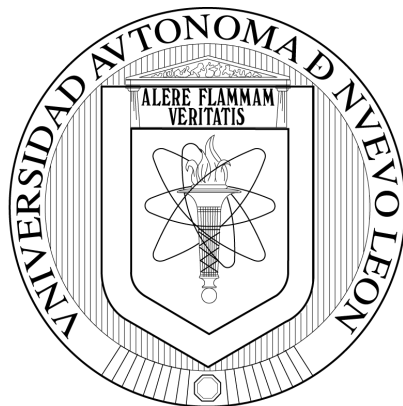


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MUTACIONES RELACIONADAS A RESISTENCIA ANTIRRETROVIRAL
IDENTIFICADAS POR SECUENCIACIÓN ULTRA-PROFUNDA EN LOS
REBOTES DE VIRUS AUTÓLOGOS GENERADOS POR INTERRUPCIONES
ESTRUCTURADAS DE TARAA EN NIÑOS CON SIDA

Por

JOSÉ MANUEL VÁZQUEZ GUILLÉN

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

Enero de 2014

MUTACIONES RELACIONADAS A RESISTENCIA ANTIRRETROVIRAL
IDENTIFICADAS POR SECUENCIACIÓN ULTRA-PROFUNDA EN LOS REBOTES
DE VIRUS AUTÓLOGOS GENERADOS POR INTERRUPCIONES
ESTRUCTURADAS DE TARA A EN NIÑOS CON SIDA

Comité de Tesis

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Directora

Dr. Pablo Zapata Benavides
Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Primer Vocal

Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo
Segundo Vocal

Dra. Rocío Ortiz López
Tercer Vocal

Dra. Laura Trejo Ávila
Suplente

DEDICATORIA

A mi hija Natalia Paola Vázquez Tristán. Pues representa la bendición mas grande que Dios me envía y en quién encuentro mi motivo y mi alegría.

A mis padres José Manuel Vázquez Juárez y Esperanza Guillén de Lara. Por su incansable amor, por creer en mí, por estar siempre conmigo.

A mis hermanas Jessica Esperanza y Pamela Ivette Vázquez Guillén. Por su gran cariño y comprensión.

A mis maestros Juan Manuel Adame Rodríguez y Lydia Guadalupe Rivera Morales. Por su confianza, por su amistad y por acompañarme en cada paso y decisión que he debido tomar.

A mis amigos de siempre Pbro. Rodolfo Antonio García Martínez, Gerardo Ramos Alfano y Mayra Alejandra Rodríguez Arriaga. Por su cariño y todos los grandiosos momentos compartidos.

A Roberto Carlos Vázquez Juárez[†] Gracias por los consejos de larga distancia.

A la Sra. María Zenaida Guillen[†] Por esa bendición que me acompaña siempre.

“La fe y la razón son como las dos alas con las cuales el espíritu humano se eleva hacia la contemplación de la verdad...”

S.S. Juan Pablo II

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de investigación fue financiado:

Por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del gobierno federal Mexicano (CONACYT) mediante el proyecto titulado: “Evaluación de un programa de interrupciones estructuradas de TARAA en ciclos de 4/12 semanas en niños con SIDA y carga viral crónicamente indetectable” SALUD-2006-01-44519 a cargo del Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo.

Por el apoyo brindado a la investigación científica de este trabajo por parte del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación fue desarrollado 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. Lydia Guadalupe Rivera Morales como Directora Interna y del Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo como Director Externo.

La Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación (UBMGyS) del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León con la Dra. Rocío Ortiz López como Asesora Externa.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	<i>i</i>
ÍNDICE DE TABLAS.....	<i>ii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	<i>iii</i>
NOMENCLATURA.....	<i>iv</i>
RESUMEN.....	<i>v</i>
ABSTRACT.....	<i>vi</i>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Marco histórico.....	2
2.2 Situación actual del VIH/SIDA.....	3
2.2.1 Situación mundial.....	3
2.2.2 Situación en México.....	4
2.3 Virus de Inmunodeficiencia Humana.....	6
2.3.1 Clasificación, estructura y genoma.....	6
2.3.2 Ciclo de replicación viral.....	9
2.3.3 Subtipo viral.....	10
2.4 Terapia antirretroviral y resistencia.....	10
2.5 Tratamiento antirretroviral en niños.....	13
2.6 Interrupciones estructuradas del tratamiento en el manejo de la infección.....	18
2.6.1 Beneficios y riesgos potenciales de las Interrupciones estructuradas...	18
2.6.2 Interrupciones estructuradas del TARAA en adultos.....	19
2.6.3 Interrupciones estructuradas del TARAA en niños.....	20
2.7 Teoría de <i>cuasiespecies</i> y su implicación en el tratamiento antirretroviral.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos particulares.....	23

4. HIPÓTESIS.....	24
5. MÉTODOS.....	25
5.1 Aspectos éticos.....	25
5.2 Características de los pacientes incluidos y del programa de IET.....	25
5.3 Evaluación de la respuesta clínica de los pacientes	26
5.4 Evaluación de la respuesta virológica a través de la medición de CV.....	27
5.5 Evaluación de la respuesta virológica a través del análisis genotípico.....	27
5.5.1 Preparación inicial de las muestras.....	28
5.5.2 Generación de amplicones y preparación de la librería.....	28
5.5.3 Análisis de secuencias.....	32
5.5.4 Definición de mutaciones de “baja abundancia” y de “alta abundancia”...	33
5.5.5 Interpretación genotípica de mutaciones asociadas con la resistencia....	33
6. RESULTADOS.....	35
6.1 características generales de los pacientes incluidos	35
6.2 Respuesta al programa de IET.....	36
6.3 Respuesta inmunológica mediante la evaluación de Linfocitos T	36
6.4 Evaluación de la respuesta virológica a través del análisis genotípico.....	38
6.4.1 Generación de amplicones y preparación de la librería.....	38
6.4.2 Análisis bioinformático de las lecturas obtenidas y estimación de mutaciones asociadas con la resistencia a antirretrovirales	39
7. DISCUSIÓN.....	41
8. CONCLUSIONES.....	47
9. LITERATURA CITADA.....	48
10. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	60

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, la Academia de Inmunología y todo el personal técnico y administrativo del Laboratorio de Inmunología y Virología por las facilidades proporcionadas para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Diana Reséndez Pérez** porque sin su apoyo me hubiera sido imposible la realización del doctorado.

A la **Dra. Lydia G. Rivera Morales** por la dirección académica y el apoyo incondicional para lograr este trabajo de tesis.

Al **Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo** de la UMAE No. 25 del IMSS por su invaluable colaboración, por todas sus aportaciones y observaciones en el desarrollo de éste trabajo.

A la **Dra. Rocío Ortiz López** del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud y la Facultad de Medicina de la UANL por las facilidades y asesoría brindada durante la realización de este proyecto.

Al **Dr. Pablo Zapata Benavides** y la **Dra. Laura Trejo Ávila** por sus apoyo, consejos y críticas siempre constructivas para éste proyecto.

Al **L.B.G. Ramsés Medina González** porque sin su colaboración hubiera sido imposible la realización del trabajo experimental de este proyecto.

Al **Dr. Roger Paredes** y el **Dr. Marc Noguera Julián** del Instituto de Investigación del SIDA IrsiCaixa del Hospital Germans Trias i Pujol en Barcelona, España por su amable colaboración en la interpretación bioinformática de los resultados obtenidos en éste proyecto.

Al **Dr. Paulo López Guillén** de la Unidad de Infectología “Dr. Juan I. Menchaca”. Hospital General Regional No. 45. Instituto Mexicano del Seguro Social, Jalisco, Mexico y al **Dr. Ricardo Vázquez Juárez** del Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste S.C. (CIBNOR) en La Paz, Baja California Sur por todos sus consejos y apoyo durante mi formación como estudiante de Doctorado.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL.

A **Kenia I. Sierra Moya**, **Saira B. Burciaga Bernal** y **Víctor H. Alemán García** por el apoyo brindado en la realización experimental de éste proyecto.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Población infectada por VIH-1 estimada para el 2012 según la ONUSIDA.....	3
2. Casos acumulados de SIDA por edad y sexo en México al 30 de septiembre de 2013.....	5
3. Casos notificados de SIDA según grupo de edad y categoría de transmisión en México al 30 de septiembre de 2013.....	5
4. Genes encontrados en el genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana y sus funciones más importantes.....	7
5. Drogas antirretrovirales actualmente disponibles en el mercado.....	11
6. Revisión 2009 de la Clasificación Pediátrica de la Infección por VIH de 1994 del CDC, EUA.....	15
7. Categorías inmunológicas de la enfermedad causada por el VIH en la edad pediátrica de acuerdo a la edad (CDC 1994).....	17
8. Clasificación clínico-inmunológica de la enfermedad por VIH en la edad pediátrica (CDC 1994).....	17
9. Riesgos y beneficios potenciales de las Interrupciones Estructuradas del Tratamiento Antirretroviral.....	19
10. Oligonucleótidos con adaptadores diseñados para amplificar las regiones superpuestas de la PR y los primeros 1,348 nucleótidos de la TR.....	29
11. Oligonucleótidos de fusión empleados para el etiquetado en la segunda amplificación.....	31
12. Características de los cuatro niños incluidos en el programa de IET	35
13. Carga viral y cuentas de linfocitos T CD4+ y CD8+ de los pacientes incluidos en el programa de IET.....	37
14. Interpretación genotípica de las mutaciones detectadas mediante SNG en los rebotes virológicos de las IET.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Organización del genoma del VIH-1.....	7
2. Estructura básica del Virus de Inmunodeficiencia Humana.	8
3. Ciclo de replicación del VIH-1.....	8
4. Representación del programa de interrupciones estructuradas del tratamiento.....	26
5. Estrategia de amplificación de las regiones superpuestas de la PR y los primeros 1,348 nucleótidos de la TR	29
6. Estrategia general para la generación de la librería de amplicones para la SNG	32
7. Amplificación de los fragmentos de la PR y TR etiquetados con los adaptadores universales A y B de uno de los rebotes virológicos generados durante las fases sin medicamento del programa de IET.....	38

NOMENCLATURA

A	Adenina
ADNss	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARV	Antirretroviral
C	Citocina
CDC	Centros de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
EUA	Estados Unidos de América
IF	Inhibidor de la fusión (<i>Fusion inhibitor</i>)
G	Guanina
gp	Glicoproteína
HTLV-III	Virus Linfotrópico de Células T Humanas tipo III
ICTV	Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
kb	Kilobase
LAV	Virus Asociado a Linfadenopatía
min	Minuto
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µg/µL	Microgramo por microlitro
µg/mL	Microgramo por mililitro
µL	Microlitro
nm	Nanómetro
IPR	Inhibidor de la proteasa (<i>protease inhibitor</i>)
ITRNN	Inhibidor de la transcriptasa reversa no-nucleósido (<i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>)
ITRN	Inhibidor de la transcriptasa reversa nucleósido (<i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PR	Proteasa
rpm	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
IET	Interrupción estructurada del Tratamiento (<i>Structured Treatment Interruptions</i>)
T	Timina
TARAA	Terapia Antirretroviral Altamente Activa (<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
Tm	Temperatura de alineamiento
TR	Transcriptasa en reversa
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VIH-1	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1
VIH-2	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 2

RESUMEN

La Terapia Antirretroviral Altamente Activa (TARAA) ha sido uno de los avances más significativos para el tratamiento de la infección por VIH sin embargo, los problemas que surgen durante su administración como la toxicidad crónica, la baja adherencia y sus costos son factores que contribuyen al fracaso del tratamiento y limitan su éxito a largo plazo. Recientemente, se ha propuesto la evaluación de interrupción estructurada del tratamiento (IET) como una estrategia terapéutica alternativa para reducir las complicaciones asociadas con la administración del TARAA continuo. Basadas en el establecimiento de períodos de tratamiento, seguidos por períodos libres de drogas durante el tiempo suficiente para permitir un rebote viral significativo pero con un mantenimiento controlado de la replicación viral, las IET puede inducir un aumento de la respuesta inmune específica contra el VIH y rebotes virales progresivamente menores en los momentos sin TARAA de las IET. Sin embargo, la información disponible sobre las IET en pacientes pediátricos es aún limitada, y dicha información en adultos es aun controversial. La emergencia de mutaciones asociadas con la resistencia a medicamentos sigue siendo un riesgo importante para las estrategia de IET y se sospecha que los bajos niveles séricos de fármacos antirretrovirales durante los rebotes virales pueden seleccionar variantes del VIH resistentes al tratamiento. Actualmente, los análisis genotípicos para la detección de mutaciones asociadas con la resistencia normalmente son realizados por secuenciación estándar, pero dada la gran cantidad de subpoblaciones del VIH-1 infectando a un mismo paciente complica la detección de mutaciones de resistencia en *cuasiespecies* que se presentan en baja abundancia en los pacientes. Subsecuentemente, *cuasiespecies* virales con de menos del 20 % de la población en un paciente, que presentan mutaciones asociadas a la resistencia pueden, bajo presión selectiva por los niveles sub-terapéuticos de la droga en las IET, convertirse en la población de virus mayoritaria y posteriormente conducir a una falla terapéutica. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de mutaciones asociadas con la resistencia a antrirretrovirales, tanto de baja abundancia y alta abundancia (≥ 20 % de *cuasiespecies* virales) por secuenciación ultra profunda en rebotes virales de pacientes pediátricos infectados por VIH - 1 que se sometieron a una programa de IET.

ABSTRACT

Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) has been one of the most significant advances for the treatment of HIV infection; however, problems that emerge during its administration, such as chronic toxicity, poor adherence and costs are factors contributing to treatment failure and limiting its long-term success. Recently, it has been proposed to evaluate Structured Treatment Interruption (STI) as an alternative therapeutic strategy to reduce complications associated with continuous HAART administration. Based on the establishment of periods on treatment followed by drug-free periods long enough to allow significant viral rebound but with a controlled maintenance of the viral replication, STI can induce an increase of HIV-specific immune response, and consequently progressively smaller viral rebounds. Otherwise, information available for STI in pediatric patients is still limited, and such information in adults is controversial. The emergence of drug-resistance remains as a major risk for the STI strategy and it is suspected that serum low levels of antiretroviral drugs during the viral rebounds could select for drug-resistant HIV variants. Genotypic mutations associated with drug resistance are usually detected by standard sequencing but the *quasispecies* nature of HIV-1 complicates the detection of low-abundance drug-resistant mutations (DRM's). Minority DRM's at levels <20% of the viral quasispecies population can outgrow under selective pressure by sub-therapeutic levels of drug, becoming the major virus population and subsequently leading to early therapy failure. Thus, the aim of this study was to evaluate the presence of both low-abundance and high-abundance ($\geq 20\%$ of viral quasispecies) DRM's by ultra-deep sequencing in viral rebounds of HIV-1-infected pediatric patients who underwent an STI program of HAART.

