuriya A. y Smit E. Using HIV resistance tests in clinical practice. *J Antimicrob Chemother* 2009, 64:218-222.

The Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006; 355:2283-2296.

Tiemessen C.T. y Kuhn L. Immune pathogenesis of pediatric HIV-1 infection. *Current HIV/AIDS Reports* 2006, 3:13-19

Tong C.Y.W., Mullen J., Kulaseguram R., De Ruiter A., O'Shea S. y Chrystie I.L. Genotyping of B and non-B subtypes of human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 2005, 43:4623-4627.

Trivedi V, Von Lindern J, Montes-Walters M, Rojo DR, Shell EJ, Parkin N, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor drug resistance mutation interactions on phenotypic susceptibility. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:1291-1300.

Tubiana, R, Carcelain G, Vray M, Gourelain K, Dalban C, Chermak A, et al. Therapeutic immunization with a human immunodeficiency virus (HIV) type 1-recombinant canarypox vaccine in chronically HIV-infected patients: The Vacciter Study (ANRS 094). *Vaccine* 2005;23(34):4292-4301.

Valle-Bahena O.M., Ramos-Jiménez J., Ortiz-López R, Revol A., Lugo-Trampe A., Barrera-Saldaña H.A. y Rojas-Martínez A. Frequency of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations in naïve HIV-infected patients. *Arc Med Res* 2006; 37: 1022-1027.

Van Rompay KK, Singh RP, Heneine W, et al. Structured treatment interruptions with tenofovir monotherapy for simian immunodeficiency virus-infected newborn macaques. *J Virol* 2006; 80: 6399-6410.

Vidal-Lampurdanés C, Pumarola-Suñé T. The virus of human immunodeficiency: virological characteristics, natural history and physiopathology of the nervous system infection. *Rev Neurol* 1996, 24:1563-1568.

Wiener L., Mellins C.A., Marhefka S. y Battles H.B. Disclosure of an HIV diagnosis to children: history, current research, and future directions. *J Dev Behav Pediatr* 2007, 28:155-166.

Williams P.L., Storm D., Montepiedra G., Nichols S., Kammerer B., Sirois P.A., Farley J. y Malee K. Predictors of adherence to antiretroviral medications in children and adolescents with HIV infection. *Pediatrics* 2006, 118:1745-1757.

Working group on antiretroviral therapy and medical management of HIV-infected children. Guidelines for the use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. February 23, 2009; pp 1-139. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/PediatricGuidelines.pdf>.

Yerly S, Günthard HF, Fagard C, Joos B, Perneger TV, Hirschel B, et al. Proviral HIV-DNA predicts viral rebound and viral setpoint after structured treatment interruptions. *AIDS* 2004;18:1951-1953

Zhang J., Rhee S.Y., Taylor J. y Shafer R.W. Comparison of the precision and sensitivity of the antiviogram and phenosense HIV drug susceptibility assays. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38:439-444.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Gerardo del Carmen Palacios Saucedo

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: EVALUACIÓN DE UN PROGRAMA DE INTERRUPCIONES ESTRUCTURADAS DE TARAA EN CICLOS DE 4/12 SEMANAS EN NIÑOS CON SIDA Y CARGA VIRAL CRÓNICAMENTE INDETECTABLE

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en la ciudad de Torreón, Coahuila, el 16 de Julio de 1958, hijo de Javier Palacios Flores y Rosa María Saucedo Venegas.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Coahuila, grado obtenido, Médico Cirujano en 1981. Universidad Nacional Autónoma de México, grado obtenido, Especialista en Pediatría Médica en 1987. Instituto Nacional de Pediatría, grado obtenido, Especialista en Infectología Pediátrica en 1989. Universidad Nacional Autónoma de México, grado obtenido, Maestro en Ciencias Médicas en 1998.