1. INTRODUCCIÓN

Con el advenimiento de la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) se ha logrado mejorar sustancialmente la calidad de vida de los pacientes, sin embargo, además del elevado costo, se han descrito diversos efectos adversos como toxicidad crónica, fallas en el apego e incluso del desarrollo de resistencia que limitan los beneficios del TARAA. Reportes previos en los cuales algunos pacientes han mejorado su estado inmunológico después de haber suspendido la terapia antirretroviral favorecen el concepto de Interrupciones Estructuradas del Tratamiento (IET) con gran cantidad de estudios desarrollados en adultos, pero con información limitada para niños. Un estudio previo en pacientes pediátricos demostró que los rebotes virales disminuyeron progresivamente después de cada interrupción lo cual puede resultar benéfico para el cuidado terapéutico de los pacientes. No obstante, es importante verificar la seguridad virológica de las IET debido a que es posible la inducción de mutaciones que confieran resistencia a los antirretrovirales a causa de los niveles sub-terapéuticos de las drogas al momento de suspender los fármacos. Actualmente, las tecnologías disponibles para la predicción de fenotipos a partir de la genotipificación viral ofrecen una herramienta de gran utilidad en el manejo de la terapia para cada paciente. En éste trabajo se analizaron las secuencias de la proteasa y la transcriptasa reversa en muestras de las etapas sin tratamiento de pacientes pediátricos incluidos en un programa de IET con la finalidad de evaluar si ocurre la inducción de mutaciones asociadas a la resistencia a los antirretrovirales después de cada suspensión del tratamiento. Aunque el número de muestras evaluadas es pequeño, los resultados encontrados sugieren que el programa de IET evaluado es virológicamente seguro en pacientes pediátricos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Marco histórico

En 1981 se publicaron los primeros casos de un nuevo síndrome que se presentaba de forma frecuente entre hombres homosexuales y/o bisexuales que se caracterizaba por el desarrollo de infecciones oportunistas y ciertos tipos de neoplasias como el Sarcoma de Kaposi; todo esto debido a una inmunodeficiencia grave e irreversible que afectaba principalmente a la inmunidad de tipo celular (Vidal-Lampurdanés y Pumarola-Suñe, 1996). Para 1982, este síndrome fue denominado por el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC) de Estados Unidos de América (EUA) como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Morison, 2001).

Posteriormente, 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, Virus Linfotrópico de Células T Humanas tipo III (HTLV-III) y Virus Asociado al SIDA obtenidos por el grupo de Robert Gallo en el Instituto Nacional de Salud de EUA y Jay Levy de la Universidad de California en EUA respectivamente (Gallo y Montagnier, 1988). Estudios del genoma de los tres aislados antes mencionados determinaron que, si bien presentaban ciertas diferencias, se trataba de variantes de un mismo virus cuya asociación al SIDA quedó demostrada por seroepidemiología.

A mediados de 1986 el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV) de la Sociedad Internacional de Microbiología acordó denominar Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) al agente etiológico del SIDA 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 y Pumarola-Suñe, 1996).

Desde que el programa de vigilancia epidemiológica del SIDA fue iniciado en EUA para 1981 y hasta el 31 de diciembre de 1985, el CDC había reportado más de 20,000 casos. De éstos, 307 correspondían a niños menores de 13 años de edad. También se sabía que los dos factores de riesgo principales para el contagio en menores eran (1) ser hijo de una mujer infectada y (2) recibir transfusiones u otros productos sanguíneos. El pronóstico para un niño con SIDA era definido como pobre y más aún, para los menores de 1 año de edad el tiempo de sobrevivencia tras el diagnóstico era mucho menor (Rogers *et al.*, 1987).

2.2 Situación actual de la epidemia del VIH/SIDA

2.2.1 Situación mundial

Para el 2012 la epidemia cobró la vida alrededor de 1.6 millones de personas y se estima que 2.3 millones fueron infectados por el VIH, con lo que la cifra de personas afectadas con el virus en todo el mundo llegó a 35.3 millones. En conjunto, África Subsahariana alberga al 67% de las personas que viven con el VIH. Siendo África Subsahariana la región más afectada con 25.0 millones, la epidemia también se ha expandido con gran fuerza en el resto del mundo. En la Tabla 1 se resumen las cifras estimadas a nivel mundial por región geográfica (ONUSIDA, 2013).

Zona geográfica	Población Infectada
Oceanía	51,000
Región Caribe de América	250,000
África del Norte y Oriente Medio	260,000
Europa Oriental y Asia Central	1,300,000
América Latina	1,500,000
América del Norte, Europa Occidental y Central	2,160,000
Asia (Este y Sur)	4,780,000
África Subsahariana	25,000,000

Fuente: ONUSIDA 2013

Tabla 1. Población infectada por VIH-1 estimada para el 2012 según la ONUSIDA.

Con respecto a la infección por VIH en niños, se ha estimado que sólo en el 2012 ocurrieron 260 000 nuevas infecciones en menores de 15 años con lo que el número de niños con el VIH alcanzó los 3.3 millones a nivel mundial y de éstos, alrededor del 87.8% vivían en África Subsahariana. Además, para el 2012 se estima que ocurrieron alrededor de 210 000 defunciones por el SIDA. 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. Sólo una pequeña fracción de las infecciones en menores son el resultado de agujas contaminadas, transfusión de sangre o productos sanguíneos infectados, abuso sexual o relaciones sexuales. En los países más afectados, el VIH es la razón subyacente de más de un tercio de todos los fallecimientos de niños menores de cinco años. De hecho, sin tratamiento antirretroviral, el avance de la infección por el virus en niños es particularmente agresivo y muchos de ellos fallecen a temprana edad (ONUSIDA 2013).

2.2.2 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 (Trujillo *et al.*, 2001). Se puede decir que el comportamiento de la epidemia es idéntico al de los países industrializados de occidente (Rivera-Morales *et al.*, 2001). Desde el inicio de la epidemia, en 1983 y hasta el 30 de septiembre del año 2012, se han registrado de manera acumulada 166, 370 casos de SIDA y se calcula que existen hasta 170, 000 personas viviendo infectadas por este virus (CENSIDA, 2013).

México se ha considerado un país cuya epidemia se concentra en el grupo de transmisión sexual con el 92.5% de los casos acumulados, donde la categoría heterosexual a llegado a ocupar el 46.6% en el total de los casos acumulados mientras que la población de homosexuales infectados alcanzó un equivalente al 47.3% hasta septiembre de 2012 (CENSIDA, 2009).

Respecto a la clasificación por sexo, se ha establecido que el 82.1% equivalente a 136, 570 corresponde a hombres mientras que el 17.9% lo representan 29, 800 mujeres del

total de los infectados hasta el septiembre de 2013 (Tabla 2). También es importante destacar que un total de 141, 696 personas, las cuales ocupan el 85.2% de los casos acumulados, se encuentran en edades laboralmente productivas que incluyen desde los 15 hasta 44 años de edad. Por otra parte, la infección infantil se presenta mayoritariamente de forma vertical, ya sea durante o después del parto (Tabla 3) (CENSIDA, 2013).

Grupo de Edad	Hombres		Mujeres	
	Casos	%	Casos	%
0 - 14	1,928	1.4	1,705	5.7
15 - 29	39,711	29.1	9,703	32.6
30 - 44	66,661	48.9	12,515	42.0
≥ 45	27,394	20.0	5,738	19.2
Ignorado	876	0.6	139	0.5
Total	136,570	100	29,800	100

Fuente: SS/DGE. Registro Nacional de Casos de SIDA.

Tabla 2. Casos acumulados de SIDA por edad y sexo en México al 30 de septiembre de 2013.

Grupo de edad	Categoría de transmisión							
	Sexual		Sanguínea*		UDI		Perinatal	
	Acumulados	2013	Acumulados	2013	Acumulados	2013	Acumulados	2013
< 1	0	0	7	0	0	0	781	8
1 - 4	11	0	51	0	0	0	1,065	11
5 - 9	17	0	83	0	0	0	434	4
10 - 14	86	4	93	0	2	0	134	2

*Incluye casos pos-transfusionales y exposición ocupacional. Fuente: SS/DGE. Registro Nacional de Casos de SIDA.

Tabla 3. Casos notificados de SIDA según grupo de edad y categoría de transmisión en México al 30 de septiembre de 2013.

2.3 Virus de Inmunodeficiencia Humana

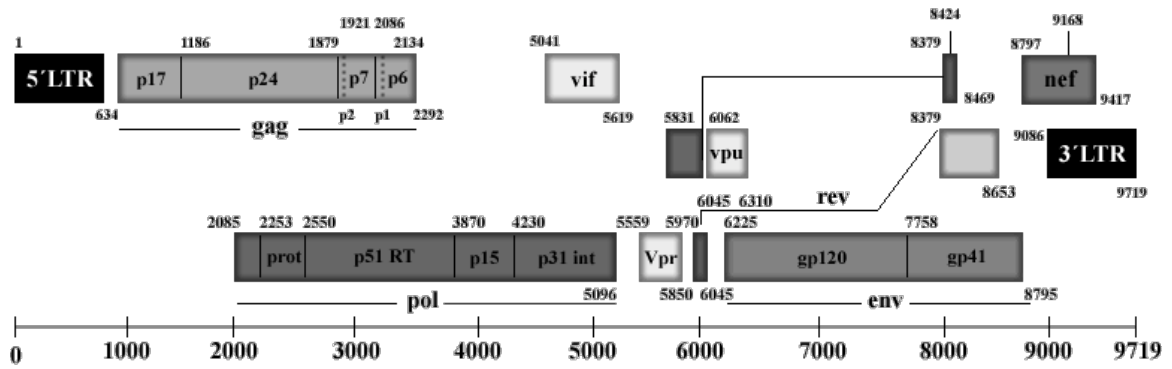
2.3.1 Clasificación, estructura y genoma

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-Suñe, 1996).

Estructuralmente, la partícula vírica cuyo tamaño oscila entre 80-110 nm incluye dos copias de genoma de ARN de aproximadamente 9.7 kb de largo, monocatenario de polaridad positiva. La organización genómica del VIH-1 es similar a la de otros retrovirus, incluyendo los genes que codifican para su estructura y proteínas enzimáticas *gag*, *pol* y *env* flanqueadas dos regiones *LTR* (*Long Terminal Repeat*) (Figura 2).

El genoma vírico se encuentra recubierto de una cápside proteica de simetría icosaédrica constituidas 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 2) (Preston *et al.*, 1988).

El genoma del *VIH-1* contiene otros genes además de los estructurales 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 4) (Vidal-Lampurdanés y Pumarola-Suñe, 1996).



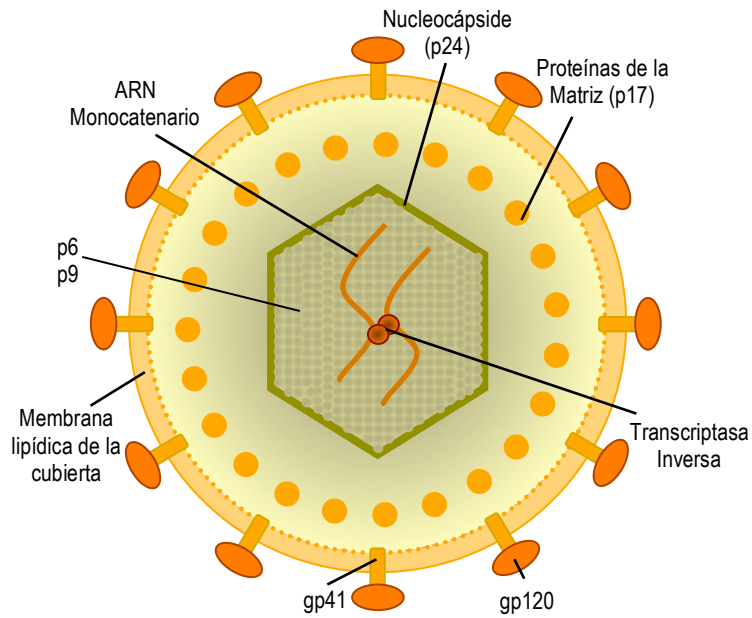
Fuente: NCBI Retrovirus Genomes Resource

Figura 1. Organización del genoma del VIH-1

GEN	PROTEÍNA	FUNCIÓN
<i>env</i>	gp160	Precursor
	gp120	Proteína de la envoltura
	gp41	Interacción con receptores y correceptores y fusión de membranas
	p55	Precursor
<i>gag</i>	p24	Proteína de la nucleocápside
	p17	Proteína de la matriz
	p9 p6	Ribonucleoproteínas asociadas al ARN viral
<i>pol</i>	Transcriptasa Inversa	Retrotranscripción del genoma viral con actividad ARNasa
	Integrasa	Integración del genoma viral retrotranscrito
	Proteasa	Prosesamiento de las 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

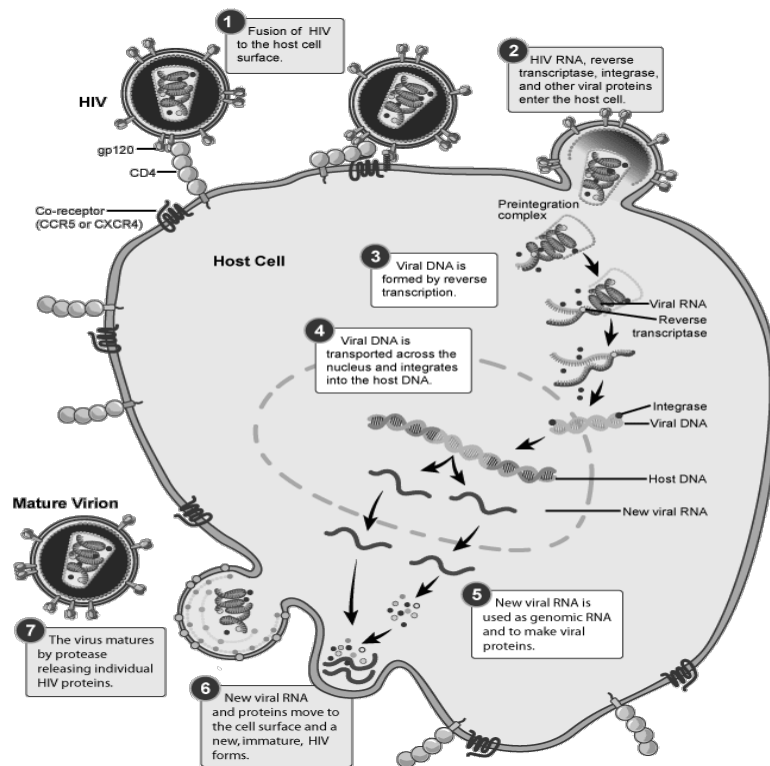
Vidal-Lampurdanés y Pumarola-Suñe, 1996

Tabla 4. Genes encontrados en el genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana y sus funciones más importantes.



National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID); EUA. <http://www.niaid.nih.gov/>

Figura 2. Estructura básica del Virus de Inmunodeficiencia Humana.



National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID); EUA. <http://www.niaid.nih.gov/>

Figura 3. Ciclo de replicación del VIH-1.