Experiencia Profesional: Jefe de la División de Investigación, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades No. 25, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, Monterrey, N.L., de 2006 a la fecha. Investigador Asociado “D” Centro de Investigación Biomédica del Noreste y UMAE Hospital de Especialidades No. 25, IMSS, Monterrey, N.L., de 2005 a la fecha. Investigador Asociado “B” Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México 1992-2004. Especialista en Infectología Pediátrica, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México, de 1992 a 2003. Especialista en Enfermedades Infecciosas en Pediatría, Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México 1990-1992. Especialista en Enfermedades Infecciosas en Pediatría, Departamento de Inmunología e Infectología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México 1989-1990. Autor de 33 artículos científicos (19 en revistas indizadas y 16 en revistas con factor de impacto). Autor o coautor de 9 libros y autor o coautor de 24 capítulos de libros. Dirección o codirección de 5 tesis de Maestría y 36 tesis de Especialidad. Premios, honores o distinciones 26. Investigador Nacional Nivel I por el Sistema Nacional de Investigadores (CONACyT).

LOGROS ALCANZADOS

Publicaciones:

Palacios GC, Sanchez LM, Briones E, Ramirez TJ, Castillo H, Rivera LG, Vázquez CA, Rodríguez-Padilla C. Structured interruptions of highly active antiretroviral therapy in cycles of 4 weeks off /12 weeks on therapy in children having a chronically undetectable viral load cause progressively smaller viral rebounds. Intern J Infect Dis 2010;14:e34-e40.

Palacios-Saucedo GC, Rivera-Morales LG, Vázquez-Guillén JM, Sánchez LM, Ramírez TJ, Briones E, Ortiz-López R, Vázquez CA, Rodríguez-Padilla C. Drug Resistance Mutations During Structured Interruptions of HAART in HIV-1 Infected Children. Enviado a la revista Current HIV Research.

Premios obtenidos:

Tercer lugar en Investigación Clínica. XXV Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica. Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica, A. C. 2006. Título: “Las interrupciones estructuradas de TARAA en ciclos de 4/12 semanas en niños con carga viral crónicamente indetectable condicionan rebotes virológicos progresivamente menores.”

Segundo lugar. I Jornadas de Residentes y Ex-residentes de Pediatría Hospital de Especialidades No. 25, IMSS. Universidad de Monterrey. 2007. Título: “Las interrupciones estructuradas de TARAA en ciclos de 4/12 semanas en niños con carga viral crónicamente indetectable condicionan rebotes virológicos progresivamente menores.”

Primer lugar en Investigación Clínica. XXIX Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica. Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica, A. C. 2010. Título: “Las Interrupciones Estructuradas de TARAA en ciclos de 4 semanas sin / 12 semanas con en niños con carga viral crónicamente indetectable condicionan rebotes virológicos progresivamente menores, no inducen el desarrollo de mutaciones relacionadas con resistencia y si promueven el desarrollo de inmunidad específica contra el VIH.”



ELSEVIER



<http://intl.elsevierhealth.com/journals/ijid>

Structured interruptions of highly active antiretroviral therapy in cycles of 4 weeks off/12 weeks on therapy in children having a chronically undetectable viral load cause progressively smaller viral rebounds

Gerardo C. Palacios^{a,*}, Luz M. Sanchez^a, Evangelina Briones^b,
Teresa J. Ramirez^c, Hugo Castillo^c, Lydia G. Rivera^d,
Carlos A. Vazquez^a, Cristina Rodriguez-Padilla^d, Mark Holodniy^{e,**}

^aDepartamento de Pediatría and Infectología Pediátrica, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 25 and Centro de Investigación Biomedica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Fidel Velasquez y Lincoln S/N, Colonia Nueva Morelos, Monterrey, Nuevo Leon, CP 64320, Mexico

^bCoordinación Delegacional de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social, Saltillo, Coahuila, Mexico

^cLaboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Nuevo Leon, Secretaría de Salud, Nuevo Leon, Mexico

^dLaboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico

^eCalifornia, USA

Received 5 November 2008; received in revised form 19 February 2009; accepted 1 March 2009

Corresponding Editor: Mark Holodniy, California, USA

KEYWORDS

Structured treatment interruptions;
Highly active antiretroviral therapy (HAART);
Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)

Summary

Objectives: To evaluate the viral, immune and clinical impact of a structured treatment interruption (STI) program of highly active antiretroviral therapy (HAART) in three cycles of 4 weeks off/12 weeks on therapy in a cohort of children with HIV infection under chronic viral control.

Methods: Using a single-group time series experimentation design and following informed consent, the HAART of children with HIV and a chronically undetectable viral load (VL) was discontinued for 4 weeks and then restarted and continued for 12 weeks for a total of three cycles. The VL, CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes, and clinical status were evaluated at the end of each STI and at 6 and 12 weeks after HAART was resumed.

* Corresponding author. Tel.: +52 81 8371 4100x41315; fax: +52 81 8371 4100x41315.

** Corresponding author.

E-mail address: palsaugc@gmail.com (G.C. Palacios).

Manuscript Submission | BSP-CHIVR-2010-108 | 07-09-2010

2 mensajes

chivr@bentham.org <chivr@bentham.org>
Para: palsaugc@gmail.com
Cc: anila@benthamsience.org, cwood1@unl.edu

6 de septiembre de 2010 21:20

Stage: Manuscript Submission

Manuscript Reference#: BSP-CHIVR-2010-108

Date: 07-09-2010

Dear Dr. Palacios-saucedo,

Thank you for submitting your article for **Current HIV Research** which we have received and will forward to the editorial board and external reviewers for peer reviewing.

As soon as we receive any feedback from the reviewers, we will get back to you with their comments, which may facilitate you with the revision of the article, if required.

Manuscript Title: **Drug Resistance Mutations During Structured Interruptions of HAART in HIV-1 Infected Children.**

Thank you,

Yours sincerely,
Bentham Science Publishers

“Drug Resistance Mutations During Structured Interruptions of HAART in HIV-1 Infected Children”

Authors: Gerardo C. Palacios-Saucedo^{*1}, Lydia G. Rivera-Morales², José M. Vázquez-Guillén², Luz M. Sánchez¹, Teresa J. Ramírez³, Evangelina Briones⁴, Rocío Ortiz-López², Carlos A. Vázquez¹ and Cristina Rodríguez-Padilla².

Affiliations: ¹División de Investigación, Departamento de Pediatría and Infectología Pediátrica, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 25 and Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México. ²Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas and Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ³Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Nuevo León, Secretaría de Salud, Nuevo León, México. ⁴Coordinación Delegacional de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social, Saltillo, Coahuila, México.

Short running title: Structured HAART interruptions in children.

***Corresponding author:** Gerardo C. Palacios, M.D. División de Investigación, Departamento de Pediatría e Infectología Pediátrica, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades No. 25 y Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social. Fidel Velázquez y Lincoln S/N Colonia Nueva Morelos, Monterrey, Nuevo León, México, C.P. 64320. Telephone and Fax number: (52) 81-8371-4100 Ext. 41315. E-mail address: palsaugc@gmail.com and gerardo.palacios@imss.gob.mx



EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL XXV CONGRESO INTERAMERICANO DE
INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA "Dr. Napoleón González Saldaña"
OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO A:

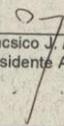
Palacios G.C.*, Sánchez L.M., Reynoso E.Y., Briones E, Ramírez T.J., Castillo H.

POR HABER OBTENIDO EL 3ER LUGAR EN TRABAJOS LIBRES EN EL AREA DE
INVESTIGACION CLINICA CON EL TEMA:

**LAS INTERRUPCIONES ESTRUCTURADAS DE TARA A EN CICLOS DE 4/12 SEMANAS
EN NIÑOS CON CARGA VIRAL CRONICAMENTE INDETECTABLE CONDICIONAN
REBOTES VIROLOGICOS PROGRESIVAMENTE MENORES.**

ESTAMOS AGRADECIDOS POR LA ALTA CALIDAD DE SU PRESENTACIÓN LA
CUAL CONTRIBUYO AL ÉXITO DEL CONGRESO

LEON GUANAJUATO, MÉXICO A 18 DE NOVIEMBRE DE 2006


Dr. Francisco J. Avila Cortes
Presidente A.M.I.P.