2.3.2 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. Ésta 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 y libera el ARN viral en conjunto con los componentes del virus (transcriptasa reversa, integrasa y proteasa) dentro del citoplasma de la célula (Figura 3) (Kuhmann *et al.*, 2000).

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 incorpora el ADN viral 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. En ARN viral es transportado hacia el citoplasma celular, para ser traducido a proteínas en el ribosoma celular. Una vez que el precursor proteico viral se ha transcrito completamente, la enzima viral proteasa lo corta en proteínas funcionales de menor tamaño. De esta manera, se producen y se ensamblan todos los componentes necesarios para la replicación del VIH (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 (Kuhmann *et al.*, 2000).

2.3.3 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 expandido ampliamente en el mundo, siendo el responsable de la pandemia global mientras que el tipo 2 se encuentra restringido a ciertas regiones de África.

Así mismo, el VIH-1 exhibe extensas variaciones genéticas 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 nombrándose 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, la prevalencia del subtipo B proveniente del grupo M del VIH-1 ha sido demostrada en diversos estudios epidemiológicos (Rivera-Morales *et al.*, 2001).

2.4 Terapia antirretroviral y resistencia

Las drogas actualmente empleadas para el tratamiento de la infección por VIH-1 pertenecen a cuatro distintas clases: (1) inhibidores de la TR análogos de nucleósidos o de nucleótidos (ITRN), los cuales 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; (2) inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos (ITRNN), que se unen directamente a la transcriptasa reversa viral e inhiben su función; (3) inhibidores de la proteasa (IPR), son dirigidos a la enzima proteasa involucrada en los procesos de ensamblaje final de los viriones; y por último, (4) inhibidores de fusión (IF), los cuales bloquean la entrada del virus en la célula blanco (Tabla 5) (Clavel y Hance, 2004).

Nombre del Medicamento	Nombre Comercial	Nombre Alterno	Compañía farmacéutica*
Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Nucleósidos (ITRN)			
Abacavir	Ziagen	ABC	GSK
Didanosina	Videx	ddI	BMS
Emtricitabina	Emtriva	FTC	Gilead
Lamivudina	Epivir	3TC	GSK
Stavudina	Zerit	d4T	BMS
Tenofovir**	Viread	TDF, PMPA	Gilead
Zalcitabina	HIVID	ddC	Roche
Zidovudina	Retrovir	AZT, ZDV	GSK
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 (IPR)			
Amprenavir (descontinuado)	Agenerase		GSK
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 (FI)			
Enfuvirtida	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
Zidovudina + 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			
Lamivudine + Zidovudine	Duovir	3TC/ZDV	Cipla
Nevirapine + Lamivudine + Zidovudine	Duovir-N	NVP/3TC/ZDV	Cipla
Nevirapine + Lamivudine + Stavudine	Triomune	NVP/3TC/d4T	Cipla

* GSK = GlaxoSmithKline; BMS = Bristol-Myers Squibb. ** Análogo de Nucleótido (Clavel y Hance, 2004)

Adaptado de HIV-Drug Resistance Database, Stanford University 2009

Tabla 5. Drogas antirretrovirales actualmente disponibles en el mercado.

En la actualidad se emplean combinaciones de drogas antirretrovirales para el tratamiento de la infección por VIH-1 que consisten en tres medicamentos; usualmente dos ITRN más un IPR o un ITRNN. Este tratamiento es denominado terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) (Shafer *et al.*, 2000).

La terapia combinada de drogas antirretrovirales o TARAA 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 resistencias. 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 y Hance, 2004).

Diversos mecanismos moleculares describen la resistencia a los antirretrovirales disponibles y es preciso entender el mecanismo de acción de cada droga.

Los ITRN 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 es el mejor ejemplo descrito de éste tipo de mutaciones (Clavel y 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 y limitando 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 y Hance, 2004).

La proteasa viral es un homodímero ensamblado de forma simétrica con una cavidad central de unión a sustrato. La estructura química de los IPR mimetizan los péptidos que generalmente son reconocidos por la proteasa. Estos compuestos 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 y Hance, 2004).

Finalmente, la entrada del virus en su 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 o gp41 parecen estar asociados a la resistencia al enfovurtide, único IF disponible actualmente (Clavel y Hance, 2004).

2.5 Tratamiento antirretroviral en niños

Desde sus inicios en la década de 80's, 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 relacionadas con la infección además de la prestación de cuidados paliativos. Posteriormente, los primeros estudios de monoterapia en niños en la década de los 90's demostraron beneficios clínicos e inmunológicos significativos; investigaciones posteriores demostraron además que el tratamiento combinado (inicialmente tratamiento doble con ITRN) dio lugar a mejores resultados clínicos, inmunológicos y virológicos (Resino *et al.*, 2006). Actualmente, se recomiendan esquemas de combinación triple cuyos regímenes se han asociado con una mayor supervivencia, reducción de infecciones oportunistas y otras complicaciones de la infección por el VIH, la mejora del crecimiento y la función neurocognitiva, y una mejor calidad de vida de los niños (de Martino *et al.*, 2000; Resino *et al.*, 2001).

Por otro lado, el desarrollo de virus resistentes a antirretrovirales es posible tanto en niños con dosis previas de antirretrovirales como en aquellos que recibieron un régimen inicial con uno o dos medicamentos que sólo suprimieron la replicación viral de forma incompleta. Además, también es factible observar resistencia en niños sin tratamiento previo que han sido infectados de su madre a pesar de la profilaxis antirretroviral (Cohan *et al.*, 2005). Por lo tanto, las decisiones sobre cuándo comenzar la terapia y qué medicamentos elegir en los niños no tratados previamente y en la elección de tratamiento antirretroviral de niños ya tratados siguen siendo complejos. 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 formulación de guías, 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.

Hasta hace algunos años se iniciaba tratamiento antirretroviral en todo niño en el que se establecía el diagnóstico de infección por VIH independientemente (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 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 1994) (Tablas 6, 7, y 8).

Categoría N: No sintomáticos

No presentan síntomas relacionados con la infección por el VIH o aquellos que solamente presentan una condición enlistada en la categoría A

Categoría A: Ligeramente Sintomáticos

Aquellos que presentan dos o más condiciones aquí enlistadas pero ninguna de la Categoría B y C.

- Linfadenopatía
- Hepatomegalia
- Esplenomegalia
- Dermatitis
- Parotiditis
- Infección recurrente de vías respiratorias altas, sinusitis u otitis media

Categoría B: Moderadamente Sintomáticos

Aquellos que presentan condiciones sintomáticas diferentes a las presentadas en la categoría A o C y que son atribuibles a la infección por VIH.

- Anemia (<8 g/dl), neutropenia (<1.000 células/mm³) o trombocitopenia (<100.000 células/mm³) 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 más de un dermatoma.
- leiomiosarcoma
- Neumonía intersticial linfoide (LIP) o complejo de hiperplasia linfoide pulmonar
- Nefropatía
- Nocardiosis
- Fiebre prolongada por más de un mes
- Toxoplasmosis antes del primer mes de edad
- Varicela

Tabla 6. Revisión 2009 de la Clasificación Pediátrica de la Infección por VIH de 1994 del CDC, EUA.

Categoría C: Severamente Sintomáticos

Niños que presentan cualquier condición aquí enlistada.

- 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 más 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 más 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 jirovecii* (*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 6. Continuación. Revisión 2009 de la Clasificación Pediátrica de la Infección por VIH de 1994 del CDC, EUA.

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 7. Categorías inmunológicas de la enfermedad causada por el VIH en la edad pediátrica de acuerdo a la edad (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

Tabla 8. Clasificación clínico-inmunológica de la enfermedad por VIH en la edad pediátrica (CDC 1994).

2.6 Interrupciones estructuradas del tratamiento en el manejo de la infección

Algunos reportes en los que algunos pacientes han fortalecido su sistema inmunológico después de haber discontinuado su tratamiento antirretroviral iniciaron el concepto de interrupciones estructuradas del tratamiento (IET) como una herramienta capaz de reducir las limitaciones de la terapia (Aiuti y Giovannetti, 2003). En efecto, algunos investigadores señalan que la terapia antirretroviral, a menudo extenuante para el paciente, puede ser suspendida durante varias semanas sin causar daños sin embargo, no está claro si los pacientes y / o el médico deben considerar las IET como una opción terapéutica. (Lori *et al.*, 2000).

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 a fallas en el apego resultan ser importantes limitaciones para su efectividad y es generalmente aceptado que las IET pueden reducir notablemente estas limitaciones (Deeks *et al.*, 2001). No obstante la gran cantidad de información disponible, la gran mayoría de los estudios están centrados en pacientes adultos y siguen siendo aún controversiales (Palacios *et al.*, 2009).

2.6.1 Beneficios y riesgos potenciales de las interrupciones estructuradas

Las IET consisten de etapas sin TARAA bajo una planeación cuidadosa y un seguimiento inmunológico, virológico y clínico estrechos. Se han reconocido posibles riesgos y beneficios de esta estrategia de tratamiento (Tabla 9). Entre su 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 vs. 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 *cuasiespecies* 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).

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
	Reducción en los costos del tratamiento.

Tabla 9. Riesgos y beneficios potenciales de las interrupciones estructuradas del tratamiento antirretroviral.

2.6.2 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).

2.6.3 Interrupciones estructuradas de TARAA en niños

Con dos excepciones, 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 vs. 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.

2.7 Teoría de *cuasiespecies* y su implicación en el tratamiento antirretroviral

Muchos virus, en particular aquellos con genoma de ARN o ADN de cadena sencilla, muestran una marcada variabilidad genética y gracias a aspectos como: (1) las altas tasas de mutaciones en el genoma viral, (2) sus períodos de generación relativamente cortos, y (3) al gran tamaño de la población viral, una gran cantidad de variantes genéticas son producidas constantemente en un mismo hospedero (Beerenwinkel *et al.*, 2012). Dichas variantes son conocidas como *cuasiespecies* y están estrechamente relacionadas con aspectos como la patogénesis viral, progresión a la enfermedad así como la falla del tratamiento (Martínez *et al.*, 2012). En general, la gran diversidad genética en poblaciones virales es una ventaja para el virus ya que actúa como un mecanismo de escape evolutivos a eventos de presión selectiva. Así por ejemplo, mutaciones generadas en regiones blanco del tratamiento antirretroviral, en determinada subpoblación de *cuasiespecies*, pueden conducir a una adaptación de éstas y por consiguiente una falla terapéutica en el paciente infectado.

Por otra parte, se ha llegado a considerar las pruebas genotípicas de resistencia viral como una herramienta estándar en la práctica clínica de rutina con la finalidad de obtener un máxima supresión viral optimizando así el cuidado de los pacientes (Taylor *et al.*; 2009). Más aún, se recomienda realizar pruebas de resistencia al momento que la infección por VIH-1 es diagnosticada como parte del inicio de los cuidados del paciente (Hirsch *et al.*, 2008). En éste sentido, la genotipificación estándar mediante secuenciación con los terminadores de Sanger tiene la capacidad de determinar sólo una secuencia consenso a partir de una mezcla de *cuasiespecies* virales y las mutaciones sólo son

detectadas si están presentes en una frecuencia superior al 20% del total de dichas subpoblaciones. Con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (SNG), también llamadas secuenciación masiva o secuenciación ultra profunda, se ha logrado superar ésta limitación. Las tecnologías de SNG pueden ser empleadas para analizar muestras genéticas heterogéneas con gran detalle. La gran cobertura lograda por éstos métodos posibilita la detección mutaciones en *cuasiespecies* virales que se encuentran en baja abundancia en una población viral (Zagordi *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar si por secuenciación ultra-profunda se identifican mutaciones relacionadas a resistencia antirretroviral en los rebotes de virus autólogos generados por interrupciones estructuradas de TARAA en niños con SIDA.

3.2 Objetivos particulares

1. Estandarizar la metodología de secuenciación ultra-profunda para la identificación de mutaciones en los segmentos de la PR y TR del gen *pol* del VIH-1 en poblaciones de alta y baja abundancia.
2. Evaluar la respuesta virológica medida a través de la magnitud de los rebotes virológicos de un programa de interrupciones estructuradas de TARAA en una muestra de niños con infección crónica controlada por VIH-1.
3. Identificar mutaciones asociadas a resistencia a antirretrovirales en subpoblaciones virales de baja y alta abundancia durante los rebotes de virus autólogos generados por las interrupciones estructuradas del tratamiento.

4. HIPÓTESIS

Por secuenciación ultra-profunda es posible identificar mutaciones relacionadas a resistencia antirretroviral en los rebotes de virus autólogos generados por interrupciones estructuradas de TARAA en niños con SIDA.

5. MÉTODOS

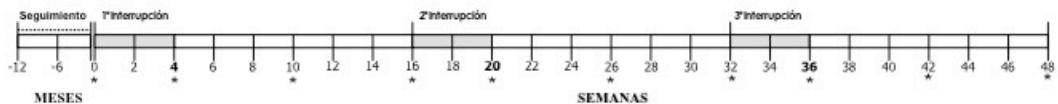
5.1 Aspectos éticos

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 así como los lineamientos estipulados en la NORMA Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. A la persona considerada legalmente responsable de cada 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.

5.2 Características generales de los pacientes incluidos y del programa de IET

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. Se les dio seguimiento clínico a 6 niños para asegurar el cumplimiento de los criterios de inclusión durante 12 meses y que a continuación se describen: 1) carga viral por debajo de los límites de detección (<400 copias / mL); 2) sin supresión inmunológica de acuerdo al CDC, y 3) condición asintomática para el 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 seguido de 12 semanas bajo tratamiento hasta completar tres ciclos de interrupción / reinicio. En la figura No. 4 se esquematiza la estrategia aplicada en el programa de IET y los momentos en los cuales fueron tomadas las muestras para cada

una de las mediciones. No se presentó variación en el tratamiento antirretroviral administrado en cada niño durante todo el estudio.



*Toma de muestra para las evaluaciones clínicas, inmunológicas y virológicas.

Figura 4. Representación del programa de interrupciones estructuradas del tratamiento.

5.3 Evaluación de la respuesta clínica de los pacientes

La evaluación de la respuesta clínica al programa de IET fue realizada por el Médico Infectólogo Pediatra responsable del seguimiento de los pacientes 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 (ver Tablas 6, 7, y 8). Además, en esos mismo momentos durante el seguimiento se evaluaron datos clínicos y paraclínicos de toxicidad medicamentosa, así como el apego al tratamiento.

Se obtuvieron de 1-2 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante (EDTA K₃) mediante procedimiento de flebotomía realizado término de cada interrupción y a las 6 y 12 semanas después de reiniciado el TARAA para realizar el conteo de linfocitos CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo estándar con el BD Simultest / IMK Lymphocyte Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Cada muestra se mantuvo a temperatura ambiente (20° a 25° C) y fue procesada dentro de las 6 horas inmediatas a su obtención. Antes de proceder con el protocolo de conteo, 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 fueron diluidas con solución fisiológica tamponada con fosfatos (PBS) y azida de sodio al 0.1%. Cuando las muestras tenían un recuento menor de 3.5×10^3 de leucocitos fue necesario obtener una muestra de sangre mayor.

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 (ver Tablas 6, 7, y 8).

5.4 Evaluación de la respuesta virológica a través de la medición de CV

Al término de cada interrupción y a las 6 y 12 semanas después de reiniciado el TARAA se obtuvieron, por punción venosa, de 3 a 5 mL de sangre periférica de cada paciente en tubos sin anticoagulante y se empleó el Cobas Amplicor HIV-1 Monitor test, versión 1.5 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, EUA) cuyo límite de detección es de 400 copias/mL para la determinación de la CV.

5.5 Evaluación de la respuesta virológica a través del análisis genotípico

Al final de cada período de interrupción de TARAA se colectaron 7-10 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante (EDTA K₃) y el plasma fue separado por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min y posteriormente almacenado a -80° C hasta su manipulación.

Para la realización del genotipado viral y posterior determinación de mutaciones se diseñó una estrategia para la generación de amplicones y su posterior etiquetado con oligos de fusión que finalmente fueron secuenciados empleando la plataforma de SNG del JS Junior Titanium Series (Roche, 454 Life Science Corp.; Branford, CT. E.U.A.).

5.5.1 Preparación inicial de las muestras

A partir de muestras de plasma colectadas al final de cada interrupción del TARAA (rebote virológico) se aisló el ARN viral empleando el MagMAX viral RNA Isolation Kit (Ambion, Foster City, CA, EUA) e inmediatamente fue retro-transcrito con oligonucleótidos hexaméricos aleatorios usando la enzima Super Script III First-Strand Synthesis System (Invitrogen; Carlsbad, CA. EUA). Una muestra de plasma adicional, de un paciente ajeno al programa de IET, fue incluida para ser usada como control de estandarización de las técnicas.

5.5.2 Generación de amplicones y preparación de la librería

A partir de la secuencia de referencia HXB2 (GenBank K03455.1) se diseñaron cinco pares de oligonucleótidos para amplificar regiones superpuestas de la PR y los primeros 1,348 nucleótidos de la TR (Figura 5). Cada oligonucleótido consistió de la Secuencia Universal 454, A o B, en su extremo 5' necesaria para el etiquetado de los amplicones de cada muestra, previo a la reacción de PCR en emulsión (emPCR), así como de la región complementaria con la secuencia del VIH-1 en el extremo 3' (Tabla 10). Las reacciones de amplificación fueron realizadas de forma independiente partiendo del ADNc de cada muestra utilizando la enzima Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen; Carlsbad, CA. EUA). Las temperaturas programadas en el termociclador fueron 94° C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94° por 15 seg, 54-58° C por 20 seg y 68° C por 1 min; adicionalmente se programó un periodo final de extensión de 68° C por 4 min. Previamente, se realizaron amplificaciones con gradientes de temperatura en la etapa de alineamiento de los oligonucleótidos para estandarizar el programa de amplificación para cada uno de los amplicones.

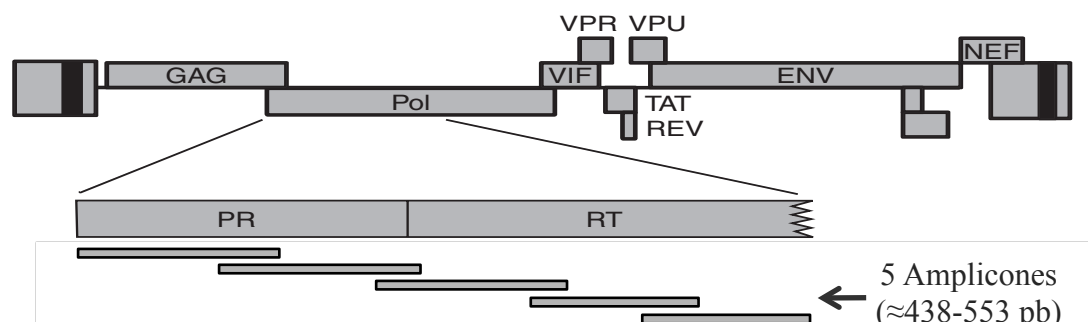


Figura 5. Estrategia de amplificación de las regiones superpuestas de la PR y los primeros 1,348 nucleótidos de la TR.

Amplicon	Nombre	UNIV-A / UNIV-B + Secuencia complementaria con la HXB2 ^a	Posición en HXB2	T _m (°C) ^b
1°	Par1F	GTAAAACGACGGCCAGcccaccagaagagagcttca	2160-2180	60.5
	Par1R	CAGGAAACAGCTATGACTttaacttttgggcatcca	2595-2615	60.3
2°	Par2F	GTAAAACGACGGCCAGtaggggggaattggaggtttt	2392-2412	59.6
	Par2R	CAGGAAACAGCTATGACTgcatcaccacatccagta	2872-2891	61.0
3°	Par3F	GTAAAACGACGGCCAGggcctgaaaatccatacaatac	2701-2722	57.5
	Par3R	CAGGAAACAGCTATGACgccctatttctaagtcatcacta	3115-3138	57.3
4°	Par4F	GTAAAACGACGGCCAGcacagggatggaaggatca	2998-3017	60.9
	Par4R	CAGGAAACAGCTATGACTgccccctgctctgtatttc	3531-3550	60.2
5°	Par5F	GTAAAACGACGGCCAGtccttagaggaaccaagca	3394-3413	57.5
	Par5R	CAGGAAACAGCTATGACcctgttagctgcccctct	3875-3893	60.2

^aEn letras mayúsculas se indica la secuencia correspondiente a los Adaptadores Universales A/B de Roche. (454 Life Sciences Corp. Roche; Branford, CT. E.U.A.).

^bLa T_m indicada corresponde solamente a la región complementaria con la secuencia de referencia HXB2.

Tabla 10. Oligonucleótidos con adaptadores diseñados para amplificar las regiones superpuestas de la PR y los primeros 1,348 nucleótidos de la TR.

Todos los amplicones fueron analizados mediante chips Agilent DNA 12 000 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara California, EUA) para evaluar su concentración aproximada, su tamaño, así como su pureza y se prepararon mezclas equimolares de los cinco amplicones correspondientes a cada muestra de la interrupción del TARA en los pacientes. Posteriormente, para la eliminación de dímeros de oligonucleótidos, se empleó el equipo Pippin Prep (Sage Science, Beverly, MA, EUA) con geles de agarosa al 2% y se recuperaron por electroelución los fragmentos de más de 400 pb. A continuación se purificó el material recuperado con 1.8 volúmenes de Agentcort AMPure XP (Beckman Coulter, Beverly, MA, EUA) y las mezclas de amplicones purificados fueron evaluadas con chips de Agilent DNA 12 000.

Cada mezcla de amplicones fue procesada en una segunda reacción de amplificación para añadir los oligonucleótidos de fusión que contenían la secuencia Adaptador 454 de Roche, las etiquetas de identificación múltiple (MID) tanto en el oligonucleótido sentido como en el anti-sentido, y la Secuencia Universal 454 A o B en su extremo 3 (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, EUA) (Tabla 11). Las temperaturas programadas en el termociclador fueron 94° C por 1 min y 6 ciclos de 94° C por 30 seg, 55° C por 30 seg y 68° C por 1 min con extensión final a 68° C durante 2 min.

Los productos obtenidos de la segunda amplificación, que contenían los cinco amplicones etiquetados de cada muestra, fueron purificados con 1.8 volúmenes de Agentcort AMPure XP, evaluadas con chips de Agilent DNA 12 000 y cuantificadas empleando el Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen).

Finalmente, se realizó una mezcla equimolar de los productos obtenidos para generar una librería de amplicones etiquetados con una concentración de almacenamiento de 1×10^9 moléculas/ μ L y una dilución de trabajo a 1×10^7 moléculas/ μ L (Figura 6).

Para la emPCR se utilizó una relación de 0.66:1 moléculas de librería y perlas de captura siguiendo el protocolo emPCR Lib-A de Roche (454 Life Sciences Roche Company, Branford, EUA). Las perlas de captura de ADN enriquecidas fueron secuenciadas en el equipo GS Junior Titanium Series (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Etiqueta de Identificación Múltiple (MID)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia completa (5' > 3')			
		Adaptador A / B	Llave	MID	Univ-A / Univ-B
1 GS-MID01	Adapter-MID01-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	acgagtgcgt	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID01-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	acgagtgcgt	caggaaacagctatgac
2 GS-MID02	Adapter-MID02-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	acgctcgaca	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID02-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	acgctcgaca	caggaaacagctatgac
3 GS-MID03	Adapter-MID03-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	agacgcactc	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID03-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	agacgcactc	caggaaacagctatgac
4 GS-MID04	Adapter-MID04-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	agcactgtag	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID04-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	agcactgtag	caggaaacagctatgac
5 GS-MID05	Adapter-MID05-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	atcagacacg	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID05-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	atcagacacg	caggaaacagctatgac
6 GS-MID06	Adapter-MID06-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	atatcgcgag	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID06-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	atatcgcgag	caggaaacagctatgac
7 GS-MID07	Adapter-MID07-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	cgtgtctcta	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID07-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	cgtgtctcta	caggaaacagctatgac
8 GS-MID08	Adapter-MID08-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	ctcgcgtgtc	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID08-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	ctcgcgtgtc	caggaaacagctatgac
9 GS-MID09	Adapter-MID09-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	tagtatcagc	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID09-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	tagtatcagc	caggaaacagctatgac
10 GS-MID10	Adapter-MID10-U-F	cgtatgcctccctcgcgcca	tcag	tctctatgcg	gtaaacgacggccag
	Adapter-MID10-U-R	ctatgcgcttcccagcccgc	tcag	tctctatgcg	caggaaacagctatgac

454 Life Sciences Corp. Roche; Branford, E.U.A.

Tabla 11. Oligonucleótidos de fusión empleados para el etiquetado en la segunda amplificación.

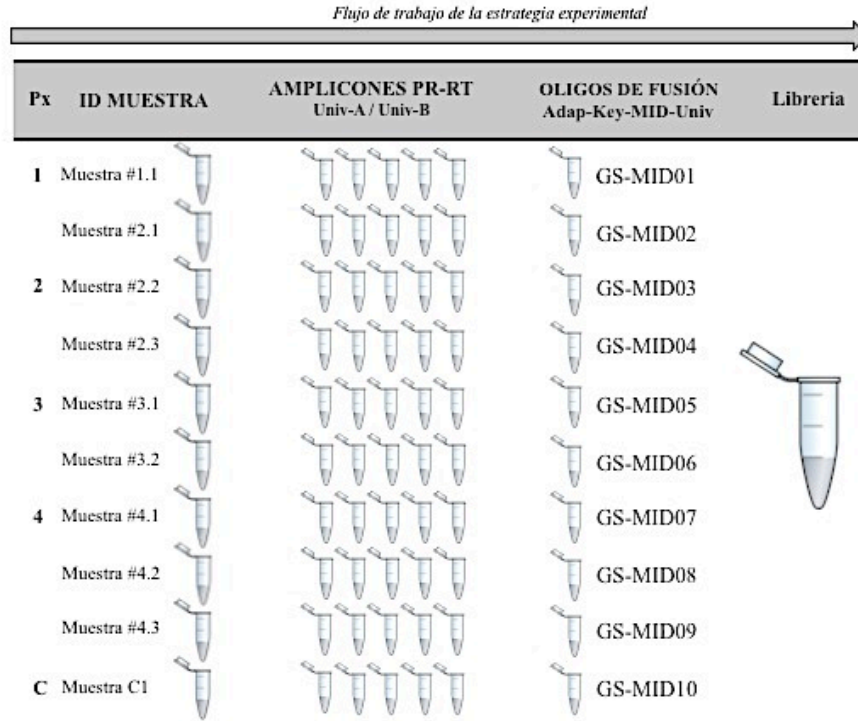


Figura 6. Estrategia general para la generación de la librería de amplicones para la SNG.

5.5.3 Análisis de secuencias

Las lecturas obtenidas fueron analizadas empleando modulo de análisis Amplicon Variant Analyzer (AVA, Roche Diagnostics Corporation v 2.8.0). Las secuencias fueron desmultiplexadas utilizando las etiquetas de identificación molecular (MID 5' o 3'); posteriormente, las variantes de resistencia fueron identificadas con base en la información del alineamiento consenso para cada muestra y éstas fueron comparadas con las mutaciones de resistencia a tratamiento reportadas por el HIVdb (13/09/2012). Para asegurar una probabilidad máxima de detección de mutaciones de baja abundancia se requirió de una cobertura mínima de 500 lecturas por posición. Sólo aquellas variantes que mostraron valores de frecuencia en lecturas sentido y antisentido dentro de una proporción de 1Log, y una frecuencia promedio mayor al 1.0 %, fueron consideradas variantes verdaderas y utilizadas en los análisis posteriores.

5.5.4 Definición de mutaciones de “baja abundancia” y de “alta abundancia”

Para propósitos de discusión, en el presente trabajo se denomina mutaciones de resistencia en “baja abundancia” a todas aquellas detectadas en menos del 20% de las subpoblaciones virales y mutaciones de Resistencia en “alta abundancia” a los cambios detectados en más del 20% de las variantes virales determinadas mediante SNG (Thuy Le, 2009).

5.5.5 Interpretación genotípica de mutaciones asociadas con la resistencia

El reporte de las mutaciones y su interpretación fue obtenido mediante análisis con el *HIV Drug Resistance Database* de la Universidad de Standford (HIVdb). El programa estima los niveles de resistencia a los Inhibidores de la Proteasa (IPR) o Inhibidores de la Transcriptasa Reversa (ITR) actualmente en uso basándose en las mutaciones encontradas en la secuencia analizada. Esta sección estima la susceptibilidad a drogas y designa 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*)

Las mutaciones en la PR son divididas en tres categorías:

- a) Mutaciones de Resistencia Mayor a Inhibidores de la Proteasa
- b) Mutaciones de Resistencia Menor a Inhibidores de la Proteasa
- c) Otras mutaciones

Las Mutaciones Mayores son definidas como mutaciones que por sí solas pueden inducir la susceptibilidad a uno o más IPR 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 recibirán 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 recibirán una puntuación sin embargo, si se presentan mutaciones inusuales importantes, éstas recibirán una puntuación indicándose como mutaciones inusuales en una posición importante.

Las mutaciones en la TR son divididas en tres categorías:

- a) Mutaciones de Resistencia a Inhibidores de la TR Nucleósidos (*NRTI-resistance mutations*).
- b) Mutaciones de Resistencia a Inhibidores de la TR No-Nucleósidos (*NNRTI-resistance mutations*).
- c) Otras mutaciones (*other mutations*).

6. RESULTADOS

6.1 Características generales de los pacientes incluidos

Se dio seguimiento a diez niños que contaron con CV indetectable, sin inmunosupresión y asintomáticos durante por lo menos 12 meses. De estos, cuatro pacientes fueron elegibles para ser incluidos en el grupo de estudio, tres del sexo masculino y una del femenino. La mediana de edad fue 13.9 años (con un rango de 6.5 – 15.7 años) y los cuatro niños adquirieron la infección del VIH por vía perinatal. Las categorías clínico-inmunológicas de estos niños fueron: A3 (n = 1), B2 (n = 1) y B3 (n = 2). Tres niños estaban en tratamiento antirretroviral con Zidovudina (AZT) + Lamivudina (3TC) + Ritonavir (RTV) y uno estaba recibiendo AZT + 3TC + Lopinavir reforzado con RTV (LPV/r) a las dosis pediátricas recomendadas (*Working Group on Antiretroviral Therapy*, 2008). 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) (Tabla 12).

	Paciente No. 1	Paciente No. 2	Paciente No. 3	Paciente No. 4
Edad (años)	15.7	13.9	6.5	15
Sexo	Masculino	Femenino	Masculino	Masculino
TARAA previo (meses)	RTV +AZT + 3TC (23)	RTV + AZT + 3TC (40)	RTV + AZT + 3TC (60)	--
TARAA ^a (meses)	Combivir + RTV (45)	Combivir + RTV (48)	Combivir + RTV (8)	Combivir + Kaletra (38)
Carga Viral	<400 copies/mL (<2.6 log ₁₀ /mL)	<400 copies/mL (<2.6 log ₁₀ /mL)	<400 copies/mL (<2.6 log ₁₀ /mL)	<400 copies/mL (<2.6 log ₁₀ /mL)
Categoría clínica ^b	A3	B3	B3	B2

^aAl ingreso al programa de IET.

^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.

Tabla 12. Características de los cuatro niños incluidos en el programa de IET

6.2 Respuesta al programa de IET

Dos de los cuatro niños no completaron el programa de IET. El paciente No. 1 fue apartado del programa a las 16 semanas de seguimiento, debido a que se observó una disminución en sus porcentajes de células T CD4+ a niveles de inmunosupresión grave (8.1%) y esta disminución continuó en estos niveles incluso a las 12 semanas después del reinicio del TARAA sin embargo, el seguimiento clínico de este paciente continuó en paralelo con los otros niños bajo IET. El paciente No. 3 fue retirado del estudio debido a problemas de adherencia al esquema de IET y, a petición de su tutor, por lo que este paciente tiene sólo datos correspondientes al primer y segundo rebote viral. No se presentaron sintomatologías relacionada con la infección por el VIH o eventos adversos relacionados con la terapia en ninguno de los pacientes.

6.3 Respuesta virológica mediante la medición de CV

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 en los cuatro pacientes fue de 80 900 copias/mL (mediana, límites 9 730 - 52 900) ó 4.90 log₁₀ (límites 3.98 - 5.72). 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. Con la segunda interrupción la CV incrementó a 88 800 copias/mL (mediana, límites 10 500 - 187 000) ó 4.94 log₁₀ (4.02 - 5.27), los cuales corresponden a rebotes virológicos de tres de los pacientes (No. 2, No. 3, y No. 4). Al final del tercer período de interrupción el rebote de la CV fue de 13 430 copias (2 660 - 24 200) ó 4.12 log₁₀ (3.42 - 4.38). Todos los rebotes virológicos fueron seguidos por una reducción de la CV a niveles indetectables durante los períodos con TARAA (Tabla 13).

Paciente	Tiempo de seguimiento											
	Meses			Semanas								
	-12	-6	0	4	10	16	20	26	32	36	42	48
	TARAA			IET ^b No. 1	TARAA		IET No. 2	TARAA		IET No. 3	TARAA	
No. 1												
CV ^a	<400	<400	<400	80700	<400	<400	<400	<400	<400	<400	<400	<400
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	4.91	<2.6	<2.6	<2.6	<2.6	<2.6	<2.6	<2.6	<2.6
CD4+ %	10%	11%	25%	8.09%	6.41%	12.20%	10.60%	10.60%	12.60%	10.60%	9.30%	11.20%
CD4+ (No.)	174	249	610	226	151	335	221	353	532	273	242	308
CD8+ (No.)	1377	NR	1694	1575	1068	1565	1247	1927	1569	1265	1596	1548
No. 2												
CV	<400	<400	<400	9730	<400	<400	10500	135	<400	2660	<400	<400
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	3.99	<2.6	<2.6	4.02	2.13	<2.6	3.43	<2.6	<2.6
CD4+ %	51%	56%	53%	43%	35.30%	46.60%	20.30%	30.40%	25.60%	22.50%	24.20%	28.10%
CD4+ (No.)	1157	1241	1255	412	719	749	361	895	807	465	549	791
CD8+ (No.)	1368	1778	1561	997	987	1586	840	1161	1419	819	905	1157
No. 3												
CV	<400	<400	<50	81100	728	1320	187000					
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	<2.6	4.91	2.86	5.27	3.12					
CD4+ %	23%	44%	22%	17%	27.80%	ND	25.80%					
CD4+ (No.)	1522	1209	727	818	798	ND	640					
CD8+ (No.)	4427	1277	1062	2010	1049	ND	851					
No. 4												
CV	<400	<400	<400	529000	723	<400	88800	<400	<400	24200	<400	<400
CV Log ₁₀	<2.6	<2.6	2.08	5.72	2.86	<2.6	4.29	<2.6	4.38	<2.6	<2.6	<2.6
CD4+ %	61%	NR	35%	4.86%	33.80%	14.30%	24.20%	14.30%	26.30%	30.40%	31%	23%
CD4+ (No.)	1022	923	560	147	723	345	536	345	478	493	528	473
CD8+ (No.)	611	616	523	2055	600	1566	571	1566	669	599	624	735

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

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

^bLas mediciones correspondientes a las IET fueron realizadas al final de cada período de 4 semanas sin tratamiento.

Las cuentas de linfocitos T se expresan en porcentaje de células CD4+ y el número absoluto de CD4+ y CD8+/μL.

Tabla 13. Carga viral y cuentas de linfocitos T CD4+ y CD8+ de los pacientes incluidos en el programa de IET.

6.4 Evaluación de la respuesta virológica a través del análisis genotípico

6.4.1 Generación de amplicones y preparación de la librería

Después de obtener el ARN viral y de haber sintetizado el ADNc, se amplificaron por medio del PCR convencional los 5 amplicones que cubrían la región de la PR y los primeros 1,348 nucleótidos de la TR. Se midieron las concentraciones de todos los ADNc generados empleando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, E.U.A) y todas las reacciones de PCR fueron ajustadas a 200 ng/ μ L para optimizar las reacciones de amplificación. Se obtuvieron los 5 amplicones etiquetados con las secuencias Universales A y B de secuenciación de todas las muestras correspondientes a los rebotes virológicos generados en los periodos sin TARAA de las IET (Figura 7).

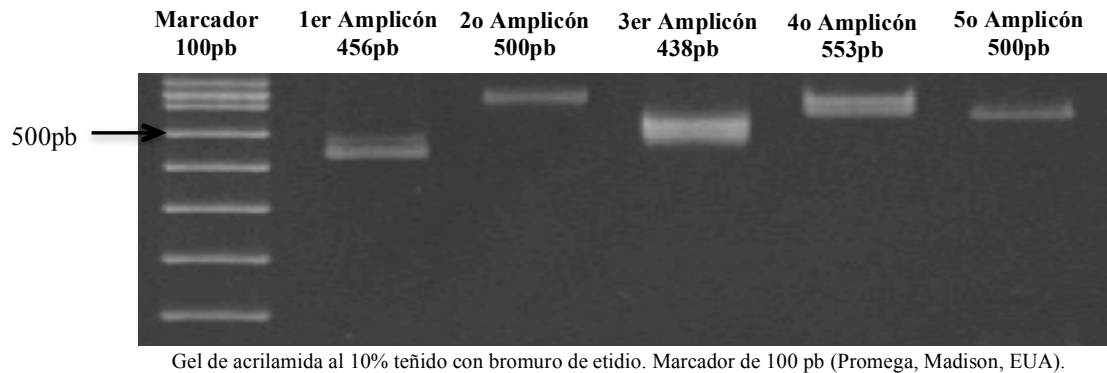


Figura 7. Amplificación de los fragmentos de la PR y TR etiquetados con los adaptadores universales A y B de uno de los rebotes virológicos generados durante las fases sin medicamento del programa de IET.

6.4.2 Análisis bioinformático de las lecturas obtenidas y estimación de mutaciones asociadas con la resistencia a antirretrovirales

Para el análisis bioinformático de las lecturas generadas por SNG se contó con el apoyo de investigadores del Instituto de Investigación del SIDA IrsiCaixa del Hospital Germans Trias i Pujol. Barcelona, España.

No se encontraron mutaciones de resistencia mayor o menor a los inhibidores de proteasa (IPR) y el análisis indica susceptibilidad a todos los IPR actualmente en uso clínico para los rebotes virológicos de los pacientes No. 1, 2, y 4, pero se detectó una mutación de resistencia menor a IPR en los dos rebotes de paciente No. 3 (A71V). La mayoría de las mutaciones en la región de la proteasa detectadas corresponden a mutaciones en subpoblaciones de alta abundancia ya que fueron detectadas con una frecuencia de cobertura promedio cercana al 100 % de las lecturas. La mutación V77I en el segundo rebote viral de paciente No. 3 se puede considerar como de baja abundancia, ya que se detectó en un 6 % de la frecuencia (Tabla 12).

Por otra parte, mutaciones asociadas con la resistencia a inhibidores de transcriptasa reversa nucleósidos (ITRN) o inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos (ITRNN) fueron encontradas en los pacientes No. 1, 2, y 4, pero ninguna de estas se encontró en el paciente No. 3.

Sólo la mutación A62V en el tercer rebote viral de paciente No. 4 se asocia a la resistencia a ITRN, todas las demás están relacionadas con resistencia a los ITRNN. La sustitución K103R en el rebote viral del paciente No. 1 y E138A en los tres rebotes virales del paciente No. 4 son consideradas como mutaciones de alta abundancia y las otras mutaciones detectadas pertenecen a mutaciones encontradas en baja abundancia (Tabla 14).

Paciente	IET	Clase	Mutación	Frecuencia	Interpretación
No. 1	1	IPR	I93L	1	Otras mutaciones
		IPR	V77I	1	Otras mutaciones
		IPR	L63P	0.999051683	Otras mutaciones
		ITRNN	K103R	0.9695962	Otras mutaciones
		ITRNN	V90I	0.025653207	Resistencia a ITRNN
		ITRNN	F227L	0.020604008	Resistencia ITRNN
No. 2	1	IPR	I93L	1	Otras mutaciones
		IPR	L63P	1	Otras mutaciones
		IPR	V77I	1	Otras mutaciones
		ITRNN	K101E	0.018551237	Resistencia a ITRNN
		ITRNN	K101E	0.018551237	Resistencia a ITRNN
	2	IPR	I93L	1	Otras mutaciones
		IPR	L63P	1	Otras mutaciones
		IPR	V77I	0.99936882	Otras mutaciones
		ITRNN	K101E	0.007348785	Resistencia a ITRNN
		ITRNN	K101E	0.007348785	Resistencia a ITRNN
	3	IPR	I93L	1	Otras mutaciones
		IPR	L63P	1	Otras mutaciones
		IPR	V77I	0.998981929	Otras mutaciones
		ITRNN	V108I	0.025956284	Resistencia a ITRNN
		ITRNN	K101E	0.010050251	Resistencia a ITRNN
No. 3	1	IPR	I93L	1	Otras mutaciones
		IPR	A71V	0.99907436	Resistencia Menor
	2	IPR	A71V	1	Resistencia Menor
		IPR	I93L	0.999427754	Otras mutaciones
		IPR	V77I	0.067525036	Otras mutaciones
No. 4	1	IPR	L63P	0.996884735	Otras mutaciones
		IPR	I64V	0.994548287	Otras mutaciones
		ITRNN	E138A	1	Resistencia a ITRNN
		ITRNN	V106I	0.237418363	Resistencia a ITRNN
		ITRNN	V90I	0.093737995	Resistencia a ITRNN
	2	IPR	I64V	1	Otras mutaciones
		IPR	L63P	0.993433149	Otras mutaciones
		ITRNN	E138A	1	Resistencia a ITRNN
		ITRNN	V90I	0.005925508	Resistencia a ITRNN
	3	IPR	L63P	1	Otras mutaciones
		IPR	I64V	0.973612148	Otras mutaciones
		ITRN	A62V	0.017153996	Resistencia a ITRN
		ITRNN	E138A	0.997233748	Resistencia a ITRNN
		ITRNN	V90I	0.145808967	Resistencia a ITRNN

^aFrecuencia de la mutación en el total de lecturas obtenidas mediante SNG.

^bInterpretación genotípica de las resistencias a antirretrovirales por el HIVdb.

Tabla 14. Interpretación genotípica de las mutaciones detectadas mediante SNG en los rebotes virológicos de las IET.

7. DISCUSIÓN

Los medicamentos antirretrovirales constituyen un avance significativo en el tratamiento de la infección por VIH; sin embargo, problemas que emergen durante su administración limitan su beneficio a largo plazo y un número creciente de pacientes interrumpen el tratamiento por períodos cortos o largos (Lori y Lisziewicz, 2001). En pacientes pediátricos, la carga del tratamiento crónico es la causa más común para la interrupción de su tratamiento; no obstante, otros efectos adversos como el desarrollo de problemas fisiológicos están involucrados directamente con el apego al tratamiento (Deeks *et al.*, 2001). De esta forma, una suspensión irregular del tratamiento antirretroviral regularmente conduce a un rápido rebote viral, lo cual a su vez puede conducir al desarrollo de resistencia a los antirretrovirales y a una eventual progresión de la enfermedad (Saitoh *et al.*, 2008). Es así como se propone a las IET como una alternativa al TARAA continuo, ya que tienen el potencial de reducir problemas de toxicidad crónica y de adherencia al tratamiento (Palacios-Saucedo *et al.*; 2009). Debido a que la progresión de la enfermedad por el VIH suele ser más rápida en niños que en adultos, no se ha demostrado de manera concluyente si las estrategias basadas en la interrupción del tratamiento también pueden funcionar en la población pediátrica y, por tanto, la información disponible en este tipo de pacientes es limitada (Monpoux *et al.*, 2004; Van Rompay *et al.*, 2006; Palacios *et al.*, 2009). En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación (Palacios *et al.*, IJID 2009), cuatro niños con infección por VIH-1 bajo control virológico fueron sometidos a un esquema de IET con la finalidad de evaluar su impacto virológico, inmunológico y clínico. El TARAA de cada niño fue interrumpido por 4 semanas seguido de 12 semanas bajo tratamiento hasta completar tres ciclos de interrupción/reinicio. En los cuatro pacientes se observaron rebotes virológicos progresivamente menores con un desarrollo vigoroso de células T CD8+ y una disminución inicial en la respuesta de células T cooperadoras seguida de un incremento posterior. En un segundo estudio, mediante un análisis genotípico estándar y empleando la base de datos *HIV Drug Resistance Database* de la Universidad de Stanford (HIVdb, Rhee *et al.*, 2003), se analizaron las secuencias que codifican para la proteasa y la

transcriptasa en reversa en muestras correspondientes a los rebotes virológicos de dos pacientes bajo IET, no encontrando resistencia a ninguno de los IPR o de los ITR disponibles en el mercado (Palacios *et al.*, Curr HIV Res 2011).

Teniendo en cuenta las limitaciones con respecto al número de pacientes analizados, los resultados de los trabajos anteriores permiten suponer que las IET en el esquema evaluado pudieran resultar seguras desde el punto de vista clínico, inmunológico y virológico; sin embargo, antes de sugerir nuevas investigaciones en distintas poblaciones de niños, es necesario considerar la gran heterogeneidad genética que se presenta en las subpoblaciones virales durante la infección por el VIH y poder evaluar la presencia o ausencia de mutaciones asociadas a resistencia antirretroviral aún en las poblaciones virales minoritarias que infectan al paciente, tal como se hizo en el presente estudio. En efecto, la propensión natural a errores de la TR, combinada con la alta actividad replicativa del virus resultan en la generación de variantes virales genéticamente relacionadas denominadas *cuasiespecies* con implicaciones importantes en la dinámica de la infección (Lauring AS y Andino R; 2010). Por otra parte, una de las mayores limitantes de los ensayos de genotipificación estándar es su incapacidad para detectar *cuasiespecies* que se presentan en menos del 20-25% de la población viral circulante en un paciente (Metzner KJ *et al.*, 2009). Dichas subpoblaciones en baja abundancia pueden llevar a mutaciones asociadas con resistencia a los antirretrovirales, y pueden desarrollarse rápidamente para convertirse en predominantes bajo condiciones de presión selectiva por drogas o dosis terapéuticas no adecuadas, lo que conduciría finalmente a falla terapéutica (O'meara *et al.*, 2001). Una alternativa para lograr identificar estas variantes minoritarias es el empleo de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (SNG) también conocidas como Secuenciación Ultra-profunda (Eriksson N *et al* 2008; Hezhao J *et al* 2010; Wang C *et al.*, 2007). Diversos estudios han sido publicados empleando SNG para la evaluación de resistencia a antirretrovirales en subpoblaciones de baja abundancia. Wang y colaboradores reportaron mutaciones en la PR y TR de variantes virales presentes a frecuencias menores a 3% (Wang C *et al* 2007). De igual forma Edskog y colaboradores lograron identificar mutaciones en la TR de variantes virales que constituían hasta un 0.05% de las *cuasiespecies* presentes en

pacientes bajo tratamiento (Hedskog C et al PlosOne 2010). También mediante pirosecuenciación, Hezhao y colaboradores analizaron mutaciones de la PR y los primeros 232 codones de la TR en poblaciones minoritarias (Hezhao J et al 2010). Todos los trabajos antes mencionados coinciden en destacar la posibilidad de detectar mutaciones asociadas con resistencia a antirretrovirales de diversas *cuasiespecies* virales, incluyendo las de baja abundancia, como la principal ventaja de la tecnología de la secuenciación ultra-profunda sobre el método tradicional de Sanger. En el presente trabajo se empleó secuenciación ultra-profunda con un diseño de amplicones cortos para evaluar la selección de mutaciones asociadas con resistencia a antirretrovirales durante los rebotes virológicos de las IET, para lo cual cuatro niños con CV crónicamente indetectable fueron incluidos en el programa de IET de 4 semanas con / 12 semanas sin TARAA.

Aunque no se identificaron mutaciones asociadas con resistencia a IPR, se encontraron otras mutaciones en la región de la proteasa. Las mutaciones I93L, V77I y L63P fueron las más comunes en los cuatro pacientes incluidos en este estudio. Éstas mutaciones fueron también las más frecuentes en el estudio previo empleando la genotipificación estándar para evaluar el efecto de las IET (Palacios-Saucedo 2011). Adicionalmente, otro estudio también reportó la presencia de estos cambios en pacientes vírgenes al tratamiento antirretroviral (Valle-Bahena et al; 2006). Dichas mutaciones no están asociadas con resistencia a antirretrovirales y la interpretación genotípica del HIVdb indica que la mutación L63P es un polimorfismo común en pacientes que reciben IPR, V77I es un polimorfismo común asociado con el tratamiento con Nelfinavir (NFV), y la mutación I93L es también un polimorfismo común asociado con el tratamiento con IPR en virus del subtipo B. Por otra parte, en los dos rebotes virológicos del paciente No. 3 se encontró en proporción de alta-abundancia a la mutación A71V la cual es interpretada como una mutación de resistencia menor a IPR; sin embargo, en el HIVdb se indica que los cambios A71T/V son polimorfismos que se producen en el 2 a 3% de las personas tratadas, que aumenta su frecuencia en personas que reciben IPR y que no están asociadas con la resistencia no obstante, los cambios A71I/L son mutaciones que se encuentran en virus con resistencia a IPR. Al comparar los rebotes virológicos en cada paciente que completó al menos dos ciclos de interrupción/reinicio (Pacientes 2, 3, y 4) se observó que

las sustituciones en la región de la proteasa fueron las mismas en cada rebote del paciente No. 2 y del paciente No. 4, por lo que en estos pacientes se puede afirmar que no se indujo la selección de nuevas mutaciones durante los periodos de interrupción/reinicio del TARAA. Sin embargo, en el segundo rebote del paciente No. 3 se detectó en “baja-abundancia” la mutación V77I, no presente en el primer rebote virológico. Como ya se ha mencionado antes, V77I es un polimorfismo comúnmente encontrado que no confiere resistencia a IPR. Por lo tanto, los resultados encontrados sugieren que los periodos de interrupción del TARAA durante las STI no inducen la selección de mutaciones asociadas a resistencia a los inhibidores de la proteasa.

Diversas mutaciones asociadas con resistencia a inhibidores de la transcriptasa reversa fueron encontradas en los rebotes de los pacientes 1, 2, y 4, pero ninguna fue detectada en los rebotes del paciente 3. Los cambios K103R en el paciente No. 1 y E138A en los tres rebotes virológicos del paciente No. 4 corresponden a las únicas mutaciones de alta-abundancia que fueron detectadas (>96% de las subpoblaciones). En el estudio previo con la secuenciación estándar, se encontró únicamente la mutación K103R en la región de la transcriptasa reversa (Palacios-Saucedo 2011). K103R es una mutación polimórfica que por sí misma no tiene efecto en la susceptibilidad a los ITRNN, pero en combinación con V179D reduce la susceptibilidad a Nevirapina (NVP) y Efavirens (EFV); sin embargo, esta última mutación no fue detectada en ninguno de los pacientes. La mutación E138A es un cambio polimórfico común que no es seleccionado por el tratamiento con NVP y EFV, pero que puede ser ligeramente seleccionado por el tratamiento con Etravirina (ETR) y Rilpivirina (RPV). Esta mutación puede disminuir ligeramente la susceptibilidad a ETR y RPV. Dado que la mutación E138A se encontraba presente desde el primer periodo de interrupción del tratamiento en el paciente No. 4, y permaneció como mutación de alta abundancia en los tres rebotes virológicos, es posible que dicha mutación no haya sido generada por el proceso de interrupción/reinicio del tratamiento, sino que ya estaba presente en el niño antes de su inclusión en el estudio; no obstante, no se cuenta con un estudio de genotipificación previo al inicio del programa de IET para este paciente. En el paciente No. 1 se detectaron mutaciones de resistencia a drogas en baja abundancia (V90I y F227L). Aunque la sustitución V90I es indicada como una

Mutación de Resistencia a ITRNN, la interpretación genotípica del HIVdb menciona que es un polimorfismo accesorio común que puede ser ligeramente seleccionado por el tratamiento con ITRNN in vitro y/o in vivo y que es asociada con mínima o nula reducción en la susceptibilidad a los ITRNN. F227L es una mutación que, acompañada de V106A, se asocia con reducción en la susceptibilidad a NVP y EFV. En los tres rebotes del paciente No. 2 se encontró la mutación K101E, que causa resistencia intermedia a NVP y resistencia de bajo nivel a EFV y ETR (Etravirina) y en combinación con M184I causa resistencia intermedia a Rilpivirina (RPV); dicha mutación se mantuvo en los tres rebotes en “baja-abundancia” y nunca sobrepaso del 2% de las subpoblaciones detectadas a pesar de los ciclos de interrupción/reinicio del tratamiento en éste paciente. En el tercer rebote del paciente No. 2 fue detectada la mutación V108I que es seleccionada por NVP, EFV y ETR y que pudiera reducir levemente la susceptibilidad a NVP y EFV. En los tres rebotes del paciente No. 4 se encontró la mutación V90I que es débilmente seleccionada por ITRNN y es asociada con mínima reducción en la susceptibilidad de ITRNN. En el primer rebote de éste mismo paciente se encontró la mutación V106I que es una mutación polimórfica accesorio seleccionada por el tratamiento con EFV y que en combinación con V179D puede contribuir a la reducción de la susceptibilidad a NVP y EFV. La mutación A62V encontrada en el tercer rebote del paciente No. 4 es la única asociada con resistencia a ITRN, pero requiere la presencia de los cambios K65R y Q151M o la inserción T69 para reducir la susceptibilidad a ITRN. Por si sola no tiene efectos en la susceptibilidad a los antirretrovirales, por cual, aunque es señalada como mutación de resistencia a ITRN, los virus que la presentan son susceptibles a todos los antirretrovirales. Estos resultados sugieren, por tanto, que los rebotes virológicos inducidos por el programa de interrupciones estructuradas del TARAA en niños representan un riesgo bajo de selección de mutaciones induciendo resistencia a los ITRN e ITRNN actualmente en uso clínico.

El desarrollo de resistencia a los antirretrovirales sigue siendo el mayor problema que enfrenta el tratamiento para la infección causada por el VIH, diversos mecanismos están involucrados en su desarrollo. Así, (1) subpoblaciones virales resistentes pueden ser transmitidas entre individuos durante el proceso de infección; (2) pueden ocurrir debido a

la presencia de mutaciones previas al tratamiento y; (3) puede suceder la aparición de nuevas mutaciones durante la administración inadecuada del TARAA, por lo que un pobre apego al tratamiento o incluso la interrupción de éste puede conducir a la aparición de mutaciones asociadas con resistencia a los antirretrovirales; éste es el principal riesgo de los distintos programas de IET (Pennings 2012).

Al comparar los distintos rebotes virológicos analizados en cada paciente incluido en el presente trabajo, no se generaron mutaciones nuevas asociadas con resistencia a IPR o ITR. Pennings señala que el tiempo de interrupción del TARAA es crucial para el establecimiento de mutaciones asociadas con la resistencia y sugiere que la probabilidad de que dichas mutaciones se establezcan se incrementa con períodos sin tratamiento largos (Pennings 2012). En el programa de IET del presente estudio se manejaron períodos de interrupción relativamente cortos, lo que pudo ser el determinante del no desarrollo de nuevas mutaciones de resistencia a drogas. Otro estudio refiere el riesgo de la selección de variantes resistentes durante las IET y propone limitar su uso sólo a individuos con condiciones inmunológicas favorables (Aiuti y Giovannetti, 2003). En el presente trabajo, los cuatro niños incluidos se encontraban sin supresión inmunológica (de acuerdo a la clasificación del CDC) y asintomáticos de acuerdo a su historial clínico durante un año previo al inicio de las IET. En resumen, dado que no observó la aparición de nuevas mutaciones asociadas con resistencia a IPR y que las mutaciones asociadas con resistencia a ITR detectadas en baja abundancia permanecieron en los mismos niveles en los tres momentos sin TARAA, se puede sugerir que el programa de IET evaluado es virológicamente seguro, lo que se posibilita la investigación de éste tipo de procedimientos en otras poblaciones de niños e incluso con un número mayor de pacientes o de ciclos de interrupción/reinicio del TARAA para probar la consistencia de los resultados observados; sin embargo, es necesario un estrecho seguimiento virológico de los pacientes sometidos a éstos procedimientos.

8. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó la metodología de secuenciación ultra-profunda para la identificación de mutaciones en los segmentos de la PR y TR del gen *pol* del VIH-1 en poblaciones de alta y baja abundancia.
2. Aunque sólo se observó una reducción discreta en la magnitud del rebote virológico hasta el tercer período de interrupción, todos los períodos de interrupción fueron seguidos por una caída de la CV a niveles indetectables al reiniciar el TARAA.
3. Se identificaron diversas mutaciones en el gen de la PR, tanto en poblaciones de alta como de baja abundancia, pero no relacionadas con resistencia antirretroviral.
4. Se identificaron diversas mutaciones en el gen de la TR, tanto en poblaciones de alta como de baja abundancia, pero no relacionadas con resistencia antirretroviral.
5. Los resultados encontrados sugieren que los períodos de interrupción del TARAA durante las IET no inducen la selección de mutaciones asociadas a resistencia a los inhibidores de PR y TR.
6. Se puede concluir, por tanto, que los rebotes virológicos inducidos por el programa de interrupciones estructuradas del TARAA en niños parecen representar un riesgo bajo de selección de mutaciones induciendo resistencia a los ITRAN e ITRNN actualmente en uso clínico.

9. LITERATURA CITADA

1. Abiodun M.O., Ijaiya M.A. y Aboyeji P.A. Transmission of HIV among pregnant women. *J Nat Med Assoc* 2007; 99:758-763.
2. Aiuti F y Giovannetti A. Structured interruptions of therapy: looking for the best protocol. *AIDS* 2003, 17:2257-2258.
3. Alteri C., Santoro M.M., Abbate I., Rozera G., Bruselles A., Bartolini B., Gori C., Forbici F., Orchi N., Tozzi V., Palamara g., Antinori A., Narciso P., Girardi E., Svicher V., Ceccherini-Silberstein F., Capobianchi M.R., y Perno C.F. "Sentinel" mutation in standard population sequencing can predict the presence of HIV-1 reverse transcriptase major mutations detectable only by ultra-deep pyrosequencing. *J. Antimicrob Chemother* 2011, 66:2615-2623.
4. 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.
5. Barré-Sinussi F., Chermann J.C., Rey F., Chamaret N.S, Gruet 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.
6. Beerebwinkel N., Günthard H.F., Roth V., y Metzner K.J. Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data. *Front Microbiol* 2012, 3:1-16.
7. 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. *PlosOne* 2009, 4:4724-4732.
8. Bimber B.N., Dudley D.M., Lauck M., Becker E.A., Chin E.N., Lank S.M., Grunewald H.L., Caruccio N.C., Maffitt M., Wilson N.A., Reed J.S., Sosman J.M., Tarosso L.F., Sanabani S., Kallas E.G. Hughes A.L y O'Connor D.H. Whole-genome Characterization of Human and Simian Immunodeficiency Virus Intra-host Diversity by Ultradeep Pyrosequencing. *J Virol.* 2010, 84:12087-12092.

9. 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.
10. 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.
11. Bruselles A., Rozera g., Bartolini B., Prosperi M., Del Nonno F., Narciso P., Capobianchi M.R., y Abbate I. Use of Massive Parallel Pyrosequencing for Near Full-Length Characterization of a Unique HIV Type 1 BF Recombinant Associated with a Fatal Primary Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009, 25:937-942.
12. CENSIDA; Cifras al 30 de Junio del 2007. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA. Secretaria de Salud, México. Disponible en línea: <http://www.salud.gob.mx/conasida>.
13. 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.
14. Clavel F. y Hance A.J. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004, 350:1023-1035.
15. 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.
16. 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.

17. Deeks S.G., Wrin T., Liegler T., Hoh R., Hayden M., Barbour J.D., Hellmann N.S., Petropoulos C.J., McCune J.M., Hellerstein M.K. y Grant R.M. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 2001, 344: 472:480.
18. Delauger C., Chaix M.L., Blanche S., Warszzawski J., Cornet D., Dollfus C., Schneider V., Burgard M., Faye A., Mandelbrot L., Tubiana R., Rouzioux C y the ANRS French Perinatal Cohort. Perinatal acquisition of drug-resistant HIV-1 infection: mechanisms and long-term outcome. *Retrovirology* 2009, 6:85-98.
19. Diallo K, Götte M, Wainberg MA. Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3377-3383.
20. Drechsler H. y Powderly W.G. Switching effective antiretroviral therapy: a review. *Clin Infect Dis* 2002, 35:1219-1230.
21. Dudley D.M., Chin E.N., Bimber B.N., Sanabani S.S., Tarosso L.F., Costa P.R., Sauer M.M Kallas E.G., y O'Connor D. Low-Cost Ultra-Wide Genotyping Using Roche/454 Pyrosequencing for Surveillance of HIV Drug Resistance. *PlosONE* 2012, 7:e36494.
22. Eriksson N., Pachter L., Mitsuya Y., Rhee S.Y., Wang C., Gharizadeh B., Ronaghi M., Shafer R.W., y Beerenwinkel N. Viral Population Estimation Using Pyrosequencing. *PlosComput Biol* 2008, 4:1-13.
23. Eshleman S.H., Mracna M., Guay L.A., Deseyve M., Cunningham S., Mirochnick M., Musoke P., Fleming T., Fowler M.G., Mofenson L.M., Mmiro F. y Jackson B. 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
24. 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.

25. Fischer W., Ganusov V.V., Giorgi E.E., Hraber P.T., Keele B.F., Leitner T., Han C.S., Gleasner C.D., Green L., Lo Ch-Ch., Nag A., Wallstrom A.S., Wang S., McMichael A.J., Haynes B.F., Hahn B.H., Perelson A.S., Borrow P., Shaw G.M., Bhattacharya T., y Korber B.T. Transmission of Single HIV-1 Genomes and Dynamics of Early Immune Escape Revealed by Ultra-Deep Sequencing. *PlosONE* 2010, 5: e12303.
26. Gallo R.C. y Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med* 2003, 349:2283-2285.
27. Gifford R.J., Liu T.F., Rhee S.Y., Kiuchi M., Hue S., Pillay D. y Shafer R.W. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics Advance Access* 2009, 25:1197-1198.
28. 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.
29. 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.
30. Hedskog C., Mild M., Jerber J., Sherwood E., Bratt G., Leitner T., Lundeberg J., Andersson B., y Albert J. Dynamics of HIV-1 Quasispecies during Antiviral Treatment Dissected Using Ultra-Deep Pyrosequencing. *PlosONE* 2010, 5:e11345.
31. Hirschel B y Flanigan T. Is it smart to continue to study treatment interruptions? *AIDS* 2009, 23:757-759.
32. Hoffmann C., Minkah N., Leipzig J., Wang G., Arens M.Q., Tebas P., y Bushman F.D. DNA bar coding and pyrosequencing to identify rare HIV drug resistance mutations. *Nucleic Acids Res* 2007, 35:e91.
33. Ji H., Li Y., Graham M., Liang B.B., Pilon R., Tyson S., Peters G., Tyler S., Merks H., Bertagnolio S., Soto-Ramirez L., Sandstrom P., y Brooks J. Next-

- generation sequencing of dried blood spot specimens: a novel approach to HIV drug-resistance surveillance. *Antivir Ther* 2011, 16:871-878.
34. Ji H., Massé N., Tyler S., Liang B., Li Y., Merks H., Graham M., Sandstrom P., y Brooks J., HIV Drug Resistance Surveillance Using Pooled Pyrosequencing. *PlosOne* 2010, 5:e9263.
 35. 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.
 36. Kalmar E.M.N., Sanabani S.S., Charlys da Costa A., Ferreira S., Barreto C.C., Chen S., y Sabino C. Evaluation of HIV-1 resistance to antiretroviral drugs among 150 patients after six months of therapeutic interruption. *Int J STD AIDS* 2012, 23:120-125.
 37. 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
 38. Klein N., Sefe D., Mosconi L., Zanchetta M., Castro H., Jacobsen M., Jones H., Bernardi S., Pillay D., Giaquinto C., Walker A.S., Gibb D.M., y De Rossi A. The Immunological and Virological Consequences of Planned Treatment Interruptions in Children with HIV Infection. *PLOS ONE* 2013, 8:e76582.
 39. Komniakis S.V., Santos D.E.M., Oliveros M.P.R., Sanabani S., y Diaz R.S. HIV-1 Proviral DNA loads (as Determined by Quantitative PCR) in Patients Subjected to Structured Treatment Interruption after Antiretroviral Therapy Failure. *J Clin Microbiol* 2012, 50:2132-2133.
 40. 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.
 41. 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.

42. Lauring A.S., y Andino R. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PlosPathog* 2010, 6:e1001005.
43. Le T., Chiarella J., Simen B.B., Hanczaruk B., Egholm M., Landry M.L., Dieckhaus K., Rosen M.I., y Kozal M.J. Low-Abundance HIV Drug-Resistant Viral Variants in Treatment-Experienced Persons Correlate with Historical Antiretroviral Use. *PlosONE* 2009, 4:e6079.
44. Lengauer T. Analyzing resistance phenomena in HIV with bioinformatics methods. *Bioinformatics* 2003, 19:ii92.
45. Liang B., Luo M., Scott-Herridge J., Semeniuk C., Mendoza M., Capina R., Sheardown B., Ji H., Kimani J., Ball B.T., Domselaar G V., Graham M., Tyler S., Jgonas S.J.M., y Plummer F.A. A Comparison of Parallel Pyrosequencing and Sanger Clone-Based Sequencing and Its Impact on the Characterization of the Genetic Diversity of HIV-1. *PlosONE* 2011, 6:e26745.
46. Liu T.F. y Shafer R.W. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis* 2006, 42:1608-1618.
47. Lory 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
48. Machado C., Ríos-Villegas M.J., Gálvez-Acebal J., Domínguez-Castellano A., Fernández-Cuenca F., Palomo V., Muniain M.A., y Rodríguez-Baño J. Long-term outcome of patients after a single interruption of antiretroviral therapy: a cohort study. *BMC Res Notes* 2012, 5:578.
49. 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.
50. Martínez M.A., Martrus G., Capel E., Perera M., Franco S., y Nevot M. Quasispecies Dynamics of RNA Viruses. *J Int Migr Integr* 2012, 21-36.
51. Martrus G., Nevot M., Andre C., Clotet B., y Martínez A. Changes in codon-pair bias of human immunodeficiency virus type 1 have profound effects on virus replication in cell culture. *Retrovirology* 2013, 10:78.

52. Mitsuya Y., Varghese V., Wang C., Liu T.F., Holmes S.P., Jayakumar P., Gharizadeh B., Ronaghi M., Klein D., Fessel W.J., y Shafer R.W. Minority Human Immunodeficiency virus Type 1 Variants in Antiretroviral-Naïve Persons with Reverse Transcriptase Codon 215 Revertant Mutations. *J Virol* 2008, 82:10747-10755.
53. Mitsuya Y., Winters M.A., Fessel W.J., 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.
54. 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.
55. Morison L. The global epidemiology of HIV/AIDS. *Br Med Bull* 2001, 58:7-18
56. 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.
57. 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.
58. Nadai Y., Eyzaguirre L.M., Constantine N.T., Sill A.M., Cleghorn F., Blattner W.A., y Carr J.K. Protocol for Nearly Full-Length Sequencing of HIV-1 RNA from Plasma. *PlosONE* 2008, e1420.
59. 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.
60. 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.

61. O'Meara D., Wilbe K., Leitner T., Hejdeman B., Albert J., Lundeberg J., Monitoring Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors by Pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2011, 39:464-473.
62. Palacios G. C., Sanchez L.M., Briones E., Ramirez T.J., Castillo H., Rivera L. G., Vazquez C.A., Rodriguez-Padilla C., y Holodniy M. Structured interruptions of highly active antiretroviral therapy in cycles of 4 weeks off/12 weeks on therapy in children having chronically undetectable viral load cause progressively smaller viral rebounds. *Int J Infect Dis* 2009, 14:34-40.
63. Palacios-Saucedo G.C., Rivera-Morales L.G., Vázquez-Guillén J.M., Sánchez L.M., Ramírez T.J., Briones E., Ortiz-López R., Vázquez C.A., y Rodríguez-Padilla C. Drug Resistance Mutations During Structured Interruptions of HAART in HIV-1-Infected Children. *Curr HIV Res* 2011; 9:154-159.
64. Pennings S.P. Standing Genetic Variation and the Evolution Drug Resistance in HIV. *Plos Comput Biol* 2012, 8:1-13.
65. 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.
66. Preston B.D., Poiesz B.J. y Loeb L.A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988; 242: 1168-1170.
67. 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.
68. Redd A.D., Collinson-Streng A., Martens C., Ricklefs S., Mullis C.E., Manucci J., Tobian A.A.R., Selig E.J., Laeyendecker O., Sewankambo N., Gray R.H., Serwadda D., Wawer M.J., Porcella S.F., y Quinn T.C. Identification of HIV Superinfection in Seroconcordant Couples in Rakai, Uganda, by Use of Next-Generation Deep Sequencing. *J Clin Microbiol* 2011, 49:2859-2867.
69. Redd A.D., Mullis C.E., Serwadda D., Kong X., Martens C., Ricklefs S.M., Tobian A.A.R., Xiao C., Garbowski M.K., Nalugoda F., Kigozi G., Laeyendecker O., Kagaayi J., Sewankambo N., Gray R.H., Porcella S.F., Wawer M.J., y Quinn

- T.C. The Rates of HIV Superinfection and Primary HIV Incidence in a General Population in Rakai, Uganda. *JID* 2012, 206:267-273.
70. 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.
 71. 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.
 72. Rhee S.Y., Gonzales M.J., Kantor R., Betts B.J., Ravela J y Shafer R.W. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 2003, 31:298-303.
 73. Rhee S.Y., Liu T.F., Holmes S.P. y Shafer R.W. HIV-1 subtype B protease and reverse transcriptase amino acid covariation. *PlosComput Biol* 2007, 3:87-94.
 74. 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.
 75. 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.
 76. 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.Vol 17: 87-89.
 77. Rozera G., Abbate I., Bruselles A., Vlassi C., D'Offizi G., Narciso P., Chillemi G., Prosperi M., Ippolito G., y Capobianchi M.R. Missively parallel pyrosequencing highlights minority variants in the HIV-1 env quasispecies from lymphomonocyte sub-populations. *Retrovirology* 2009, 6:15.

78. 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
79. Schuval S.J. Pharmacotherapy of pediatric and adolescent HIV infection. *Ther Clin Risk Manag* 2009, 5:469-484.
80. Shafer R.W. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:247-277.
81. 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.
82. 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.
83. Shafer R.W. The challenge of antiretroviral drug resistance in HIV-1 infected children. *J Pediatr* 2009, 85:91-94.
84. Shafer R.W. y Schapiro J.M. Drug resistance and antiretroviral drug development. *J Antimicrob Chemother* 2005, 55: 817-820.
85. Shafer R.W. y Schapiro J.M. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev* 2008, 10:67-84
86. 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.
87. Shafer R.W., Rhee S.Y., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Schapiro J.M., Kuritzkes D.R. y Bennett D. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS* 2007, 21:215-223.
88. 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.
89. Situación de la Epidemia de SIDA Diciembre de 2006. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y Organización Mundial de la Salud (OMS). Diciembre de 2006. Disponible en línea: <http://www.unaids.org>.

90. Skums P., Dimitrova Z., Campo D., Vaughan G., Rossi L., Forbi J.C., Yokosawa J., Zelikovsky A., y Khudyakov Y. Efficient error correction for next-generation sequencing of viral amplicons. *BMC Bioinformatics* 2012, 13:S6.
91. 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.
92. Taylor S., Jayasuriya A. y Smit E. Using HIV resistance tests in clinical practice. *J Antimicrob Chemother* 2009, 64:218-222.
93. Tiemessen C.T. y Kuhn L. Immune pathogenesis of pediatric HIV-1 infection. *Current HIV/AIDS Reports* 2006, 3:13–19
94. Tong C.Y.W., Mullen J., Kulasegaram 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.
95. 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.
96. Van Rompay K.K.A., Singh R.P., Heneine W.H., Johnson J.A., Montefiori D.C., Bischofberger N. y Marthas M.L. Structured treatment interruptions with tenofovir monotherapy for simian immunodeficiency virus-infected newborn macaques. *J Virol* 2006, 80:6399-6410.
97. Vidal-Lampurdanés C. y 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.
98. Wang C., Mitsuya Y., Gharizadeh B., Ronaghi M., y Shafer R. W. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 2007, 17:1195-1201.
99. Wiener L., Mellins C.A., Marhefka S. y Battles H.B. Disclosure of an HIV diagnosis to childrens: history, current research, and future directions. *J Dev Behav Pediatr* 2007, 28:155-166.

100. 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.
101. 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>. [Revisado el 25 de octubre de 2009].
102. Zagordi O., Klein R., Däumer M., y Beerenwinkel N. Error correction of next-generation sequencing data and reliable estimation of HIV quasispecies. *Nucleic Acids Res* 2010, 38:7400-7409.
103. Zhang J., Rhee S.Y., Taylor J. y Shafer R.W. Comparison of the precision and sensivity of the antiviogram and phenosense HIV drug susceptibility assays. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38:439–444.

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

José Manuel Vázquez Guillén

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: MUTACIONES RELACIONADAS A RESISTENCIA ANTIRRETROVIRAL IDENTIFICADAS POR SECUENCIACIÓN ULTRA-PROFUNDA EN LOS REBOTES DE VIRUS AUTÓLOGOS GENERADOS POR INTERRUPCIONES ESTRUCTURADAS DE TARAA EN NIÑOS CON SIDA

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en la ciudad de Monterrey; Nuevo León el 28 de agosto de 1983, hijo de José Manuel Vázquez Juárez y Esperanza Guillén de Lara.

Educación: Químico Bacteriólogo Parasitólogo por la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2006 y Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología por la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2009.

Experiencia Profesional: Estudiante adscrito al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas desde el verano de 2003 desempeñando diversas funciones como estudiante de verano PROVERICYT, servicio social, becario auxiliar de laboratorio y tesista de licenciatura, maestría y doctorado. Es autor de cuatro artículos científicos en revistas indexadas internacionales con factor de impacto y un artículo de divulgación en revista arbitrada nacional. Es también coautor de las secuencias de nucleótidos GU392033 – GU392036 y JF272487 – JF272496 alojadas en el GenBank (NCBI; NIH, E.U.A.). Del 2006 al 2010 se desempeñó como coordinador administrativo en la Coordinación de Planeación y Desarrollo de la Dirección de Vinculación y Servicio Social de esta Máxima Casa de Estudios. Es profesor de asignatura de la Facultad de Ciencias Biológicas del 2011 a la fecha impartiendo las materias de “Bioseguridad”, “Biotecnología Genómica”, “Técnicas Básicas de Manipulación de Ácidos Nucleicos”, y “Biología Molecular” en los programas de Licenciatura en Biotecnología y Genómica y Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

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

Gerardo C. Palacios-Saucedo^{1,1}, Lydia G. Rivera-Morales², José M. Vázquez-Guillén², Luz M. Sánchez¹, Teresa J. Ramírez³, Evangelina Briones⁴, Rocío Ortiz-López⁵, Carlos A. Vázquez¹ and Cristina Rodríguez-Padilla²

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 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. ⁵Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina and Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

Abstract: Information concerning structured treatment interruptions (STI) of the Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) and the associated risk of this strategy for selecting antiretroviral resistance in children is scarce. In this study, we have searched for antiretroviral resistance mutations at the end of five viral rebounds of two HIV-1-infected children who underwent an STI program. The HAART of two children with HIV and a chronically undetectable viral load (VL) was interrupted for 4 weeks and then restarted and continued for 12 weeks for three cycles. 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. Treatment of both the patients based on AZT+3TC+RTV remained identical during the study. The reverse transcriptase (RT) and protease (PR)-coding regions were sequenced searching for antiretroviral resistance mutations at the end of each viral rebound. Genotyping analysis was performed using the Stanford University HIV Drug Resistance Database (HIV-DB). One patient experienced progressively lower viral rebounds (269000–31300 at the first and third rebounds, respectively), while the other patient did not experience such a reduction, and the VL of both the patients fell to undetectable levels during therapy. In the five viral rebounds examined, no mutations for major or minor resistance to protease inhibitors (PIs) were found and the analysis indicated susceptibility to all PIs currently in clinical use. Although the mutation K103R associated with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) resistance was found in two viral rebounds of one patient, the analysis indicated the absence of resistance to reverse transcriptase inhibitors in all the sequences evaluated. As no mutation related to antiretroviral resistance was found, our results suggest that the STI program used in this study may have a low risk of selecting antiretroviral resistance. Nevertheless, further studies evaluating larger cohorts over longer periods, and above all, controlled clinical trials, are required before definitive conclusions about the safety of STI of HAART in children may be drawn.

Keywords: AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), antiretroviral resistance, HAART (highly active antiretroviral therapy), STI (structured treatment interruptions).

INTRODUCTION

The Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) has increased the survival and improved the quality of life of HIV-infected children [1, 2]. However, its high cost, toxicity secondary to its chronic use, and the treatment adherence problems that increase over time are important limitations reducing its long-term effectiveness [1, 3–7]. Patients who interrupt HAART with no medical indication experience rapid viral load (VL) rebounds followed by depletions of

CD4+ lymphocytes [8–11]. Structured treatment interruptions (STI) of HAART, in contrast, induce controlled increases in viral replication by short-term periods that may encourage the development of a specific immune response against HIV, which in turn may produce progressively smaller VL rebounds [9, 12]. However, information available on STI of HAART and the risk of this strategy of inducing the selection of antiretroviral-resistant quasi-species in pediatric patients is scarce, and such information in adult patients is still controversial [12–19]. A number of studies on structured and non-structured interruptions of HAART in adult patients have reported antiretroviral resistance mutations between 0.75 and 45% [9, 10, 18]. Thus, the purpose of this study was to search for antiretroviral resistance mutations in the viral rebounds of two HIV-1-infected pediatric patients under chronic viral control, who underwent an STI program of HAART.

*Address correspondence to this author at the 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, C.P. 64320, México; Tel/Fax: (52) 81-8371-4100, Ext. 41315; E-mails: palsaugo@gmail.com and gerardo.palacios@imss.gob.mx

Expression of CCR5, CXCR4 and DC-SIGN in Cervix of HIV-1 Heterosexually Infected Mexican Women

Lydia Guadalupe Rivera-Morales^{*1}, Paulo Lopez-Guillen², Jose Manuel Vazquez-Guillen¹, Gerardo C. Palacios-Saucedo³, Adrian G. Rosas-Taraco⁴, Antonio Ramirez-Pineda¹, Patricia Irene Amaya-Garcia¹ and Cristina Rodriguez-Padilla¹

¹Laboratorio de Inmunología y Virología; Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

²Unidad de Infectología "Dr. Juan I. Menchaca". Hospital General Regional No. 45. Instituto Mexicano del Seguro Social, Jalisco, Mexico

³Departamento de Pediatría, Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 and Centro de Investigación Biomedica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Nuevo León, Mexico

⁴Departamento de Inmunología del Hospital Universitario "Dr. Jose Eleuterio Gonzalez", Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

Abstract: *Background:* A number of studies have demonstrated that receptor and co-receptor expression levels which may affect viral entry, promoting cervical HIV infection. The aim was to evaluate the expression levels of CCR5, CXCR4 and DC-SIGN mRNA in a sample of heterosexually HIV infected Mexican women.

Methods: We enrolled twenty-six HIV heterosexual infected women attending a local infectious diseases medical unit. RNA was isolated from the cervix and gene expression analysis was performed using real-time PCR.

Results: Expression rates for mRNA of CCR5 (median 1.82; range 0.003–2934) were higher than those observed for CXCR4 (0.79; 0.0061–3312) and DC-SIGN (0.33; 0.006–532) receptors ($p < 0.05$). A high correlation was found between the mRNA expression levels of these three receptors ($r_s = 0.52$ to 0.85 , $p < 0.01$).

Conclusion: Levels of expression of the tested chemokine receptors in the cervix are different from each other and also vary from woman to woman, and seem to support the suggestion that chemokine receptor expression in genital tissues may be playing a role in the HIV transmission.

Keywords: AIDS, HIV-1, Mucosae, CCR5, CXCR4, DC-SIGN.

BACKGROUND

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a serious public health problem worldwide with 33.4 million people currently living with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) according to UNAIDS and WHO [1]. In Mexico, the number of persons living with HIV is estimated to be 200,000 [2]. Although HIV infection initially affected homosexual men, the virus is now spreading to a growing number of heterosexual individuals. The male-to-female ratio among HIV-1-infected people in Mexico is estimated to be 4.9:1 [3].

A number of HIV-1 infected patients acquired the virus during heterosexual exposure where the virus binds to the CD4 receptor and other co-receptors present on immune cells of the genital mucosa [4, 5]. HIV infection is mediated

by a complex interaction between HIV envelope proteins and receptors on target cells, particularly CD4 receptors; however, expression of this molecule alone is not enough to establish the infection. It is well known that CCR5 and CXCR4 co-receptors are necessary for the virus entrance [6]. Viral strains that utilize CCR5 are classified as R5-tropic (which replaced the designation M-tropic), whereas those that utilize CXCR4 are termed X4-tropic (replacing the designation T-tropic) [7]. R5 variants have been suggested to be the predominant strains following sexual transmission [7, 8]. Experimental evidence indicates that co-receptor expression levels have impact on the efficiency of viral entry and may affect the pathogenesis of the HIV-1 infection [7]. However, data from previous studies have shown differences in the chemokine receptor expression, which possibly indicate that the transmission of R5 variants may not be directly associated with the levels of CCR5 within the genital tract [9]. Another important factor in viral transmission is the C-type lectin DC-SIGN (Dendritic Cell – Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin, CD-209), which plays a central role in the mucosal HIV-1 infection from

*Address correspondence to this author at the Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragan s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo León, C.P. 66451, Mexico; Tel: (52 81) 83294115; Fax: (52 81) 83524212; E-mail: lydia_rivera_@hotmail.com

Infección por VIH-1 subtipo C. Primer caso informado en México

Lydia Guadalupe Rivera-Morales^{1*}, Itza Eloisa Luna-Cruz¹, Gerardo Ramos-Alfano¹, Adrián Geovanni Rosas-Taraco², Javier Ramos-Jiménez³, Gerardo del Carmen Palacios-Saucedo⁴, José Manuel Vázquez-Guillén¹, Moisés Armides Franco-Molina¹, Reyes Tamez-Guerra¹ y Cristina Rodríguez-Padilla¹

¹Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L.;

²Departamento de Inmunología del Hospital Universitario «Dr. José Eleuterio González» Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L.; ³Servicio de Infectología del Hospital Universitario «Dr. José Eleuterio González», Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L.; ⁴Departamento de Pediatría e Infectología Pediátrica, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades N.º 25, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey N.L. México

Resumen

El presente informe corresponde al primer caso de infección por el VIH-1 subtipo C descrito en México, cuyo diagnóstico fue establecido en un paciente de origen sudafricano que falleció en México por linfoma no Hodgkin asociado a SIDA. Aunque el subtipo B predomina en México, el caso aquí reportado resalta la importancia de realizar estudios epidemiológicos moleculares para monitorear la diseminación de los distintos subtipos de VIH-1.

PALABRAS CLAVE: SIDA. VIH. Subtipos de VIH-1.

Abstract

We herein report the first case of HIV-1 subtype C described in Mexico, which was detected in a South African patient who died in Mexico of an AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. Although HIV-1 subtype B is the predominant virus circulating in Mexico, the case reported highlights the importance of molecular monitoring of the spreading of HIV-1 subtypes.

KEY WORDS: Acquired immunodeficiency syndrome. AIDS. Human immunodeficiency virus. HIV-1 subtypes.

Introducción

De acuerdo al Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA), cerca de 33.4 millones de personas viven con VIH/SIDA¹. Se estima que el número de personas que viven con VIH en México es de 220,000, con una proporción hombre-mujer de 4.9-12.3. En la epidemia alrededor del mundo, el VIH-1 presenta una amplia variación genética y se

le ha categorizado en los grupos M (mayor), N (nuevo), O (*outlier*) y recientemente el grupo P (relacionado al gorila)^{4,5}. La mayoría de las infecciones son causadas por el VIH-1 grupo M, el cual se divide en los subtipos A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K. La distribución de cada uno de estos subtipos alrededor del mundo no es uniforme y están asociados a ciertas áreas geográficas⁶⁻⁸. Además, cada subtipo presenta diferentes propiedades biológicas, entre las que se encuentran diferencias en la capacidad de adaptación, en tropismo y en la capacidad de adquirir resistencia a los antirretrovirales⁹. Se estima que el VIH-1 subtipo C es responsable de más del 50% de todas las infecciones a nivel mundial, además de que es el subtipo predominante en la epidemia devastadora en el sur de África y en algunas partes de Asia¹⁰⁻¹⁴. Por otro lado, el subtipo B es el subtipo más frecuente en

Correspondencia:

*Lydia Guadalupe Rivera-Morales
Laboratorio de Inmunología y Virología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán, s/n
Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza
C.P. 66451, Monterrey, N.L.
E-mail: lydia_rivera_@hotmail.com

Fecha de recepción: 26-01-2011

Fecha de aceptación: 01-09-2011

BRIEF REPORT

Expression of DC-SIGN in Peripheral Blood Dendritic Cells of Patients with Typical, Slow, and Rapid Progression to AIDS

José Manuel Vázquez-Guillén,^a Paola Janeth García-Jacobo,^a Pablo Zapata-Benavides,^a Adrian G. Rosas-Taraco,^b Marco Iván Ordaz-Sánchez,^a Paulo López-Guillén,^c Laura Trejo-Ávila,^a Juan Manuel Alcocer-González,^a Cristina Rodríguez-Padilla,^a and Lydia Guadalupe Rivera-Morales^a

^aLaboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, Mexico

^bDepartamento de Inmunología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

^cUnidad de Infectología Dr. Juan I. Menchaca, Hospital General Regional No. 45, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, Mexico

Received for publication July 22, 2008; accepted November 14, 2008 (ARCMED-D-08-00326).

The main access route for human immunodeficiency virus (HIV) into the lymph nodes is through the mucosa. Once there, dendritic cells (DCs) are the first cells to interact with the virus. Then, DCs can uptake and transport to the lymph nodes, beginning a disseminated infection. Interaction between the virus and DCs is mediated by the receptor DC-SIGN. This study seeks to determine any relationship between HIV-AIDS immunopathology and DC-SIGN expression levels in DCs from typical, rapid, and slow progressors. A DC separation system was implemented using peripheral blood mononuclear cells from infected subjects. The study included 27 patients classified as typical, rapid, and slow progressors according to their clinical and epidemiological files. Finally, quantification of DC-SIGN was achieved by real-time PCR and by applying the Relative Quantification Scheme ($\Delta\Delta C_t$). We isolated DCs from peripheral blood of 27 HIV-infected patients. Nineteen were considered as typical progressors, five as slow progressors, and three as rapid progressors. No significant differences were observed on the expression levels of DC-SIGN among the three groups of patients. Even if there are differences in expression levels among the analyzed patients, we did not find any significant differences in DC-SIGN expression among the three included groups. We therefore cannot conclude that the expression level of the receptor is related with the progression to AIDS. © 2009 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: AIDS, HIV-1, Dendritic cells, DC-SIGN, Progression.

Introduction

Cellular and molecular mechanisms involved in human immunodeficiency virus (HIV)-1 transmission after viral exposure to mucosa remain unclear. It is known that immature dendritic cells (DCs) from skin and mucosa surfaces are the first to interact with HIV-1 on primary infection areas (1–4). DCs are strong antigen-presenting cells that initiate the first immune response, controlling the most susceptible areas to pathogen invasion. In peripheral blood they do not represent a homogeneous cellular population. There are at least two

different populations of DCs with morphological differences (5). DC123+ DC11c- of plasmacytoid morphology (PDC) are dependent on IL-3 for their maturation and two subpopulations with a myeloid shape (MDC) and a low or absent expression of CD123 and a high DC11c expression. These are called type 1 myeloid DCs (MDC-1) and type 2 myeloid DCs (MDC-2) (6).

The main characteristic of these cells is their migratory capacity. They migrate from the bone marrow to the tissue and, once there, to the secondary lymphoid organs (7). It has been suggested that HIV reverts the natural function of this cell group and exploits its activity to facilitate access to the replication region of lymphoid organs (8,9). The basis of this hypothesis relies on the identification of DC-SIGN, which mediates the union of DCs with the HIV-1 and the transport to permissive T cells (1,2,9–13). It has

Address reprint requests to: Dra. Lydia G. Rivera Morales, Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66451 México; E-mail: lydia_rivera_@hotmail.com