UDEM

UNIVERSIDAD DE MONTERREY
División de Ciencias de la Salud
U.M.A.E. Hospital de Especialidades No. 25



Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

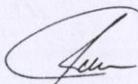
a

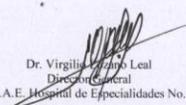
Dr. Salas V.L.P.
Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo
Dra. Luz María Sánchez Sánchez
Dra. Elia Yunuen Reynoso
Dra. Evangelina Briones Lara
Dr. Ramírez T.J.
Dr. Castillo H.

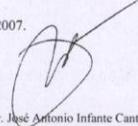


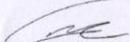
Por haber obtenido el SEGUNDO LUGAR con el TRABAJO DE INVESTIGACIÓN titulado:
“Las interrupciones estructuradas de TARAA en ciclos de 4/12 semanas en niños con carga viral crónicamente indetectable condicionan rebotes virológicos progresivamente menores”
en las **“1 eras. Jornadas de Residentes y Ex Residentes de Pediatría”**
efectuadas los días 10 y 11 de agosto de 2007.

Monterrey, N. L., a 11 de agosto de 2007.


Dr. Eduardo García Luna Martínez
Director de la División de Ciencias de la Salud
Universidad de Monterrey


Dr. Virgilio Leal
Director General
U.M.A.E. Hospital de Especialidades No. 25


Dr. José Antonio Infante Cantú
Presidente del Colegio de Pediatría
de Nuevo León A.C.


Dr. Gerardo Dávalos Cruz
Presidente de la Sociedad de
Pediatría de Monterrey



EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL
XXIX CONGRESO INTERAMERICANO DE INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA

Otorga la presente

CONSTANCIA A:

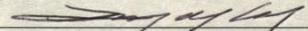
PALACIOS-SAUCEDO GC, * GARCÍA-AYALA R, CISNEROS-GAONA ES, VÁZQUEZ-GUILLÉN JG, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ LM, BRIONES-LARA E, RAMÍREZ TJ, RIVERA-MORALES LG, GARCÍA-CAMPOS JA, VÁZQUEZ-MARTÍNEZ CA, RODRÍGUEZ-PADILLA C.

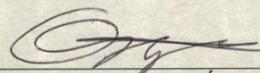
POR HABER OBTENIDO EL **PRIMER LUGAR** EN TRABAJOS LIBRES, EN LA CATEGORÍA DE **INVESTIGACIÓN CLÍNICA** CON EL TRABAJO:

LAS INTERRUPCIONES ESTRUCTURADAS DE TARA A EN CICLOS DE 4 SEMANAS SIN / 12 SEMANAS CON EN NIÑOS CON CARGA VIRAL CRÓNICAMENTE INDETECTABLE CONDICIONAN REBOTES VIROLÓGICOS PROGRESIVAMENTE MENORES, NO INDUCEN EL DESARROLLO DE MUTACIONES RELACIONADAS CON RESISTENCIA Y SI PROMUEVEN EL DESARROLLO DE INMUNIDAD ESPECÍFICA CONTRA EL VIH.

ESTAMOS AGRADECIDOS POR LA ALTA CALIDAD DE SU PRESENTACIÓN LA CUAL CONTRIBUYO AL ÉXITO DEL CONGRESO

PUEBLA, PUE., MEXICO A 27 DE NOVIEMBRE DE 2010.


DRA. LUCILA MARTÍNEZ MEDINA
Presidente Asociación Mexicana de
Infectología Pediátrica, A. C.


DRA. HILDA G. HERNÁNDEZ OROZCO
Coordinadora de Trabajos Libres

Secuencias Depositadas en el Banco de Genes

LOCUS GU392033 550 bp RNA linear VRL 25-JAN-2010
 DEFINITION HIV-1 isolate 09NLPR07-01 from Mexico pol protein gene, partial cds.
 ACCESSION GU392033
 VERSION GU392033.1 GI:284155456
 KEYWORDS
 SOURCE Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)
 ORGANISM Human immunodeficiency virus 1
 Viruses; Retro-transcribing viruses; Retroviridae;
 Orthoretrovirinae; Lentivirus; Primate lentivirus group.
 REFERENCE 1 (sites)
 AUTHORS Rivera-Morales, L.G., Vazquez-Guillen, J.M., Avila-Montanez, B.O., Ortiz-Lopez, R., Palacios-Saucedo, G.C. and Rodriguez-Padilla, C.
 TITLE Genotype analysis of protease and reverse transcriptase genes on children with HIV-1 under structured treatment interruptions
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 550)
 AUTHORS Rivera-Morales, L.G., Vazquez-Guillen, J.M., Avila-Montanez, B.O., Ortiz-Lopez, R., Palacios-Saucedo, G.C. and Rodriguez-Padilla, C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-DEC-2009) Microbiologia e Inmunologia, Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragan s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico

LOCUS GU392034 548 bp RNA linear VRL 25-JAN-2010
 DEFINITION HIV-1 isolate 09NLPR07-02 from Mexico pol protein gene, partial cds.
 ACCESSION GU392034
 VERSION GU392034.1 GI:284155458
 KEYWORDS
 SOURCE Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)
 ORGANISM Human immunodeficiency virus 1
 Viruses; Retro-transcribing viruses; Retroviridae;
 Orthoretrovirinae; Lentivirus; Primate lentivirus group.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 548)
 AUTHORS Rivera-Morales, L.G., Vazquez-Guillen, J.M., Avila-Montanez, B.O., Ortiz-Lopez, R., Palacios-Saucedo, G.C. and Rodriguez-Padilla, C.
 TITLE Genotype analysis of protease and reverse transcriptase genes on children with HIV-1 under structured treatment interruptions
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 548)
 AUTHORS Rivera-Morales, L.G., Vazquez-Guillen, J.M., Avila-Montanez, B.O., Ortiz-Lopez, R., Palacios-Saucedo, G.C. and Rodriguez-Padilla, C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-DEC-2009) Microbiologia e Inmunologia, Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragan s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico

LOCUS GU392035 1028 bp RNA linear VRL 25-JAN-2010
 DEFINITION HIV-1 isolate 09NLRT-01 from Mexico pol protein gene, partial cds.
 ACCESSION GU392035
 VERSION GU392035.1 GI:284155460
 KEYWORDS
 SOURCE Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)
 ORGANISM Human immunodeficiency virus 1
 Viruses; Retro-transcribing viruses; Retroviridae;
 Orthoretrovirinae; Lentivirus; Primate lentivirus group.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1028)
 AUTHORS Rivera-Morales, L.G., Vazquez-Guillen, J.M., Avila-Montanez, B.O., Ortiz-Lopez, R., Palacios-Saucedo, G.C. and Rodriguez-Padilla, C.
 TITLE Genotype analysis of protease and reverse transcriptase genes on children with HIV-1 under structured treatment interruptions
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1028)
 AUTHORS Rivera-Morales, L.G., Vazquez-Guillen, J.M., Avila-Montanez, B.O., Ortiz-Lopez, R., Palacios-Saucedo, G.C. and Rodriguez-Padilla, C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-DEC-2009) Microbiologia e Inmunologia, Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragan s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico

LOCUS GU392036 1333 bp RNA linear VRL 25-JAN-2010
 DEFINITION HIV-1 isolate 09NLRT-02 from Mexico pol protein gene, partial cds.
 ACCESSION GU392036
 VERSION GU392036.1 GI:284155462
 KEYWORDS
 SOURCE Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)
 ORGANISM Human immunodeficiency virus 1
 Viruses; Retro-transcribing viruses; Retroviridae;
 Orthoretrovirinae; Lentivirus; Primate lentivirus group.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1333)
 AUTHORS Rivera-Morales, L.G., Vazquez-Guillen, J.M., Avila-Montanez, B.O., Ortiz-Lopez, R., Palacios-Saucedo, G.C. and Rodriguez-Padilla, C.
 TITLE Genotype analysis of protease and reverse transcriptase genes on children with HIV-1 under structured treatment interruptions
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1333)
 AUTHORS Rivera-Morales, L.G., Vazquez-Guillen, J.M., Avila-Montanez, B.O., Ortiz-Lopez, R., Palacios-Saucedo, G.C. and Rodriguez-Padilla, C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-DEC-2009) Microbiologia e Inmunologia, Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragan s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico