



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE  
LA SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
“SALVADOR ZUBIRÁN”**

**“INCIDENCIA DE LA FALLA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL, CON  
ENFOQUE EN LA FALLA INMUNOLÓGICA EN UNA COHORTE DE PACIENTES  
CON INFECCIÓN POR VIH”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR GRADO DE:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS**

**P R E S E N T A:**

**AMY BETHEL PERALTA PRADO**

**TUTOR DE TESIS:**

**DRA. SANDRA MARÍA PINTO CARDOSO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Vo. Bo. Dr. Carlos Aguilar Salinas  
Coordinador del programa de maestrías y doctorado en Ciencias Médicas  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

---

Vo. Bo. Dra. Sandra Ma. Pinto Cardoso  
Tutora.  
Investigador adscrito al Departamento de Investigación en  
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

---

Dra. Amy Bethel Peralta Prado  
Alumno  
Programa de Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

**Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria bajo la  
dirección de la Dra. Sandra María Pinto Cardoso**

**Este trabajo de Tesis con presentado por la alumna Amy Bethel Peralta Prado se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal Dra. Dra. Sandra María Pinto Cardoso con fecha 05 de abril 2017 para su impresión final.**

---

Vo. Bo. Dr. Carlos Aguilar Salinas  
Coordinador del programa de maestrías y doctorado en Ciencias Médicas  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

---

Vo. Bo. Dra. Sandra Ma. Pinto Cardoso  
Tutora.  
Investigador adscrito al Departamento de Investigación en  
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

---

Dra. Amy Bethel Peralta Prado  
Alumno  
Programa de Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

**Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria bajo la  
dirección de la Dra. Sandra María Pinto Cardoso**

**Este trabajo de Tesis con presentado por la alumna Amy Bethel Peralta Prado se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal Dra. Dra. Sandra María Pinto Cardoso con fecha 05 de abril 2017 para su impresión final.**

## ÍNDICE

Resumen.....	1
Antecedentes.....	3
Justificación y planteamiento del problema.....	14
Objetivos.....	15
Hipótesis.....	15
Material y Métodos.....	16
Diseño del Estudio.....	16
Descripción de la población.....	16
Tamaño de muestra.....	16
Procedimiento del estudio.....	17
Procesamiento de muestras sanguíneas .....	20
Análisis Estadístico.....	22
Consideraciones éticas.....	23
Resultados.....	24
Discusión.....	34
Conclusiones.....	36
Bibliografía.....	37
Anexos.....	44

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## **RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN.** La adecuada respuesta al tratamiento antirretroviral (TAR) se define por el control de la viremia, demostrado con la caída de la carga viral (CV), por la reconstitución inmunológica (RI; determinada por elevación en la cuenta de cTCD4+) y por la ausencia de manifestaciones clínicas de SIDA. La Organización Mundial de la Salud (OMS), propuso los siguientes criterios de FI, los cuales son aplicables a los 6 meses de iniciado el TAR.

- 1) Caída de la cuenta de cTCD4+ por debajo del nivel basal (pre-TAR)
- 2) Falla en el incremento del 50% de la cuenta de cTCD4+ a los 6 meses de TAR
- 3) Cuenta de cTCD4+ consistentemente menor a 100 cel/mm<sup>3</sup>.

La incidencia de FI oscila del 14 al 33%, y se desconoce la incidencia en nuestra población.

**Objetivo principal.** Identificar la incidencia de la falla inmunológica, en una cohorte de pacientes del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Investigación clínica. Estudio de Cohorte anidada, observacional, prospectivo y longitudinal realizado en el Departamento de investigación en enfermedades infecciosas del INER (CIENI) Se incluyeron pacientes nacidos en México, mayores de 18 años, con infección por VIH documentada candidatos a iniciar su primer régimen de TAR. Los datos se censuraron para los siguientes desenlaces: muerte, falla virológica y abandono del seguimiento.

Una vez que el paciente firmó el consentimiento informado; se realizó la toma de muestra e inicio del TAR y la valoración clínica se realizó dentro de los 7 a 14 días. Posterior a la evaluación basal, se realizó seguimiento clínico y de laboratorio a los meses: 2 y 6 (T2 y T6).

**RESULTADOS.** Durante el periodo de 28 de enero de 2016 al 31 de enero de 2017, se invitó a 86 pacientes elegibles para el estudio, 65 aceptaron participar y 1 paciente fue eliminado ya que no inició el tratamiento antirretroviral. Se presentan resultados de 34 pacientes que acudieron a 6 meses de seguimiento, de los que son hombres (n=51, 80%); mujeres (n=11; 17%) y mujeres trans (n=2; 3%). La mediana de edad es de 37 años ( $\pm$  DE 11.2; rango 20-64 años).

En cuanto el estado inmuno-virológico previo al inicio del TAR (T0); la mediana de la carga viral de VIH fue de 382,539 copias/mL ( $\pm$  DE 489 841); la mediana de cTCD4+ fue de 143 cel/mm<sup>3</sup> ( $\pm$  DE 196) y de cTCD8+ de 700 cel/mm<sup>3</sup> ( $\pm$  DE 586); el cociente CD4/CD8 fue de 0.21 ( $\pm$  DE 0.28); indicando un estado avanzado de la enfermedad.

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

La incidencia de falla inmunológica, en pacientes con supresión virológica a T6 fue de 11.77% (n=4/34). Se compararon los niveles de dímero D a T0 con la cuenta de cTCD4 a T6; se observó que los niveles basales fueron mayores, en pacientes con <350 cTCD4+ comparados con los pacientes con adecuada reconstitución inmunológica (P < 0.01).

**CONCLUSIONES.** En nuestra población no se observaron diferencias en los niveles plásmaticos de IL-6 entre pacientes con y sin falla inmunológica. Proponemos que el dímero D podría ser un marcador de progresión de la enfermedad y podría usarse para predecir la respuesta de del sistema inmune (cTCD4+) al TAR

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## **ANTECEDENTES**

### *GENERALIDADES*

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) deteriora la función inmunológica, particularmente produce depleción de los linfocitos T CD4+ (cTCD4+) hasta progresar a síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); esta destrucción celular es lenta y progresiva y dura alrededor de 7 a 10 años a partir del inicio de la infección, y depende de las características del individuo, del propio virus; y la activación del sistema inmunológico. (Rutherford, et al., 1990), (Okoyee & Picker, 2013)

La adecuada respuesta al tratamiento antirretroviral (TAR) se define por el control de la viremia, demostrado con la caída de la carga viral (CV), por la reconstitución inmunológica (RI; determinada por elevación en la cuenta de cTCD4+) y por la ausencia de manifestaciones clínicas de SIDA. (Rutherford, et al., 1990), (Okoyee & Picker, 2013), (Stacey, et al., 2009), (Deeks, Barbour, Grant, & Martin, 2002)

La principal meta del TAR es lograr la supresión virológica (SV), es decir reducir la CV a niveles indetectables (menor a 40 copias de VIH/mL de plasma) dentro de los primeros 6 meses; cuando esta meta no se cumple, se traduce en falla virológica (FV); existen múltiples medidas para el abordaje de las causas y el tratamiento de la FV, que concluyen en el cambio del régimen de TAR. (Rutherford, et al., 1990), (Okoyee & Picker, 2013), (Departamento de DST, AIDS e Infecciones Virales, Brasil, 2010), (El-Khatib, et al., 2011)

Posterior al inicio del TAR se presenta la elevación de las cTCD4+; esta respuesta celular es bifásica; la fase inicial corresponde a un incremento rápido y se debe a una reducción de la apoptosis y redistribución de las células de memoria cTCD4+ de los tejidos linfoides; la segunda etapa se debe a la producción de nuevas cTCD4+ con un fenotipo naïve (ver Figura 1), este incremento es lento y progresivo. (Rutherford, et al., 1990), (Pakker, et al., 1998) (Autran, et al., 1999)

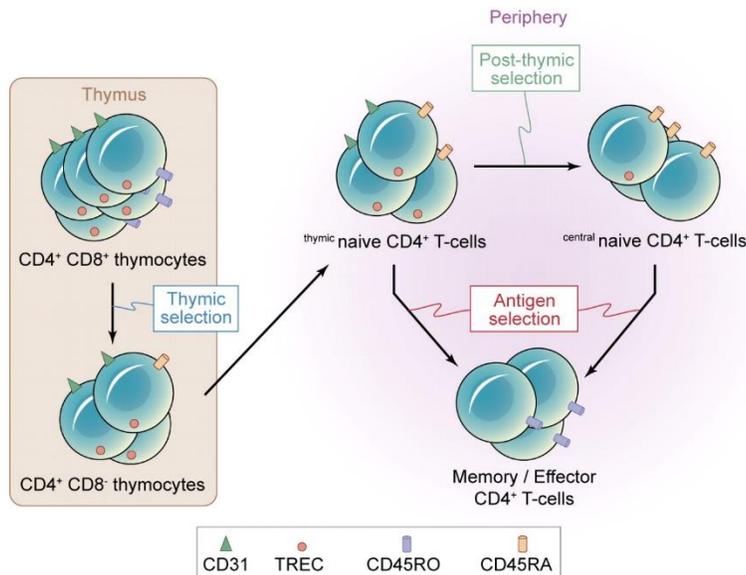
La restauración de las cTCD4+ en la sangre, en los tejidos linfoides secundarios, y en los sitios efectoriales extra-linfoides; inicia a pesar de que la SV no se haya completado debido a la redistribución de las cTCD4+. Esto implica, que en la mayoría de los casos, en la sangre, la cuenta de cTCD4+ se incrementa y mantiene por arriba de los niveles previos al TAR. (Stacey, et al., 2009), (Deeks, Barbour, Grant, & Martin, 2002)

Las nuevas cTCD4+ se producen por la proliferación de cTCD4+ existentes o son producidas en la médula ósea por las células progenitoras hematopoyéticas. Posteriormente maduran en el timo; a su

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

paso por el timo, las células T, reordenan sus genes TCR (por sus siglas en inglés T cell receptor) en la membrana celular; generando fragmentos circulares de ADN conocidos como TRECS (por sus siglas en inglés T-cell receptor excision circles); posteriormente las células T emigran hacia la periferia donde se conocen como RTE (por sus siglas en inglés, Recent Thymic Emigrant); las RTE expresan un marcador de superficie conocido como CD31 (CD: cluster of differentiation; también conocido como PECAM-1 (moléculas de adhesión plaqueto-endoteliales)) y su expresión permite la transmigración linfocitaria. Las TRECS, RTE y células naïve (células CD45+ no activadas: isoforma RA+, RO-) son indicadores no directos de la producción de células T por el timo (timopoiesis). La proliferación de las células T naïve y su maduración (fenotipo de memoria) conduce a la pérdida de la expresión de CD31 y disminución de TRECS. (Kimmig, et al., 2002); (Junge, et al., 2007)

**Figura 1:** Proliferación post-tímica de células T CD4 + naïve humanas.



**Figura 1.** Los Recent Thymic Emigrants (RTE) emigran del timo y se incorporan al “pool” de células T CD4 + TRECS+ CD31+. Algunas células T CD31+ CD4+ son seleccionadas en la sangre periférica; Los TRECSlo CD31- son activados (CD45RO+) y mantienen el tamaño de células T CD4 + naïve. Tomado de: *Life after the thymus: CD31 and CD31 human naïve CD4 T-cell subsets* Siegfried Kohler<sup>1</sup> and Andreas Thiel. Blood First Edition paper, June 26, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-02-139154

No todos los pacientes con SV son capaces de recuperar un nivel adecuado de cTCD4+, esto puede deberse a diversos factores propios del huésped, y del virus; asimismo algunos pacientes con FV presentan elevación en los niveles de cTCD4+. Esta falta de correlación entre la carga viral y los niveles de cTCD4+ se conoce como discordancia inmuno-virológica. (Okoyee & Picker, 2013); (Peterson , et al.,

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

2011); (Pinzone, Di Rosa, Cacopardo, & Nunnari, 2012); (Battegay, Nüesch, Hirschel, & Kaufmann, 2006); (Anude, et al., 2013)

La discordancia inmuno-virológica se puede presentar en dos escenarios: 1) CV indetectable con depleción de cTCD4+, es decir supresión virológica sin reconstitución inmunológica (SV+/RI-) y 2) Niveles elevados de VIH-RNA plasmático con elevación de cTCD4+ (SV-/RI+). Los casos de SV+/RI- se definen como falla inmunológica (FI). La FI se define como la ausencia de elevación en la cuenta de cTCD4+ o la caída de la misma por debajo del basal (previo al TAR), por lo menos en dos determinaciones, a pesar de lograrse la adecuada supresión virológica. (Prabhakar, Banu, Pavithra, Chandrashekhara, & Sastri, 2011)

Recientemente se han agregado otros parámetros que definen la falta de RI a pesar de la SV; es necesario comprender primero que la respuesta inmunológica adecuada se considera cuando un paciente logra una RI con cuentas de cTCD4+ >500 cel/mm<sup>3</sup>, debido a que en la práctica clínica, en este grupo de pacientes que se definen como Respondedores Inmunológicos (RI) la sobrevida es relativamente similar a la de la población general. (Lewden, et al., 2007) Sin embargo este parámetro (cTCD4+ > 500 cel/mm<sup>3</sup>) es arbitrario; en el estudio COHERE, se observó que los sujetos con cuentas de cTCD4+ entre 500 y 750 cel/mm<sup>3</sup> tuvieron mayor riesgo de progresar a SIDA en comparación con sujetos con niveles mayores a 750 cel/mm<sup>3</sup>. (Mocroft, et al., 2013) Por lo que Okulicz *et al.*, 2015, sugirieron necesaria la normalización de cTCD4+ a más de 900 cel/mm<sup>3</sup> a 5 años de TAR para mitigar el riesgo de progresión a SIDA, reducir la activación imune y inflamación residual y el agotamiento inmunológico.

Aproximadamente un tercio de los pacientes que reciben TAR durante 5 años no incrementan los cTCD4+ a 500 cel/mm<sup>3</sup>; estos pacientes son clasificados como *respondedores inadecuados*; dentro de este grupo se incluye a los *no respondedores inmunológicos* (NRI); con cuentas de cTCD4+ <200 o <350 cel/mm<sup>3</sup>; los NRI comprenden 10 a 20% de los individuos infectados con VIH con TAR de larga duración. Varias clasificaciones existen para definir a este grupo: (Magen, Elbirt, Agmon-Levin, Mishal, & Sthoeger, 2017) Magen *et al.*, 2010 clasificó como NRI a los pacientes con TAR por lo menos durante un año con elevación de cTCD4+ <10% o con cuentas de cTCD4+ <300 cel/mm<sup>3</sup>. Lederman (Lederman, et al., 2011) caracterizó a los NRI a 24 meses de SV, con cTCD4+ <350 cel/mm<sup>3</sup>. (Magen, Elbirt, Agmon-Levin, Mishal, & Sthoeger, 2017); (Lederman, et al., 2011). Recientemente (Girard, et al., 2016); sugirió clasificar a los pacientes NRI a tres años de alcanzar la SV.

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

Así podemos observar que la definición de FI y por asociación la definición de RI ha evolucionado constantemente ya que depende de las metas de tratamiento en las guías internacionales y nacionales vigentes, del riesgo de progresión a SIDA y de la presencia de comorbilidades y coinfecciones; según los diversos autores, es considerada si las cTCD4+ se mantienen por debajo de 100, 200 o 350 cel/mm<sup>3</sup>. (Prabhakar, Banu , Pavithra, Chandrashekhara , & Sasthri , 2011); (World Health Organization (WHO), 2013); (Vallabhaneni, Chandy, Heylen, & Ekstrand , 2013); (Tran, et al., 2014); (Palladino, et al., 2013); (Rawizza , et al., 2011)

La Organización Mundial de la Salud (OMS), propuso los siguientes criterios de FI, los cuales son aplicables a los 6 meses de iniciado el TAR. (World Health Organization (WHO), 2013):

- 1) Caída de la cuenta de cTCD4+ por debajo del nivel basal (pre-TAR)
- 2) Falla en el incremento del 50% de la cuenta de cTCD4+ a los 6 meses de TAR
- 3) Cuenta de cTCD4+ consistentemente menor a 100 cel/mm<sup>3</sup>.

En México se considera a la FI como la incapacidad de mantener o incrementar el nivel de cTCD4+ a pesar de lograrse la SV. (CONASIDA, 2014) Sin embargo esta definición es poco precisa ya que no se mencionan puntos de corte para la cuenta de cTCD4+.

La incidencia de la FI es muy variable y depende de la población estudiada y los criterios diagnósticos; en general se reporta una incidencia del 5-20% (Piketty, et al., 1998); (Autran, et al., 1997); (Lapadulaa , et al., 2013); la tasa estimada es de 17.2% por 100 personas-año, y la prevalencia oscila entre 13.59% al 30% según los estudios.

Boettiger, (Boettiger , et al., 2015); en el estudio TREAT, con 7302 pacientes asiáticos describió una incidencia de falla al primer regimen de TAR de 4.1%, de éstos 43% correspondían a FV, 31% a FI y 25.8% a falla clínica (FC).

Onen, (Onen, et al., 2009); en un análisis retrospectivo de 286 pacientes que iniciaron TAR en el Hospital universitario de St. Louis durante 1996 a 2006, reportó que 36% de los pacientes en TAR supresivo tuvieron una recuperación subóptima de cTCD4+ durante los primeros cuatro años de TAR, además identificó algunos factores de riesgo como el sexo masculino, edad mayor a 50 años y nadir de cTCD4+ <100cel/mm<sup>3</sup>.

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

Los factores demográficos (edad, sexo, grupo étnico) afectan los niveles de cTCD4+. Las características de la infección (nadir de cTCD4+, carga viral máxima y duración de la infección), así como la inflamación son también determinantes clave de la RI. (Menkova-Garnier, et al., 2016) Los factores de riesgo para FI son asociados a las características del huésped, del virus y del tratamiento; entre los principales factores de riesgo se encuentran: edad mayor a 55 años, sexo masculino, nadir de cTCD4+ <100cel/mm<sup>3</sup> (nivel más bajo de cTCD4+ previo al inicio de TAR) y la presencia de coinfecciones. (Prabhakar, Banu , Pavithra, Chandrashekhara , & Sasthri , 2011)

Cabe mencionar que la cuenta de cTCD4+ en sangre periférica es el resultado de la producción, destrucción, y migración de esas células entre la sangre y los tejidos linfoides. (Gaardbo, Hartling, Gerstoff, & Nielsen, 2012); (Delobel, et al., 2006)

## ***MECANISMOS PATOGENICOS***

### ***Alteraciones en la producción y maduración***

En la FI se ha identificado depresión profunda de todos los estratos de maduración de las cTCD4+ y de las cTCD8+; que traduce la falla de producción/expansión de las células T. Estos cambios tienen un origen multifactorial:

El deterioro en la función del timo es mayor en hombres ya que esta glándula es un blanco para las hormonas andrógenas y las hormonas sexuales femeninas tienen capacidad anti-apoptótica. (Prabhakar, Banu , Pavithra, Chandrashekhara , & Sasthri , 2011)

La interleucina 7 (IL-7) induce la producción y proliferación de células T, y las células T maduras expresan el receptor de interleucina 7 (RIL-7); Marzali (Marzali , et al., 2006) identificó una reducción del porcentaje de las cTCD4+ naïve en NRI, disminución de la expresión de RIL-7, el incremento en los niveles de IL-7. Al igual que IL-7; las interleucinas 2 (IL-2) y 15 (IL- 15), son parte de la familia de citosinas cadena gamma y son reguladores centrales de la proliferación, activación y diferenciación de células T; pero en sujetos con infección por VIH y particularmente en NRI, la producción de IL-2 e IL-15 está comprometida. (Marzali , et al., 2006); (Erikstrup, et al., 2010)

Lederman (Lederman, et al., 2011), en un estudio con 60 pacientes en FI (cTCD4+ <350 cel/mm<sup>3</sup> con 24 meses de SV), 20 en RI (cTCD4+ >500 cel/mm<sup>3</sup> con 24 meses de SV) y 21 controles sanos, identificó que los pacientes con FI tenían menores niveles absolutos de cTCD4+ naïve circulantes

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

(CD45RA+/CCR7+), de cTCD4+ de memoria central (CM; CD45RA-/CCR7+), y de memoria efectora (EM; CD45RA-/CCR7-) ( $P < 0.001$ ) comparados con los demás grupos. También observó una disminución en los niveles absolutos de cTCD8+ naïve (CD45RA+/CCR7+) ( $P < 0.001$ ), mientras que los estratos de cTCD8+ de memoria terminal (TM; CD45RA+/CCR7-), de memoria central (CM; CD45RA-/CCR7+), y de memoria efectora (EM; CD45RA-/CCR7-) son mayores comparados con los controles sanos ( $P < 0.03$ ,  $< 0.02$  y  $< 0.005$  respectivamente).

### ***Activación inflamatoria persistente.***

La FI se asocia a un incremento en la activación inmune caracterizado por el incremento en el porcentaje de CD38+ y HLA-DR+ en cTCD4+ y cTCD8+ y por la disminución de células T naïve circulantes; en comparación con pacientes con reconstitución adecuada. (Autran, et al., 1999); (Kimmig, et al., 2002); (Junge, et al., 2007); (Peterson, et al., 2011) (Kimmig, et al., 2002); (Battegay, Nüesch, Hirschel, & Kaufmann, 2006); (Marziali, et al., 2006); (Lederman, et al., 2011)

Saison, (Saison, et al., 2014) en su estudio con 87 pacientes observó un incremento de las cTCD4+ activadas (HLA-DR+) e incremento en la activación de cTCD8+ (HLA-DR+ y/o CD38+). También observó incremento en el porcentaje de células T reguladoras (9 versus 7%, respectivamente,  $P = 0.022$ ).

Lederman (Lederman, et al., 2011) también describió que en la FI, la proporción de células T (CD4+ y CD8+) activadas (CD38+, HLA-DR+) eran mayores en pacientes con FI. La proporción de células T (CD4+ y CD8+) en ciclo celular (marcador nuclear Ki-67) también fue mayor en pacientes con FI.  $P < 0.001$ . Además propone que la activación e inflamación podría ser consecuencia de la translocación microbiana; es decir exposición persistente del sistema inmune a productos bacterianos ya que identificó incremento en los niveles plasmáticos de sCD14 (receptor soluble para el lipopolisacárido de los monocitos/macrófagos) e interleucina 6 (IL-6). En el análisis multivariado, la depleción de células naïve, la activación inmune (expresión de CD38+ y HLA-DR), la activación celular y los niveles de sCD14 son característicos de los pacientes con FI.

Lu (Lu, et al., 2016) en un estudio con 38 pacientes con nadir de TcCD4+ menor a 350 cel/mm<sup>3</sup> a los dos años de seguimiento y 18 controles sanos; identificó incremento en el número de cTCD8+ activadas (CD38+ HLA-DR+) en NRI (<350cel/mm<sup>3</sup>), comparado con respondedores inmunológicos (>500cel/mm<sup>3</sup>).

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

Recientemente se ha asociado la falla de RI con alteraciones funcionales y estructurales en la mucosa intestinal, se ha observado que los NRI tienen inadecuada reconstitución inmunológica en la sangre y mucosas. (Rueda, Velilla, Chougnnet, & Rugeles, 2015) El daño a la mucosa intestinal y la traslocación bacteriana juegan un papel muy importante en el estado proinflamatorio; Somsouk (Somsouk, et al., 2015) en su trabajo basado en biopsias de colon de 73 sujetos: sanos, infectados por VIH sin tratamiento, NRI o RIs; observó que los NRI no tenían proliferación epitelial a pesar de elevación local de neutrófilos; concluyendo que la cuenta de cTCD4+ se relaciona con la proliferación epitelial. (Aissani B, et al., 2014)

La expresión de integrina alfa4 beta7 ( $\alpha4\beta7$ ) por parte de los cTCD4+ es responsable de la localización de células T en tejidos linfoides asociados a intestino. Los niveles sanguíneos de cTCD4+  $\alpha4\beta7$  correlacionan con los niveles en la mucosa intestinal y rectal. Girard (Girard, et al., 2016) midió los marcadores de tropismo intestinal (CCR9, CCR6, y  $\alpha4\beta7$ ) en NRI, RI y controles sanos; y observó una sobre-expresión de  $\alpha4\beta7$  a la superficie de las células T en sangre periférica en el grupo de NRI; esta alteración se traduce por efectos deletéreos en la reconstitución del tejido linfoides gastrointestinal o GALT (por sus siglas en inglés gut-associated lymphoid tissue) ya que las células destinadas a irse al GALT se quedan en la sangre.

Las células T reguladoras (Treg), regulan a la baja la activación inmune patológica; el número de las Treg disminuye en la infección crónica por VIH y se incrementa con el TAR. Las células Th17 son componentes importantes de la mucosa intestinal que mantienen la integridad de la mucosa. Las Th17 y Tregs comparten una vía de maduración y tienen una función opuesta para controlar la respuesta inflamatoria a la infección; Treg inhiben la autoinmunidad y las células Th17 inducen lesión de los tejidos. (Kolte L, et al., 2009); (Lim A, 2007) En los NRI se incrementa la frecuencia de las células Th17 y Treg en comparación con RIs y controles sanos. (Lund, Hsing, Pham, & Rudensky, 2008); (Li, Gowans, Chougnnet, Plebanski, & Dittmer, 2008)

Saison (Saison J, et al., 2015) en un estudio prospectivo con 58 pacientes con cTCD4+ <500 cel/mm<sup>3</sup> a dos años de TAR, observaron que el porcentaje de Treg (cTCD4+ CD25-CD127-) basales es un factor pronóstico independiente de la recuperación inmunológica, particularmente en pacientes con nadir de cTCD4+ bajo.

A pesar de la SV en sangre, existe una replicación viral en los tejidos linfoides; esto se conoce como viremia residual de bajo nivel (VBN); Mavigner M, (Mavigner, et al., 2009) identificó que la viremia residual medida por técnicas ultrasensibles, tiene un impacto en la respuesta inmunológica; los NRI tenían mayor

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

viremia residual (mediana, 6.6 copias/ml, n= 10) comparado con RIs (mediana 1.2 copias/ml, n= 13) ( $P < 0.05$ ). La VBN es un factor de estímulo proinflamatorio, asociado con la producción de citocinas y otros factores inflamatorios como IL-6 y dímero D (DD), cuyos niveles se asocian con mayor mortalidad, incluso en pacientes con SV.

Schuler, et al., (Schuler, et al., 2013), en un estudio con 36 pacientes y 10 controles sanos, observó una correlación inversa con la Proteína C reactiva (PCRe) en plasma y los niveles de cTCD4+, sin embargo, no encontró asociación entre los niveles de VBN y los cTCD4+ activados. Asimismo, la elevación de PCRe es un marcador de progresión de la enfermedad e incremento en el riesgo cardiovascular. (Masiá, et al., 2007); (Lau, et al., 2006)

Otras células implicadas en la RI son las células T CD3+CD4-CD8- (doble negativo o DN); que producen una regulación a la baja de la activación inmune mediante la producción de TGF- $\beta$ 1. (Lu, et al., 2016)

### ***Incremento en la apoptosis.***

Se ha observado un incremento en la apoptosis celular en los NRI, demostrada por la presencia de marcadores de fatiga y senescencia inmunológica, como la expresión de moléculas de muerte programada (programmed death-1; PD-1) en las células T, comparados con el grupo RI. (Grabmeier-Pfistershammer K, 2011)

En este contexto, las coinfecciones favorecen la apoptosis celular; la FI se ha relacionado principalmente a coinfección con tuberculosis, citomegalovirus (CMV) y virus de la hepatitis B y hepatitis C. (Junge, et al., 2007) La infección crónica por CMV medido por alta proporción de células T específicas para CMV y la viremia de CMV; se asocia a inmunosenescencia. (Appay V, 2011)

Chun, (Chun HM, 2014) documentó que los pacientes con coinfección por VIH y VHB (virus de hepatitis B); progresan más rápido a SIDA y muerte, en comparación con los pacientes mono infectados por VIH. Ravimohan et al., (Ravimohan S, 2013) evaluó la respuesta inmunológica en pacientes con tuberculosis pulmonar a 4 semanas de TAR e identificó que la alteración de la respuesta inmunológica es mayor durante la coinfección con tuberculosis (VIH/TB). (Assefa A, 2014)

Los polimorfismos de los genes del receptor Fas (CD95), ligando Fas (CD178), y de IL-6 se asocian a menor reconstitución del sistema inmune. Los polimorfismos genéticos en los haplogrupos L2a, L2b y

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

L2e, de ADN mitocondrial (mtDNA); están asociados con la caída de las cTCD4+ en pacientes VIH sin TAR. El principal factor genético asociado a la RI son las mutaciones en el coreceptor de citocinas receptoras tipo 5 (CCR5); los sujetos con polimorfismos homocigotos en CCR5, como CCR5-delta32, CCR5 59029A/G y CCR2-641; tienen activación persistente de células T, sin embargo no se ha encontrado una asociación directa con la respuesta al TAR. (Pinzone, Di Rosa, Cacopardo, & Nunnari, 2012); (Prabhakar, Banu, Pavithra, Chandrashekhara, & Sastri, 2011)

### **IMPLICACIONES CLINICAS**

Las implicaciones clínicas de los NRI son: mayor riesgo de progression a SIDA, incremento de infecciones oportunistas, de enfermedades no asociadas a SIDA y mayor mortalidad a pesar de estar en supresión virológica.

Lapadulaa (Lapadulaa, et al., 2013) en un estudio con 3378 pacientes seguidos por 32 meses describió los diferentes desenlaces clínicos, en NRI (cTCD4+ actuales <120% con respecto al basal) y en RI. Identificó una tasa de eventos clínicos en NRI de 4.41 (IC 95% 3.38-5.74) y de 1.84 en RI (IC 95% 1.58-2.15) por cada 100 personas/año de seguimiento, (P <0.001). Los eventos clínicos en el grupo NRI eran: 32 muertes, 39 eventos definitorios de SIDA, 48 tumores malignos, 32 infecciones graves, 47 lesiones renales agudas, 12 eventos cardiovasculares y 12 otros eventos no mortales.

### **TRATAMIENTO**

Hasta el momento no existe un consenso para el abordaje de los pacientes en FI, sin embargo existen múltiples propuestas dirigidas al TAR, a reducir la viremia residual y a suprimir la respuesta inflamatoria.

El potencial regenerativo de las cTCD4+ disminuye con la duración de la infección no tratada. El inicio temprano del TAR es una de las medidas propuestas para evitar la caída de las cTCD4+ y reducir el reservorio viral. En pacientes con infección temprana documentada que empezaron con el TAR dentro de los 4 meses post diagnóstico de infección, se observó una mayor restauración celular, alcanzando niveles sanguíneos > 900cel/mm<sup>3</sup>. (Okoyee & Picker, 2013); (Battegay, Nüesch, Hirschel, & Kaufmann, 2006)

Previamente, se proponía cambiar el TAR a inhibidores de proteasa puesto que en estos pacientes se han observado mayor recuperación de las células T; Wang (Wang Q, 2014) identificó que el uso de inhibidores de proteasa, especialmente atazanavir/ritonavir, se asocia a mayor incremento en la cuenta

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

de cTCD4+ en comparación con pacientes que reciben Efavirenz; sin embargo, solo se observó esta diferencia en los primeros 12 meses de tratamiento. Pinzone (Pinzone, Di Rosa, Cacopardo, & Nunnari, 2012); documentó que agregar Maraviroc al TAR redujo los niveles de activación de las células T CD4+ y CD8 +, indujo un mayor incremento de cTCD4+ a la semanas 48 y 96 después del inicio el TAR; sin embargo, otros grupos consideran como innecesario, e incluso, riesgoso iniciar medicamentos de segunda línea en pacientes con adecuada SV. Sin embargo no existen ensayos clínicos que respalden esta opción terapéutica. (Pinzone, Di Rosa, Cacopardo, & Nunnari, 2012); (Prabhakar, Banu , Pavithra, Chandrashekhara , & Sasthri , 2011); 64 (Wang Q, 2014)

Entre las posibles estrategias para reducir la viremia residual y el estímulo inflamatorio se proponen: (Pinzone, Di Rosa, Cacopardo, & Nunnari, 2012)

**Probióticos.** Estos tienen efectos inhibidores de los productos bacterianos (antagonistas del receptor-4 Toll-Like y del receptor para lipopolisacáridos, LPS) e inhibidores de citocinas proinflamatorias (anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 o anti-TNF- $\alpha$ ). Los estudios con probióticos han indicado un potencial de los mismos en regular la microbiota intestinal, sin embargo aún se encuentra en estudio la relevancia clínica de los mismos. (Wang Q, 2014)

**Hidroxicloroquina (HCQ)**, debido a su efecto inmunomodulador, Piconi (Piconi S, 2011) analizó el impacto de la HCQ en la activación inmune, en una cohorte de 20 pacientes que iniciaron TAR, encontrando una reducción significativa en los niveles plasmáticos del LPS y IL-6/TNF- $\alpha$ ; estos efectos se mantuvieron a 2 meses después de suspender la HCQ, sin embargo no se identificó un incremento importante en la cuenta de cTCD4+.

**Estatinas.** Estas tienen un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, reducen el porcentaje de cTCD8+ activadas (CD38+); sin embargo no afectan los niveles de PCR $\epsilon$  ni la respuesta de cTCD4+. (Pinzone, Di Rosa, Cacopardo, & Nunnari, 2012)

**Erradicación de infección por *H. Pylori*.** La infección por *H. pylori* estimula los monocitos y macrófagos, e induce una respuesta tipo Th1 incrementando la expresión de CCR5 en células T. Recientemente Magen (Magen, Elbirt, Agmon-Levin , Mishal, & Stthoeger, 2017) en un estudio abierto, no aleatorizado con 26 NRI con prueba de urea en el aliento positiva, observaron un incremento en la cuenta total del cTCD4+ en los 11 pacientes que recibieron tratamiento de erradicación contra *H pylori*; esta

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

diferencia se mantuvo al año y hasta los 21 meses posterior al tratamiento, comparado con el grupo que no recibió la erradicación ( $p < 0.05$ ), pero no observaron diferencias a dos años de seguimiento.

**Administración de interleucinas recombinantes.** Se ha probado el papel fisiopatológico de las interleucinas; sin embargo, actualmente se está estudiando su relevancia clínica en el tratamiento coadyuvante de los antiretrovirales. La IL-2 se produce por cTCD4+ activados, y sus niveles se encuentran disminuidos en pacientes con infección por VIH; la administración temprana de interleucina recombinante 2 (rIL-2), disminuye la depleción de cTCD4+, promueve la proliferación de células T CD8+ e inhibe la replicación del VIH. (Pinzone, Di Rosa, Cacopardo, & Nunnari, 2012)

La interleucina recombinante 7 (rIL-7) favorece el aumento sostenido en las células T mediante estimulación de la timopoyesis a través de la vía Jak-Stat. Clínicamente se traduce en un aumento en la supervivencia de las cTCD4+. La IL-15 favorece la supervivencia y la proliferación de células NK, que a su vez ejercen un efecto citotóxico directo controlando a la replicación del VIH. (Pinzone, Di Rosa, Cacopardo, & Nunnari, 2012); (Hiébaud R, 2014)

**La terapia con IFN- $\alpha$**  puede incrementar la reconstitución y respuesta de las cTCD8+ efectoras contribuyendo a mejor control de la viremia. (Havers, et al., 2014)

**Vitamina D.** Otra opción coadyuvante en la terapéutica es la administración de vitamina D; ya que la mayoría de los pacientes infectados con el VIH-1 tienen deficiencia grave de esta vitamina, la cual se asocia a menor respuesta inmunológica y a incremento en marcadores inflamatorios. Existe un beneficio en la adición de vitamina D al TAR, ya que tiene un efecto inmunomodulador, mediante la estimulación de subpoblaciones de células hematopoyéticas (monocitos, macrófagos). (Havers, et al., 2014)

En estudios clínicos, la deficiencia de vitamina D, se asoció a incremento en la mortalidad y progresión de la infección, en cambio; la suplementación durante 6 a 12 meses en estos pacientes, resultó en menores niveles de activación inmune. (Viard JP, et al., 2011), (Conesa-Botella, et al., 2009); (Fabre-Mersseman, et al., 2014); (Reuter, Pombo, & Betts, 2012)

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

### **JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La prevalencia del VIH en México es de 0.3%; según datos de CENSIDA (Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH y el SIDA , 2014), 89 410 pacientes se encuentran recibiendo TAR, la incidencia de FI es muy variable, oscila del 14 al 33%, en diversas cohortes, sin embargo se desconoce la incidencia en nuestra población. Entre los posibles factores de riesgo se han mencionado: cuenta basal de cTCD4+ menor a 100 cel/mm<sup>3</sup>; mala adherencia al tratamiento y ser del sexo masculino.

La FI con SV, se ha incrementado debido al mayor acceso al TAR y representa uno de los principales problemas de salud actuales, ya que no se encuentra estandarizado el abordaje de diagnóstico y las opciones terapéuticas. La importancia clínica radica en su asociación a un estímulo inflamatorio persistente, que se relaciona con mayor riesgo teórico de enfermedades cardiovasculares y metabólicas; sin embargo se desconoce su importancia en la incidencia de infecciones oportunistas.

Hasta el momento no existe un consenso para el abordaje de los pacientes en FI, se han propuesto diversas opciones terapéuticas, como realizar modificaciones en el TAR o adicionar medicamentos costosos, de difícil acceso y con efectos secundarios graves. Se propuso recientemente el cambio de tratamiento a regímenes de segunda línea, sin embargo, esto conduce a la pérdida subsecuente de una línea de opciones terapéuticas e implicaciones económicas para los programas de salud; sin embargo, se ha observado que la FI puede ser reversible y aproximadamente 60% de los pacientes recuperan la cuenta celular de cTCD4+ a partir de 6 años de TAR.

La FI representa uno de los problemas de salud actuales en el seguimiento de pacientes infectados por VIH, debido a que se ha incrementado el acceso universal al TAR. Consideramos importante conocer la incidencia de la falla al TAR, y en particular la incidencia de FI y estudiar los factores demográficos y clínicos que podrían asociarse con la FI en una cohorte de pacientes que inician TAR en el CIENI.

El presente estudio pretende identificar la incidencia de la FI en una cohorte de pacientes del INER que inician su primer régimen de TAR así como el papel del estado inflamatorio en su presentación y otros factores de riesgo. Es por eso que nos planteamos la siguiente pregunta:

**¿Cuál es la incidencia de la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH en tratamiento antirretroviral supresivo?**

# Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

- Identificar la incidencia de la falla inmunológica, en una cohorte de pacientes del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER

### **Objetivos secundarios**

- Identificar la incidencia de la falla al tratamiento en general en una cohorte de pacientes del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER
- Describir el estado clínico de los pacientes infectados por VIH naive al TAR y seguir la evolución de los parámetros clínicos a 2 y 6 meses de iniciar el TAR
- Describir el estado inflamatorio mediante la cuantificación de los niveles plasmáticos de PCR $\alpha$ , DD, IL- 6 en pacientes con o sin falla inmunológica antes del inicio del TAR y a 2 y 6 meses despues del inicio del TAR

## **HIPÓTESIS**

La incidencia de falla inmunológica a seis meses de seguimiento en una cohorte de pacientes mexicanos que inicien su primer régimen de tratamiento antirretroviral será del 10%.

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **a) Diseño del estudio**

Investigación clínica

#### TIPO DE ESTUDIO

Estudio de Cohorte anidada, observacional, prospectivo y longitudinal

#### **Lugar del estudio.**

Departamento de investigación en enfermedades infecciosas del INER (CIENI)

### **b) Descripción de la población de estudio**

#### Criterios de Inclusión

Pacientes nacidos en México, mayores de 18 años, con infección por VIH documentada candidatos a iniciar su primer régimen de TAR.

#### Criterios de Eliminación

Pacientes que cursen con falla virológica asociada a mala adherencia al TAR (menor al 80% de las tomas por mes) referida en dos citas

Los pacientes que no acudan a una cita de seguimiento, defunciones y casos de falla virológica no asociada a mala adherencia, serán eliminados del estudio, sin embargo los datos proporcionados, serán censurados

### **b) Tamaño de muestra**

El tamaño de muestra calculado fue de 124 pacientes para una cohorte observacional, con una incidencia esperada de 10%, con nivel de confianza del 95% a dos colas, e intervalos de confianza de 5%.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q} = 124$$
$$(0.05)^2 \times \frac{1200 \times (1.96)^2 \times 0.1 \times 0.9}{(1200 - 1) + (1.96)^2 \times 0.1 \times 0.9}$$

- N = 1200
- Confianza 95% ( $Z_{\alpha} = 1.96$ )
- p = incidencia esperada (10% = 0.1)
- q = 1 - p (0.9)
- d = precisión 5%

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

### **d) Procedimiento del estudio.**

Se invitó a participar, mediante un consentimiento informado a los pacientes que acudan al Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (CIENI/INER) o que se encuentren en el área de hospitalización del INER y cumplan los criterios de inclusión.

Una vez que el paciente consintió participar en el protocolo mediante la firma del consentimiento informado; se programó la cita para la toma de muestra e inicio del TAR dentro de los 5 días, el día de la toma de muestra se le proporcionó al paciente receta e indicaciones para la toma del TAR, así como las principales reacciones adversas.

Posterior a cada toma de muestra, se proporcionó una valoración por Infectología en las siguientes dos semanas. Durante la entrevista basal, se documentaron los datos socio-demográficos y clínicos, con enfoque en los antecedentes de la infección por VIH y los factores de riesgo para falla al tratamiento, enfermedades infecciosas, cardiovasculares y metabólicas.

El régimen de tratamiento se indicó según las recomendaciones nacionales e internacionales, así como las existencias en el programa nacional, y fué individualizado para cada paciente según las características particulares, así como los resultados del genotipo viral; el momento del inicio del tratamiento ni el tipo de TAR fueran modificados por participar o no en el estudio.

Posterior a la evaluación basal, se realizó seguimiento clínico y de laboratorio a los meses: 2 y 6 (T2 y T6). Se seguirá con el seguimiento clínico de todos los pacientes que ingresaron al protocolo a los 12 y 18 meses (T12 y T18).

A cada visita se documentaron las siguientes variables: régimen de tratamiento, apego al TAR en porcentaje, índice de masa corporal (IMC), tabaquismo, comorbilidades, eventos cardiovasculares o infecciosos, actualización en el esquema de inmunización, profilaxis para infecciones por oportunistas, así como la presencia de enfermedades infecciosas de cualquier índole. Signos positivos a la exploración física.

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

La determinación de estudios serológicos de infección por virus de la hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC) y sífilis (VDRL) se realizaron a T0 (basal) y se volvieron a realizar a T12 (al año de TAR). Los pacientes con más de 200 cTCD4+ y anticuerpos de superficie negativos para VHB serán enviados a inmunización.

Para evaluar la respuesta al tratamiento, en cada visita se determinaron las poblaciones linfocitarias (CD45, CD4, CD8, razón CD4/CD8), viremia (carga viral) y búsqueda de infecciones por microorganismos oportunistas. La falla al tratamiento se clasificó en tres subgrupos de acuerdo con las guías de la OMS: falla clínica, falla inmunológica y falla virológica. Los pacientes que cursen con falla clínica y falla virológica durante el seguimiento serán eliminados del estudio pero seguirán recibiendo atención clínica por parte del CIENI-INER.

Los pacientes que no acudieron a una de las citas acordadas para toma de muestra y valoración clínica; fueron eliminados; sin embargo los datos previamente obtenidos, se usaron en el análisis y fueron censurados.

Los pacientes que cursen con síndrome de reconstitución inmunológica (SIRI), serán analizados en cada subgrupo.

La falla clínica se consideró en los casos de infecciones por oportunistas después de 3 meses de tratamiento, en pacientes con adecuada SV y RI, que no se asocien a SIRI.

Se consideró como falla virológica a los pacientes que a los 6 meses se encontraban con CV detectable (> 200 copias/mL) en dos tomas consecutivas. Los pacientes en falla virológica no asociada a mala adherencia, continuarán en el estudio, sin embargo se analizarán por separado.

Para clasificar los pacientes en falla inmunológica a los 6 meses de tratamiento, se usarán los criterios de la OMS: 1) Cuenta de cTCD4+ igual o por debajo del basal, 2) caída del 50% de cTCD4+ del pico máximo y sostenido, 3) Cuenta de cTCD4+ consistentemente menor a 100 cel/mm<sup>3</sup>.

Para identificar los factores de riesgo asociados a falla inmunológica; se realizará la determinación de interleucina IL- 6 por ELISA. El estado pro inflamatorio se evaluó con la determinación de los niveles plasmáticos de DD, PCRe, VSG, a cada visita.

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

Para la determinación de la incidencia de falla inmunológica y factores de riesgo, se analizaron a todos los pacientes incluidos en la cohorte; se compararán resultados del grupo de pacientes con o sin falla inmunológica a los 6 meses.

Los estudios que se solicitaron acada visita de laboratorio, se describen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Seguimiento clínico y estudios de laboratorio que se realizaron a cada visita

<b>Estudio de Laboratorio</b>	<b>Visita basal (T0)</b>	<b>2 meses (T2)</b>	<b>6 meses (T6)</b>
Valoración por infectología			
Biometría hemática			
Química sanguínea			
Pruebas de función hepática			
Perfil de lípidos			
Proteína C reactiva			
Dímero D			
Serología hepatitis B			
Serología hepatitis C			
VDRL			
Carga viral VIH			
Subpoblación de linfocitos			
Genotipo viral			
Interleucina 6			
Electrocardiograma			

Tabla 1. Se marcan en gris los estudios de laboratorio reslizados para cada visita. La valoración por infectología se realizó en los primeros 7 (máximo 14) días posterior a la toma de muestra. VDRL= Venereal Disease Research Laboratory

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## **e) Procesamiento de muestras sanguíneas**

### **Obtención y congelación de la muestra**

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los brazos de los participantes. La extracción total de sangre fue de 86 ml en la primera visita, de 64ml a T2 y de 74 ml a T6. Treinta y seis mL distribuidos en 6 tubos de EDTA de 6mL fueron destinados para investigación a T0, T2 y T6; y se procesaron en el laboratorio de bioseguridad nivel 2. Inmediatamente tras su obtención (dentro de los primeros 20 minutos), las muestras de sangre periférica se centrifugaron para la separación del plasma; con las siguientes especificaciones: 3000 revoluciones por minuto (rpm), durante 10 minutos, a temperatura 20°, con 9 segundos de aceleración y 9s de desaceleración. Se separaron 5ml de plasma en tubos de 1mL y se almacenaron inmediatamente a -80° C.

### **Descongelación de la muestra**

Las muestras de plasma se descongelaron a temperatura ambiente dentro de la campana de flujo laminar y se clarificaron las muestras por centrifugación a 13,000 x g por 10 mins a 4 ° C.

### **Determinación de IL-6.**

La cuantificación de IL-6 en plasma se realizó mediante el inmunoensayo de IL-6 humana de alta sensibilidad (*Human Quantikine HS ELISA, R&D systems*); estandarizado para muestras en plasma, suero y orina. Se utilizaron tres placas de 96 pocillos cada una; todas las muestras se procesaron el mismo día (12 de enero 2017). A cada placa se corrieron 7 diluciones seriales del estándar, un blanco y las muestras de plasma; todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Esta prueba tiene una sensibilidad mínima de detección de 0.016-0.11 pg/mL.

## **PREPARACIÓN DEL MATERIAL**

La preparación del material se realizó durante la descongelación de las muestras.

Concentrado de buffer de lavado

Solución de sustrato,

Solución amplificadora

Diluyente calibrador RD6-11

Estándar HS de IL-6 humana

### **Solución buffer**

Se homogeneizó con el vórtex.

Se añadieron 100mL de buffer de lavado a 900mL de agua destilada/des-ionizada

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

### **Solución sustrato**

Se reconstituyó el sustrato liofilizado con 6 ml de sustrato diluyente; 10 minutos antes de su uso y se cubrió para evitar la contaminación. Se homogeneizó con vórtex

### **Solución amplificadora**

El liofilizado amplificador se reconstituyó con 6mL de diluyente amplificador 10 minutos antes de su uso y se cubrió para evitar la contaminación. Se homogeneizó con vórtex

### **Diluyente calibrador RD6-11**

Se utilizó el concentrado del diluyente calibrador RD6-11 sin diluir.

### **Estándar de IL-6 humana HS**

1. Se reconstituyó la solución estándar de IL-6 humana HS con el concentrado del diluyente calibrador RD6-11. Se permitió reposar 15 minutos con agitación suave antes de hacer las diluciones seriales.
2. Se pipetearon 500ul de la estándar reconstituido en el tubo 1 (Estándar 1 (10pg/mL)) y se repitió el mismo paso para hacer una serie de diluciones, antes de transferir la muestra a cada tubo, se mezcló completamente. En total se produjeron 7 diluciones correspondientes a: estándar 2 (5pg/mL), estándar 3 (2.5pg/mL), estándar 4 (1.25pg/mL), estándar 5 (0.625pg/mL), estándar 6 (0.313pg/mL), estándar 7 (0.156pg/mL) y estándar 8 (0.078pg/mL).

### **PROCEDIMIENTO**

1. Se removió la cinta del borde de la placa.
2. Se añadieron 100uL de diluyente RD1-75 a cada pocillo; previamente se homogeneizó el diluyente
3. Se añadieron 100uL de cada estándar, blanco (diluyente RD1-75), y muestras a cada pocillo. Se cubrió con la cinta adhesiva y se incubó a temperatura ambiente por dos horas en un agitador de órbita horizontal (12") a 500rpm.
4. Posteriormente se realizó el Primer lavado para eliminar sustancias no unidas (exceso de Ac primario),
  - Se eliminó el líquido sobrante con decantación por inversión de la placa.
  - Posteriormente se secó la placa con papel
  - Se llenó cada pocillo con 400uL de buffer de lavado.
  - Se removió el líquido nuevamente con inversión de la placa
  - Se repitió el procedimiento 5 veces
5. Se añadieron 200uL del conjugado de IL-6 humana HS a cada pocillo. Se cubrió con una cinta adhesiva y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en el agitador.
6. Se realizó un segundo lavado con el mismo procedimiento

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

7. Se agregaron 50  $\mu$ L de solución sustrato a cada pocillo. Se cubrió con una cinta adhesiva y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos, sin agitar.
8. Se agregaron 50  $\mu$ L de solución amplificadora a cada pocillo. Se cubrió con una cinta adhesiva y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, sin agitar
9. Se agregaron 50  $\mu$ L de solución de parada a cada pocillo.
10. Se determinó la densidad óptica de cada pocillo los primeros 30 minutos usando un lector de microplato de 490nm.

## MEDICIÓN DE LOS RESULTADOS

Se creó una curva estándar usando un software capaz de generar una curva de ajuste de 4 parámetros logísticos (4-PL). Se tomó el promedio de la densidad óptica de las lecturas para cada muestra por duplicado.

### **e) Limitación de riesgos de sesgo.**

El tamaño de muestra se estimó con un 10% de pérdidas por abandono esperado para el tipo de estudio. Se limitó el riesgo de pérdidas al seguimiento mediante recordatorios mediante llamadas telefónicas y mensajes de texto realizados el día previo a la toma de muestra.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron censurados para los siguientes desenlaces: abandono del seguimiento, falla virológica o muerte. Las variables cualitativas; se analizarán con frecuencias absolutas y relativas. Las cuantitativas, con media  $\pm$  desviación estándar.

La incidencia de falla al tratamiento antirretroviral se reportó en porcentaje, el análisis se realizó por intención a tratar y por protocolo; el análisis por protocolo solo incluyó a los pacientes que completaron 6 meses de seguimiento.

Se describen las características de los sujetos en FI y se compararon con el grupo sin FI; las variables categóricas se compararon mediante la prueba de  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher y las variables continuas mediante la T de student, la prueba de Mann-Whitney o Wilcoxon. Una p menor a 0.05 se consideró significativa

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El presente trabajo observacional con obtención de muestras biológicas para determinar el patrón inflamatorio de cada participante, fue aprobado por el comité de bioética e investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias; conforme los estatutos internacionales, clave de autorización C59-15. (**anexo 1**)

Todos los procedimientos están de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud:

Título segundo, capítulo I, Artículo 14, Sección V

Título cuarto capítulo I, Artículo 75, Sección I-VII y *artículo 79*

Se realizó una investigación de riesgo menor, todos los participantes que cumplieron con los criterios de selección, fueron invitados a participar en el estudio y autorizaron mediante un consentimiento informado por escrito. El tratamiento se decidió según el régimen tratamiento de primera línea sugerido por las guías mexicanas e internacionales, y fue individualizado para cada paciente según sus características clínicas y potenciales riesgos de toxicidad; el momento del inicio del tratamiento, ni el tipo de TAR serán alterados por participar en el estudio. No se condicionó a los pacientes con el seguimiento clínico ni en el laboratorio por la participación en este proyecto. Los estudios requeridos para el desarrollo del protocolo, así como las valoraciones clínicas por el Infectólogo, no tendrán costo alguno para los pacientes durante su participación en el estudio

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## **RESULTADOS**

Durante el periodo de 28 de enero de 2016 al 31 de enero de 2017, se invitó a participar a los pacientes que acudieron al Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER para atención y a pacientes hospitalizados en el INER con diagnóstico de infección por VIH, candidatos a iniciar su primer régimen de tratamiento antirretroviral. De los 86 pacientes elegibles para el estudio, 65 aceptaron participar en el protocolo de investigación mediante firma de un consentimiento informado (adjunto). 21 pacientes no formaron parte del estudio por varias razones; 9 pacientes deseaban continuar el seguimiento en su estado de residencia y 12 pacientes por otros motivos. De los 65 pacientes que ingresaron al protocolo, 1 paciente fue eliminado ya que no inició el tratamiento antirretroviral.

En total, se presentan resultados de 64 pacientes; 58 acudieron a la visita T2 y 34 a T6. Once pacientes (17%) fueron censurados para el seguimiento; los motivos fueron: 6 violaciones al protocolo (2 no acudieron a las visitas de seguimiento y 4 suspendieron el tratamiento antirretroviral) y 5 defunciones; el total de pérdidas al seguimiento fue de 9.3%. La **figura 2** muestra el diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio.

Las características demográficas de la cohorte (n=64) son: hombres (n=51, 80%); mujeres (n=11; 17%) y mujeres trans (n=2; 3%). La mediana de edad es de 37 años ( $\pm$  DE 11.2; rango 20-64 años). 88.2% de la población (n=45/51 y no 64) corresponde a hombres que tienen sexo con hombres.

Para la mayoría de los pacientes el diagnóstico de infección por VIH se realizó durante el estudio de la infección oportunista o síndrome de desgaste (n=44, 72%), solo 28% (n=17), se diagnosticaron durante screening. 17 (26.56%) pacientes refirieron usar drogas con fines recreacionales más de 2 días a la semana o en el caso de tabaquismo un índice tabáquico mayor de 10; las drogas más usadas fueron: tabaco y marihuana (21.8 y 20.3%, respectivamente), seguido de cocaína (9.4%) y alcohol (6.2%).

La mediana de seguimiento fue de 125 días ( $\pm$  DE 65) y correspondiente a 7805 días/paciente. En la **tabla 2**, se describen las características basales de la población en estudio.

Entre las principales enfermedades cardiometabólicas destacan: diabetes Mellitus 2 (DM2) e hipotiroidismo (ambas n=3; 4.8%) seguido de hipertensión arterial sistémica (n=1; 1.6%).

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

**Figura 2.** Diagrama de flujo de los participantes del estudio.

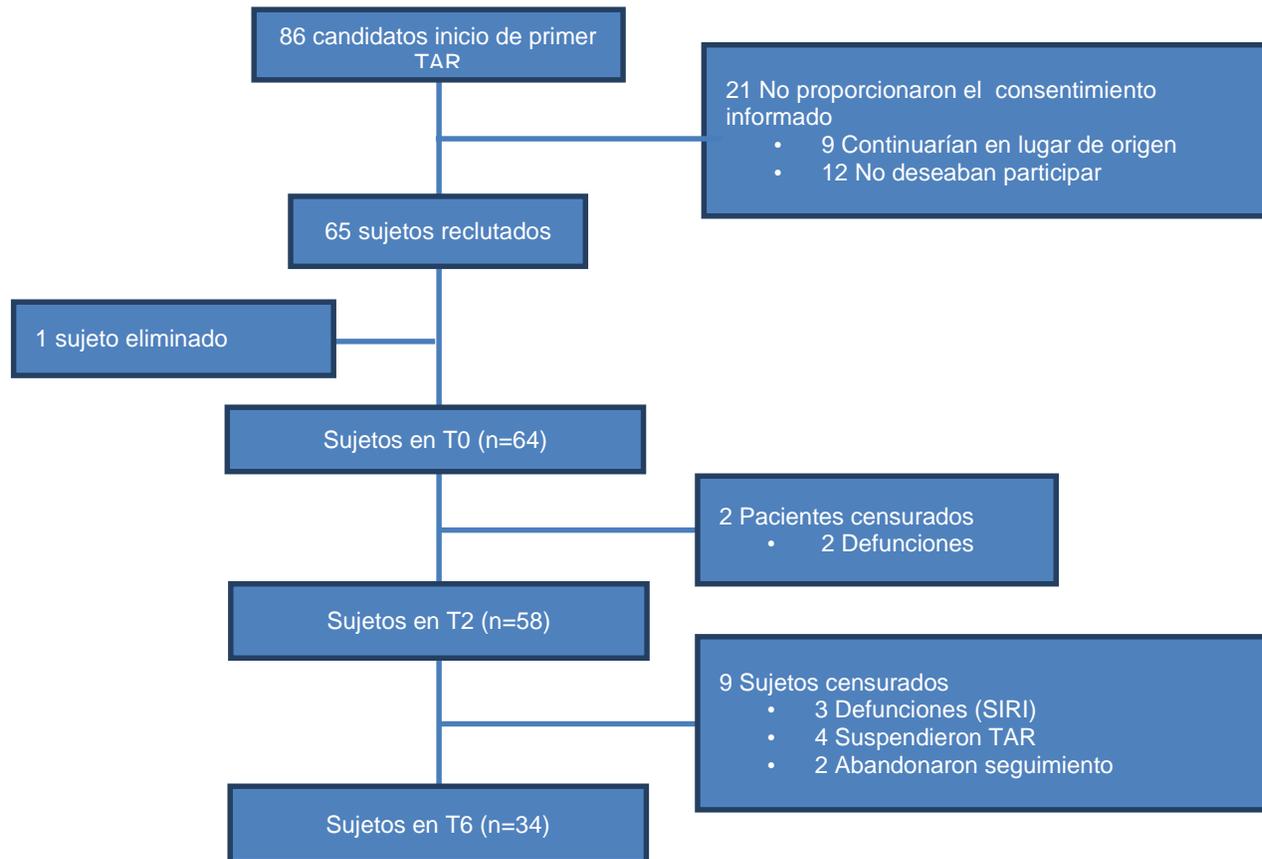


Figura 2. De los 86 pacientes invitados a participar en el estudio; 65 firmaron el consentimiento informado; un paciente se eliminó por no iniciar el TAR. Se incluyeron 64 pacientes para el análisis y caracterización basal de la cohorte; para el análisis comparativo se incluyen a 34 pacientes en supresión virológica a T6.

Al inicio del TAR; 43 (67%) pacientes estaban recibiendo tratamiento para enfermedades relacionadas a SIDA; la infección oportunista más frecuente fue la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, afectando a casi la mitad de los individuos 30 (47%), seguido de tuberculosis (n=7; 11.3%); enfermedad por citomegalovirus (n=5; 7.8%) que corresponden retinitis (n=3) y neumonitis (n=1); colitis (n=1); histoplasmosis (n=4; 6.5%), MAC (n=3; 4.7%); bacteremia por *Salmonella* spp. (n=2; 3.2%), Candidiasis esofágica (n=2; 3.2%) y Criptococosis diseminada 1 (1.6%), Otras infecciones documentadas fueron: Neumonía bacteriana (n=4; 6.5%), Sífilis ocular o neurosífilis (n=4; 6.5%), sífilis latente tardía (n=2; 3%), Hepatitis B crónica (n=1; 1.56%= 1.6%) y Hepatitis C crónica (1; 1.56%). Todas las infecciones, incluyendo hepatitis C, fueron tratadas. Tres pacientes (4.7%) presentaron Sarcoma de Kaposi de afección mucocutánea. Otras neoplasias fueron: liposarcoma y adenocarcinoma renal (n=1; 1.6% cada una).

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

**Tabla 2.** Características demográficas y clínicas basales (T0) de la población previo al inicio del TAR

Variable	Total (N=64)
Género	
Hombre	51 (80%)
Mujer	11 (17%)
Mujer trans	2 (3%)
Edad (años)	37 (± DE 11.2)
Uso de Drogas	(n=17)
Etilismo moderado-intenso	4 (6.2%)
Índice Tabáquico >10	14 (21.8%)
Marihuana	13 (20.3%)
Cocaína	6 (9.4%)
Drogas IV	1 (1.6%)
Enfermedades cardiometabólicas	(n=6)
DM2	3 (4.8%)
Hipotiroidismo	3 (4.8%)
HAS	1 (1.6%)
Diagnóstico de la infección por VIH	
Enfermedad definitiva de SIDA/	
Síndrome de desgaste	45 (70%)
Screening	19 (30%)
Principales IO y Coinfecciones	(n=44)
Citomegalovirus	5 (7.8%)
Hepatitis B crónica	1 (1.6%)
Hepatitis C crónica	1 (1.6%)
Histoplasmosis	4 (6.3%)
MAC	3 (4.7%)
Neumonía bacteriana	4 (6.5%)
Neumonía por <i>P. jirovecii</i>	30 (47%)
Tuberculosis	7 (11.3%)
Neoplasias	
Sarcoma de Kaposi	3 (4.7%)
Otras neoplasias	2 (3.2%)
Régimen de TAR	
2 ITRAN + EFV	55 (86%)
2 ITRAN + ATV/R	3 (4.7%)
2 ITRAN + INSTI	6 (9.4%)
Carga viral VIH (copias/mL)	382,539 (± DE 489 841)
Log Carga viral VIH	5.1 (± DE 0.69)
Células T CD4+ (cel/mm <sup>3</sup> )	1155 (± DE 888)
cTCD4+ (cel/mm <sup>3</sup> )	143 (± DE 196)
cTCD8+ (cel/mm <sup>3</sup> )	700 (± DE 586)
Carga viral VEB	3192 (± DE 5389)
Carga viral CMV	137 549 (± DE 697571)
CD4/CD8	0.21 (± DE 0.28)
PCRe (mg/dL)	3.84 (± DE 16.6)
DD (ng/mL)	1451 (± DE 1824)
IL-6 (pg/mL)	2.22 (± DE 2.6)

Tabla 2. Los resultados se presentan en total (porcentaje) para variables cualitativas y como mediana (±DE) para variables cuantitativas. DE= Desviación estándar, DM2= Diabetes Mellitus 2, HAS= Hipertensión arterial sistémica; CD4/CD8= cociente CD4/CD8; PCRe=Proteína C reactiva; DD= Dímero D, IL-6= Interleucina 6.

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

El TAR se indicó conforme a las guías nacionales (33); y fue individualizado en cada caso. La mayoría recibió 2 ITRAN + EFV (n=55; 86%); seguido de 2 ITRAN + INSTI (n=6; 9.4%) o 2 ITRAN + ATV/R (n=3; 4.7%). Cinco pacientes presentaban mutaciones de resistencia a ITRAN: K65R (n=1; 1.6%), 179 D/V (n=2; 3.2%) y TAMS (n=2; 3.2%); y dos presentaban mutaciones de resistencia a ITRAN K103N (3.2%); En los casos necesarios, se realizó ajuste del TAR guiado por genotipo dentro de las primeras dos semanas de haber iniciado.

En cuanto el estado inmuno-virológico previo al inicio del TAR (T0); la mediana de la carga viral de VIH fue de 382,539 copias/mL ( $\pm$  DE 489 841); la mediana de cTCD4+ fue de 143 cel/mm<sup>3</sup> ( $\pm$  DE 196) y de cTCD8+ de 700 cel/mm<sup>3</sup> ( $\pm$  DE 586); el cociente CD4/CD8 fue de 0.21 ( $\pm$  DE 0.28); indicando un estado avanzado de la enfermedad. Los pacientes presentaban un estado inflamatorio importante ya que la media de PCRe fue de 3.83 mg/dL ( $\pm$  DE 17.05) y el DD 1455 ng/mL ( $\pm$  DE 1872). Los valores normativos para individuos sin infección por VIH son 0.3 a 1.0 mg/dL y <500 ng/mL, respectivamente. (Kusher, 1982); (Lipsy, R J; The ATP II group, 20003) Se determinó la viremia de citomegalovirus (CMV) y de virus Epstein barr (VEB) en 40 pacientes hospitalizados; siendo de 137,549 UI/mL  $\pm$  DE 697571 y 3,192  $\pm$  DE 5389 UI/mL, respectivamente. Tres de los pacientes fallecieron; de los que sobreviven ninguno ha cursado con falla inmunológica. **(Tabla 2)**

De los 39 pacientes que acudieron a la visita T6; 34 pacientes (92%) se encontraban en supresión virológica; la disminución de la viremia a T2 fue de 2 logaritmos (5.0 a 1.99). En cuanto a la evolución inmunológica; los niveles de cTCD45+ se encuentran ligeramente inferiores al rango considerado normal, se observó una normalización de los niveles a T6; la media basal de cTCD4+ fue de 207 cel/mm<sup>3</sup> y de 384 cel/mm<sup>3</sup> a T6 (delta T6-T0= 117 cel/mm<sup>3</sup>); la mediana de cTCD8+ incrementaron de 855 cel/mm<sup>3</sup> a T0 a 1008 cel/mm<sup>3</sup> a T6 (delta T6-T0= 153 cel/mm<sup>3</sup>). Aunque la relación cTCD4/CD8 incrementó, esta se mantuvo inferior a lo niveles considerados normales. A 6 meses de TAR se presentó una normalización de los niveles de Proteína C reactiva y dímero D; indicand una disminución del estado inflamatorio, los niveles de IL-6 se mantuvieron sin cambios. En la **Tabla 3** se observa la evolución inmuno-virológica de estos pacientes; los datos fueron censurados por defunción (n=5; 7.8%); y abandono del protocolo (n=2; 3.1%).

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

**Tabla 3.** Evolución inmuno-viroológica de los pacientes con supresión virológica a T6

	<b>T0</b> Mediana (± DE)	<b>T2</b> Mediana (± DE)	<b>T6</b> Mediana (± DE)	<b>Sig. (p)</b>
Carga viral VIH (copias/mL)	293,458 (± DE 396,791)	272 (± DE 681)	39	0.0001
Log Carga viral VIH	5.0 (± DE 0.37)	1.99 (± DE 0.55)	1.9 (± DE 39-54)	0.0001
Células T CD45+ (cel/mm3)	1408 (± DE 996)	1778 (± DE 869)	2061 (± DE 882)	0.0240
Células T CD4+ (cel/mm3)	207 (± DE 246)	300 (± DE 285)	384 (± DE 355)	0.0633
Células T CD8+ (cel/mm3)	855 (± DE 608)	1050 (± DE 600)	1008 (± DE 538)	0.425
CD4/CD8	0.26 (± DE 0.35)	0.38 (± DE 0.41)	0.44 (± DE 0.48)	0.17
Carga viral VEB	4,416 (± DE 6110)	SM	SM	N/A
Carga viral CMV	257,615 (± DE 957,554)	SM	SM	N/A
PCRe (mg/dL)	5.3 (± DE 22.8)	1.39 (± DE 2.26)	0.32 (± DE 0.34)	0.0759
DD (ng/mL)	1501 (± DE 2188)	658 (± DE 953)	332 (± DE 282)	0.0327
IL-6 (pg/mL)	2.37 (± DE 2.15)	2.62 (± DE 2.03)	1.57 (± DE 1.41)	0.338

Mediana de evolución en la cuenta de cTCD45+, cTCD4+, cTCD8+, PCRe, DD e IL-6 de los pacientes con seguimiento a T6. Se observa caída de 2 logaritmos en la carga viral a T2; así como incremento en la cuenta total de cTCD4+ y cTCD8+, y de la relación CD4/CD8, así como normalización en los niveles de Proteína C reactiva y dímero D. Los niveles de IL-6 se mantienen estables. Prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas. P significativa <0.05. SM= Sin medición.

En cuanto a los desenlaces clínicos, todas las defunciones (n=5) se presentaron dentro de los primeros 90 días del inicio del TAR (50 ± DE 26 días), 4 (80%) casos se atribuyen a SIRI y 1 (20%) caso se debe a complicaciones propias de las enfermedades asociadas a SIDA. Durante el seguimiento (post-TAR) se registraron 7 casos de SIRI (10%); de los padecimientos asociados, 3 corresponden a MAC (42%), 2 a histoplasmosis diseminada (28.5%), uno a CMV de tracto digestivo (14%) y uno más a linfoma de Hodgkin abdominal (14%); solo un paciente que cursó con SIRI acudió a su seguimiento a T6, 4 fallecieron y dos más suspendieron el TAR a T6.

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

Se correlacionaron los parámetros inflamatorios a T0 con la viremia de VIH y los niveles de linfocitos a T0 y T6, observando una correlación positiva moderada entre los niveles de IL-6 y la viremia de VIH a T0 y a T6 (ambos rho= 0.4; p=0.02); también se observó que los niveles basales de DD se correlacionaron negativamente con los niveles de cTCD4+ a T6 (rho= -0.514; p=0.004). **Tabla 4**

**Tabla 4.** Correlación de dímero D, PCRe IL-6 con los marcadores de progresión clínica a T0 y T6

Variables	T0		T6	
	Rho (IC 95%)	Sig. (p)	Rho (IC 95%)	Sig. (p)
PCRe vs CV VIH	-0.0815	0.65	-0.094	0.61
cTCD45+	-0.199	0.27	-0.046	0.80
cTCD4+	.0.157	0.39	-0.112	0.54
cTCD8+	-0.180	0.32	-0.151	0.41
DD vs CV VIH	0.144	0.43	-0.285	0.126
cTCD45+	-0.193	0.29	-0.275	0.142
cTCD4+	-0.304	0.09	-0.514	0.400
cTCD8+	0.052	0.77	0.060	0.753
IL-6 vs CV VIH	<b>0.454</b>	<b>0.025</b>	0.445	0.209
cTCD45+	-0.219	0.302	0.321	0.126
cTCD4+	-0.402	<b>0.05</b>	-0.098	0.648
cTCD8+	-0.178	0.404	0.369	0.076

Prueba de Spearman no paramétrica entre los niveles de dímero D, PCRe IL-6 y los niveles de células T a T0 y T6. Se observa una correlación inversa entre los niveles de DD a T0 y de CD4 a T6, así como una correlación positiva entre los niveles de IL-6 y la viremia de VIH a T0 y T6. P significativa <0.05.

La falla al TAR, se definió a los seis meses del inicio del tratamiento y **el cálculo de la incidencia se realizó por análisis de intención a tratar (ITT) y por protocolo (PP)**; la incidencia de falla al TAR en el análisis por ITT fue de 14%. Para el cálculo de **la incidencia de falla al TAR** por protocolo solo se incluyó a los pacientes que acudieron a 6 meses de seguimiento y **fue de 23%**. Todos los casos de falla virológica se atribuyeron al abandono del tratamiento (n=5, 12.8%). Una vez documentada la falla virológica, se refirieron los 5 pacientes a valoración por el grupo de salud mental del CIENI y fueron dados de baja del protocolo. **La incidencia de falla inmunológica, en pacientes con supresión virológica a T6 fue de 11.77%** (n=4/34). **Tabla 5**

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

**Tabla 5.** Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral

	<b>Análisis por intención a tratar (n=64)</b>	<b>Análisis por protocolo (n=34)</b>
Falla virológica (n=5)	7.81%	14%
Falla inmunológica (n=4)	6.25%	11.76%
Total (n=9)	14.06%	23.07%

Cuatro sujetos cumplieron los criterios de FI a seis meses de seguimiento; 2 pacientes presentaron caída de los niveles de cTCD4+ con respecto al valor basal (delta cTCD4 T6-T0 = -56 y -6), uno se mantuvo cTCD4+ menores a 100cel/mm3 y uno más tuvo una elevación menor al 50% de a cuenta de cTCD4+ (delta cTCD4 T6-T0= +17; cambio esperado de 64 cel/mm3). **Tabla 6**

**Tabla 6.** Evolución en la viremia y cTCD4+ de los pacientes con falla inmunológica

Caso	T0		T2		T6		Delta CD4 (T6-T0)	Criterio de Falla inmunológica
	Carga viral (copias/mL)	cTCD4 cel/mm3 (%)	Carga viral (copias/mL)	cTCD4 cel/mm3 (%)	Carga viral (copias/mL)	cTCD4 cel/mm3 (%)		
1	25928	152 (14%)	<40	163 (14%)	<40	146 (17%)	-6	Caída de los niveles de CD4
2	15550	8 (2%)	<40	41 (4%)	<40	44 (5%)	+36	CD4 menores a 100 cel/mm3
3	110847	128 (5%)	130	147 (5%)	<40	145 (6%)	+17	No elevación de CT4 con respecto al basal
4	47879	143 (18%)	219	119 (14%)	<40	80 (10%)	-53	Caída de los niveles de CD4

Evolución en la viremia y cTCD4+ de los sujetos con falla inmunológica los datos se presentan en medianas \* DE.

Se clasificó a los pacientes en falla inmunológica o sin falla inmunológica si completaron por lo menos 6 meses de seguimiento (n=34); de los que 4 (11,76%) cursaron con falla inmunológica; todos los pacientes con FI eran hombres y eran relativamente más jóvenes (36 vs 40 años comparado con pacientes sin FI); ni la incidencia de co-infecciones ni la cuenta de cTCD4+ menor a 100cel/mm3 fueron diferentes entre los grupos. La viremia basal fue mayor en el grupo con falla inmunológica (405,693 ±

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

DE 711118) comparado con el grupo sin falla inmunológica (278,493 ± DE 353380) y fue el único parámetro con significancia estadística. **Tabla 7**

**Tabla 7.** Características clínicas de los pacientes con supresión virológica a los 6 meses de seguimiento con y sin falla inmunológica

Variable	Sin falla inmunológica (n=30)	Falla inmunológica (n=4)	Significancia (p)
Sexo			
Hombre	26 (86%)	4 (100%)	0.60
Edad	40.6 (± DE 11.4)	36 (± DE 13.0)	0.98
Coinfecciones	10 (33.3%)	2 (50%)	0.24
CMV	3	0	
Tuberculosis	4	1	
Hepatitis B crónica	0	1	
Hepatitis C	4	0	
<b>Carga viral VIH (copias/mm3)</b>	<b>278,493 (± DE 353380)</b>	<b>405,693 (± DE 711118)</b>	<b>0.047</b>
Log Carga viral VIH	5.04 (± DE 0.73)	4.95 (± DE 0.88)	0.811
Células T CD4+ (cel/mm3)	1390 (± DE 1020)	1548 (± DE 908)	0.676
<b>Células T CD4+ (cel/mm3)</b>	<b>224 (± DE 256)</b>	<b>80 (± DE 70)</b>	<b>0.06</b>
cTCD4T basales ≤100cel/mm3	16 (53%)	1 (25%)	0.462
Células T CD8+ (cel/mm3)	843 (± DE 671)	950 (± DE 851)	0.822
CD4/CD8	0.29 (± DE 0.37)	0.09 (± DE 0.08)	0.215
Carga viral CMV	297,311 (± DE 10320942)	19,437 (± DE 24154)	0.358
Carga viral VEB	4,675 (± DE 6,389)	2,088 (± DE 1,791)	0.116
PCRe (mg/dL)	6.01 (± DE 24.44)	0.26 (± DE 0.11)	0.424
DD (ng/mL)	1,617 (± DE 2,321)	716 (± DE 517)	0.192
IL-6 (pg/mL)	2.37 (± DE 2.25)	2.33 (± DE 1.63)	0.751

Se muestran las características basales en pacientes con y sin falla inmunológica. Los resultados se presentan en total (porcentaje) para variables cualitativas y como mediana (±DE) para variables cuantitativas. Las variables dicotómicas se analizaron con Prueba exacta de Fischer; y las cualitativas se con prueba de T para muestras no paramétricas. Prueba de U Mann-Whitney para muestras independientes P significativa <0.05. DE= Desviación estándar, PCRe=Proteína C reactiva; DD= Dímero D.

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

Para evaluar a los respondedores inmunológicos (RI) y no respondedores inmunológicos (NRI) se analizaron las diferencias entre los grupos con niveles de cTCD4+ a T6  $\geq 350$  o  $\geq 350$  cel/mm<sup>3</sup>; y en esta estratificación, no se observó diferencia estadística de la carga viral entre ambos grupos ( $p=0.314$ ); sin embargo, los niveles de cTCD4+ basales fueron de  $426 \pm DE 257$  vs  $73 \pm DE 78$  ( $p<0.001$ ) para cada grupo; la relación CD4/CD8 también fue diferente en ambos grupos ( $0.513 \pm DE 0.50$  vs  $0.117 \pm DE 0.079$ ); ( $p<0.001$ ). No se observaron diferencias entre la viremia de CMV y VEB, así como en los niveles de cTCD8+. Los niveles de IL-6 a T0, fueron mayores en el grupo con  $<350$  cel/mm<sup>3</sup> ( $2.7 \pm DE 2.55$  vs  $1.82 \pm DE 1.34$ ), sin embargo, la diferencia no fue significativa ( $p= 0.301$ ). Los pacientes con  $<350$  cel/mm<sup>3</sup> a T6 tenían niveles de DD mayores ( $2,084 \pm DE 2,546$ ), comparados con el grupo con  $<350$  cel/mm<sup>3</sup> ( $437 \pm DE 394$ ); ( $p= 0.010$ ). (Tabla 8)

**Tabla 8.** Características clínicas de los pacientes con cTCD4+  $\geq 350$  cel/mm<sup>3</sup> (n=12) o  $<350$  cel/mm<sup>3</sup> (n=22) en pacientes con 6 meses de seguimiento

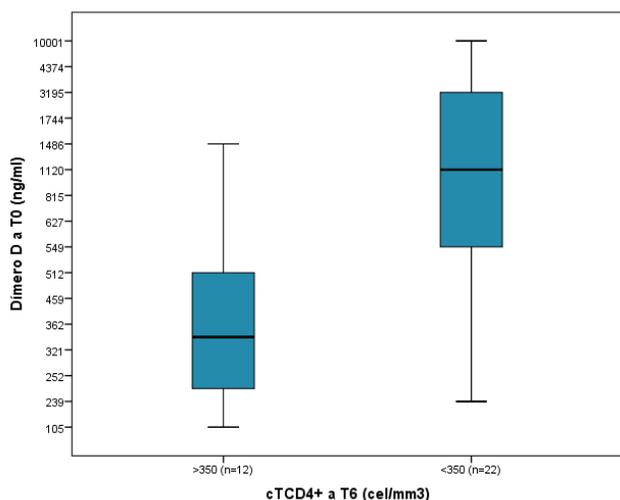
Variable	$\geq 350$ cel/mm <sup>3</sup> (n=12)	$<350$ cel/mm <sup>3</sup> (n=22)	Sig (p)
Carga viral VIH (copias/mL)	197,195 ( $\pm$ DE 351,221)	348,636 ( $\pm$ DE 423,652)	0.314
Log Carga viral VIH	4.72 ( $\pm$ DE .755)	5.18 ( $\pm$ DE 0.7105)	0.712
Células T CD45+ (cel/mm <sup>3</sup> )	2,067 ( $\pm$ DE 994)	1055 ( $\pm$ DE 848)	0.163
Células T CD4+ (cel/mm <sup>3</sup> )	426 ( $\pm$ DE 257)	73 ( $\pm$ DE 78)	<0.0001
Células T CD8+ (cel/mm <sup>3</sup> )	198 ( $\pm$ DE 614)	733 ( $\pm$ DE 708)	0.850
CD4/CD8	0.513 ( $\pm$ DE 0.50)	0.117 ( $\pm$ DE 0.079)	<0.0001
Carga viral VEB	5,571 ( $\pm$ DE 7,703)	4287 ( $\pm$ DE 6,169)	0.810
Carga viral CMV	1,605 ( $\pm$ DE 1,378)	284563 ( $\pm$ DE 1,005,355)	0.450
PCRe (mg/dL)	0.262 ( $\pm$ DE 0.181)	7.55 (27.51)	0.180
DD (ng/mL)	437 ( $\pm$ DE 394)	2084 ( $\pm$ DE 2,546)	0.010
IL-6 (pg/mL)	1.82 ( $\pm$ DE 1.34)	2.7 ( $\pm$ DE 2.55)	0.301

Se muestran las características basales en pacientes con cTCD4+  $\geq 350$  cel/mm<sup>3</sup> o  $<350$  cel/mm<sup>3</sup> a T6. Los resultados se presentan como mediana  $\pm$ DE. Las variables se analizaron con prueba de T para pruebas no paramétricas. Prueba de U Mann-Whitney para muestras independientes. P significativa  $<0.05$ . DE= Desviación estándar, PCRe=Proteína C reactiva; DD= Dímero D

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

Se compararon los niveles de dímero D a T0 con la cuenta de cTCD4 a T6; se observó que los niveles basales fueron mayores, en pacientes con  $<350$  cTCD4+ comparados con los pacientes con adecuada reconstitución inmunológica ( $P < 0.01$ ). **Figura 3.**

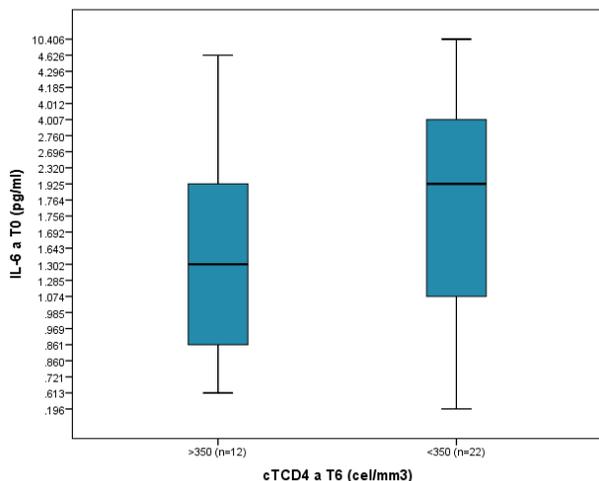
**Figura 3.** Dímero D en pacientes con cTCD4+ mayor o menor a 350 cel/mm<sup>3</sup> a 6 meses de TAR.



**Figura 3.** Dímero D en pacientes supresión virológica a T6 y con cTCD4+ mayor o menor a 350 cel/mm<sup>3</sup> a 6 meses. Prueba de U Mann-Whitney para muestras independientes.  $P < 0.01$ .

Los niveles de IL-6 fueron mayores en los pacientes con  $<350$  cel/mm<sup>3</sup> que en los pacientes con 350 cel/mm<sup>3</sup>; sin embargo, la diferencia no fue significativa ( $p= 0.3$ ). **Figura 4**

**Figura 4.** Niveles de IL-6 en pacientes con cTCD4+ mayor o menor a 350 cel/mm<sup>3</sup> a 6 meses



**Figura 4.** Niveles de IL-6 en pacientes con cTCD4+ mayor o menor a 350 cel/mm<sup>3</sup> a en supresión virológica a T6 1.27 vs 2.0. Prueba de U Mann-Whitney para muestras independientes.  $P= 0.3$ .

## **DISCUSIÓN**

En nuestra población, la incidencia de falla al tratamiento antirretroviral fue de 26% a 6 meses de TAR; de los cuales, 16% corresponde a falla virológica y 11.76% a falla inmunológica. Este dato está en acuerdo con lo reportado en los previos estudios. (Piketty, et al., 1998); (Autran, et al., 1997); (Lapadulaa, et al., 2013)

Steven J. Reynolds (AIDS, 2009) en un estudio realizado en Uganda con 1133 participantes entre 2004 y 2007 que tuvieron seguimiento a 44 meses, identificaron una incidencia de falla inmunológica de 11.0% (n=125). La mayoría de los pacientes se encontraban recibiendo nevirapina. Dos años más tarde, El-Khatib Z (El-Khatib, et al., 2011), en un estudio retrospectivo con 456 pacientes que recibieron TAR basado en INTRNN durante 15 meses, identificó una incidencia de falla inmunológica de 19% (n=88).

Recientemente, Yirdaw (Yirdaw & Hatting, 2015) en un estudio retrospectivo realizado en Etiopia, con 1,321 expedientes de pacientes entre 5 y 70 años que iniciaron el TAR entre 2005 y 2012, usó los criterios de la OMS para el diagnóstico de falla inmunológica; reportó una incidencia de falla virológica de 18% (n= 241). La prevalencia de pacientes con falla inmunológica fue de 17,6% (n = 226) (IC 95%: 15.6%-19.8%), durante el seguimiento a largo plazo, la FI se mantuvo en 11.5% (N = 147) (IC del 95%: 9.8% -13.3%). Todos estos estudios incluyen una muestra mayor sin embargo son de diseño retrospectivo.

Entre las causas de falla inmunológica descritas en la literatura se encuentran: ser de sexo masculino, mayor a 50 años, cTCD4+ < 100cel/mm<sup>3</sup>; sin embargo, ninguno de éstos factores demostró ser diferente entre los que cursaron con FI y los que no en esta cohorte prospectiva. Yirdaw (Yirdaw & Hatting, 2015) identificó la mediana de cTCD4+ basales fue de 156 células por mm<sup>3</sup> (intervalo 1 - 1 221 cel/mm<sup>3</sup>), el seguimiento fue de 30 meses (rango intercuartil: 15 a 48 meses el principal criterio diagnóstico de FI fue la disminución del 50% de las cTCD4+ del pico de máximo durante el seguimiento (58%, n= 131). Los criterios de edad, la clasificación de la OMS, ni cuenta de cCD4+ no fueron diferentes en los pacientes con FI; en cuanto a la reversión de este estado fue mayor en las mujeres (p= 0.05). Este estudio incluyó mujeres mayoritariamente (63%; n = 831).

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

El-Khatib (El-Khatib, et al., 2011) en un análisis de regresión logística identificó al género masculino y la adherencia menor 95% (OR 2.8, 95%CI 1.2–6.7) como posibles factores de riesgo para falla inmunológica.

En cuanto al estado inflamatorio los pacientes se mantuvieron con niveles elevados de PCR<sub>e</sub> (3.83 mg/dL ( $\pm$  DE 17.05) y el DD (1,455  $\pm$  DE 1872), estos valores pueden deberse a que la mayoría de los pacientes estaban recibiendo tratamiento para enfermedades relacionadas a SIDA y al poco de tiempo de TAR.

Ya que en ocasiones la PCR<sub>e</sub> es considerada un reactante de fase aguda, es probable que estas diferencias sean consecuencia de la presencia de infecciones oportunistas y comorbilidades, perpetuando un estado proinflamatorio. Los niveles de PCR<sub>e</sub>, DD e IL-6 son mayores en pacientes con respuesta inadecuada al TAR; aunque esta diferencia no fue significativa, probablemente sea necesario el incremento del tamaño de muestra y un seguimiento prolongado. Por otro lado, el DD está correlacionado moderadamente con la cuenta cTCD4<sup>+</sup> a T6; posiblemente pueda usarse como predictor de la respuesta inmunológica.

La mayoría de estudios publicados son de tipo retrospectivo e incluyen a los pacientes después del diagnóstico de falla inmunológica lo que dificulta controlar algunas variables importantes. Aunque tengamos que corroborar los resultados que encontramos con los NRI e IR ya que 6 meses post-TAR es poco tiempo para verdaderamente clasificar a pacientes en este 2 grupos, consideramos importantes los hallazgos con respecto a la asociación de la cTCD4<sup>+</sup> con el dímero D, ya que de ser consistentes en análisis posteriores (a 12 y 18 meses de TAR) nos podrían orientar sobre un posible papel fisiopatogénico o como predictor de la falta de reconstitución inmunológica.

Saison (Saison, et al., 2014) en un estudio transversal realizado en Francia en pacientes que acudieron a seguimiento con por lo menos un año de tratamiento antirretroviral supresivo (incluyeron a pacientes con viremia de muy bajo nivel); los pacientes fueron clasificados en respondedores inmunológicos completos (cIR, n = 48) y en respondedores inmunológicos inadecuados (iIR, n = 39), dependiendo la cuenta de cTCD4<sup>+</sup> ( $>$  o  $<$  500cel/mm<sup>3</sup>); en los que determinaron diferentes estratos de cTCD4<sup>+</sup> y cTCD8<sup>+</sup>: identificaron que los porcentajes de Tregs, Tregs efectoras y Tregs efectoras terminal de cTCD4<sup>+</sup> se encuentran significativamente elevadas en iIR; en el análisis multivariado identificaron que los únicos parámetros asociados a iIR fueron el nadir de cTCD4<sup>+</sup> y el porcentaje de Tregs (OR= 2.339; P = 0.001, y OR = 0.803; P = 0.041]; sugiriendo una relación causal.

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

Algunos autores han asociado la falta de reconstitución inmune con mayor incidencia de eventos clínicos. Lapadulaa (Lapadulaa , et al., 2013); en un estudio con 3,378 pacientes que recibieron su primer régimen de TAR y se encontraban en supresión virológica ( $CV \leq 80$  copias/mL) encontró que la tasa de eventos clínicos para NRI e IR fue de 4.41 [IC 95% 3.38–5.74] y de 1.84 (IC 95% CI 1.58–2.15) por 100 personas año, respectivamente ( $P < 0.001$ ). Los desenlaces fueron la incidencia de eventos graves no relacionados a SIDA (cáncer, infecciones graves, falla renal aguda, eventos cardiovasculares y descompensación hepática) o muerte.

Este estudio presenta varias limitaciones que son importantes de mencionar y no nos permiten concluir sobre los factores de riesgo asociados a la FI. El estudio aún se encuentra en fase de reclutamiento y seguimiento; aquí presentamos los resultados a los 6 meses de seguimiento con un tamaño de muestra relativamente pequeño (34 sujetos) y estamos conscientes que se tendrá que volver a determinar la FI a 12 meses y 18 meses. Es sumamente importante conocer los factores de riesgo asociados a la FI ya que esto nos permitirá no solo conocer los mecanismos fisiopatogénicos, sino proponer opciones terapéuticas o identificar factores predictivos que nos permita realizar una intervención adecuada y mantener en vigilancia a estos pacientes.

### **CONCLUSIONES**

La incidencia de falla al TAR en general es de 26% y la incidencia de falla inmunológica es de 11.37%; lo que concuerda con lo reportado en varios estudios en diferentes países. En nuestra población no se observaron diferencias en los niveles plásmaticos de IL-6 entre pacientes con y sin falla inmunológica. Proponemos que el dímero D podría ser un marcador de progresión de la enfermedad y podría usarse para predecir la respuesta de del sistema inmune ( $cTCD4+$ ) al TAR. Se planea estudiar las características fenotípicas y funcionales de las  $cTCD4+$  y  $cTCD8+$  en los grupos de pacientes con FI versus sin FI y en los NRI e IR mediante el uso de la citometría multiparamétrica para comprender porqué ciertos pacientes no logran reconstituir su sistema inmune.

Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aissani B, S. S., Aissani, B., Shrestha, S., Wiener, H., Tangb, J., Kaslow , R., & Wilson , C. . (2014, Aug 24). Mitochondrial DNA variation and virologic and immunological HIV outcomes in African Americans. *AIDS*, 28(13), 1871–1878. doi:10.1097/QAD.0000000000000371
- Aiuti, F., & Mezzaroma, I. (2006, Apr-Jun). Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS Rev*, 8(2), 88-97. Retrieved from PMID: 16848276
- Anude, C., Eze, E., Onyegbutulem, H., Charurat, M., Etiebet, M., Ajayi, S., & Dakum, P. (2013, Mar 1). Immunovirologic outcomes and immunovirologic discordance among adults alive and on anti-retroviral therapy at 12 months in Nigeria. *BMC Infectious Diseases*, 13(13), 1-19. doi:10.1186/1471-2334-13-113
- Appay V, F. S.-M. (24 de Sep de 2011). Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. *AIDS*, 25(15), 1813-1822. doi:10.1097/QAD.0b013e32834640e6
- Assefa A, G. B. (27 de Aug de 2014). The effect of incident tuberculosis on immunological response of HIV patients on highly active anti-retroviral therapy at the university of Gondar hospital, northwest Ethiopia: a retrospective follow-up study. *BMC Infect Dis*, 14(468), 1-8. doi:10.1186/1471-2334-14-468
- Autran, B., Carcelain, G., Li, T., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., . . . Debré, P. (1997, Jul 4). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* , 277(5322), 112-116. Retrieved from PMID: 9204894
- Autran, B., Carcelain, G., Li, T., Gorochoy, G., Blanc, C., Renaud , M., & Durali, M. (1999, Mar). Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunology Letter*, 66(13), 207–211. Retrieved from PMID: 10203056
- Battegay , M., Nüesch, R., Hirschel, B., & Kaufmann, G. (2006, May). Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect Dis*, 6(5), 280–87. doi:10.1016/S1473-3099(06)70463-7
- Boettiger , D., Nguyen, V., Durier , N., Bui, H., Heng Sim , B., Azwa, I., . . . Roxrungtham, K. (2015, Feb 1). Efficacy of Second-Line Antiretroviral Therapy Among People Living With HIV/AIDS in Asia: Results From the TREAT Asia HIV Observational Database. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015;68:18. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 68(2), 186-195. doi:10.1097/QAI.0000000000000411
- Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH y el SIDA . (2014). *CENSIDA*. Obtenido de CENSIDA: [http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/L\\_E\\_V\\_S.pdf](http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/L_E_V_S.pdf)
- Chun HM, M. O. (1 de Jun de 2014). HIV outcomes in Hepatitis B virus coinfecting individuals on HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 66(2), 197-205. doi:10.1097/QAI.0000000000000142.
- CONASIDA. (2014). Guía de Manejo antirretroviral de las personas que viven con VIH Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Centro Nacional para la Prevención y el Control del VI. Ciudad de México, México.

- Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH
- Conesa-Botella, A., Mathieu, C., Colebunders, R., Moreno-Reyes, R., van Etten, E., Lynen, L., & Kestens, L. (2009, Apr 21). Is vitamin D deficiency involved in the immune reconstitution inflammatory syndrome? *AIDS Res Ther*, 4, 1-5. doi:10.1186/1742-6405-6-4
- Deeks, S., Barbour, J., Grant, R., & Martin, J. (2002, Jan 25). Duration and predictors of CD4 T-cell gains in patients who continue combination therapy despite detectable plasma viremia. *AIDS*, 16(2), 201-207. Retrieved from PMID: 11807304
- Delobel, P., Nugeyre, M., Cazabat, M., Sandres-Saune, K., Pasquier, C., Cuzin, L., . . . Massip, P. (2006, Oct). Naïve T-Cell Depletion Related to Infection by X4 Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Poor Immunological Responders to Highly Active Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, 80(20), 10229-10236. doi:10.1128/JVI.00965-06
- Departamento de DST, AIDS e Infecções Virais, Brasil. (2010). Protocolo de Assistência Farmacêutica em DST/HIV/AIDS. *Série A. Normas e Manuais Técnicos*, 192-214.
- El-Khatib, Z., Katzenstein, D., Marrone, G., Laher, F., Mohapi, L., Petzold, M., & Morris, L. (2011, Mar 9). Adherence to Drug-Refill Is a Useful Early Warning Indicator of Virologic and Immunologic Failure among HIV Patients on First-Line ART in South Africa. *PLoS ONE* 2011;6(3): e17518, 6(3), e17518. doi:10.1371/journal.pone.0017518
- Erikstrup, C., Kronborg, G., Lohse, N., Ostrowski, S., Gerstoft, J., & Ullum, H. (2010, Mar). T-cell dysfunction in HIV-1-infected patients with impaired recovery of CD4 cells despite suppression of viral replication. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 53(3), 303-310. doi:10.1097/QAI.0b013e3181ca3f7c
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (16 de May de 2001). Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 285(19), 2486–2497. doi:doi:10.1001/jama.285.19.2486
- Fabre-Mersseman, V., Tubiana, R., Papagno, L., Bayard, C., Briceño, O., Fastenackels, S., . . . Rostane, H. (2014). Vitamin D supplementation is associated with reduced immune activation levels in HIV-1-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS*, 28(18), 2677–2682. doi: 10.1097/QAD.0000000000000472
- Gaardbo, J., Hartling, H., Gerstoft, J., & Nielsen, S. (2012, Mar 14). Incomplete Immune Recovery in HIV Infection: Mechanisms, Relevance for Clinical Care, and Possible Solutions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012(670957), 1-17. doi:doi:10.1155/2012/670957
- Girard, A., Vergnon-Miszczyska, D., Depincé-Berger, A., Roblin, X., Lutch, F., Lambert, C., . . . Bourlet, T. (2016, Jul 1). High Rate of b7+ Gut-Homing Lymphocytes in HIV-Infected Immunological Nonresponders is Associated With Poor CD4 T-Cell Recovery During Suppressive HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 72(3), 259-265. doi:10.1097/QAI.0000000000000943.

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

- Grabmeier-Pfistershammer K, S. P. (1 de Feb de 2011). Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 56(2), 118-124. doi:10.1097/QAI.0b013e3181fbab9f
- Havers, F., Smeaton, L., Gupte, N., Detrick, B., Bollinger, R., Hakim, J., & Kumarasamy, N. (2014, Jul 15). 25-Hydroxyvitamin D Insufficiency and Deficiency is Associated With HIV Disease Progression and Virological Failure Post-Antiretroviral Therapy Initiation in Diverse Multinational Settings. *J Infect Dis*, 210(2), 244-253. doi:10.1093/infdis/jiu259
- Hiébaud R, D. J. (22 de May de 2014). Quantifying and Predicting the Effect of Exogenous Interleukin-7 on CD4+T Cells in HIV-1 Infection. *PLoS Comput Biol*, 10(5), e1003630. doi:10.1371/journal.pcbi.1003630
- HIV Pharmacovigilance. (2007, Dec 03). Retrieved from HIV Pharmacovigilance: <http://www.hivpv.org/Home/Tools/tabid/91/ctl/ExamView/mid/500/eid/0/lid/0/Default.aspx>
- James, P., Oparil, S., Carter, B., Cushman, W., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., & Lackland, D. (2014, May 7). Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*, 311(5), 507-520. doi:10.1001/jama.2013.284427
- Junge, S., Kloeckener-Gruissem, B., Zufferey, R., Keisker, A., Salgo, B., Fauchere, J., & Scherer, F. (2007, Nov). Correlation between recent thymic emigrants and CD31+(PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *European J of Immunol*, 37(11), 3270-3280. doi:10.1002/eji.200636976
- Kauffman, G., Perrin, L., Pantaleo, G., Opravil, M., Furrer, H., Telenti, A., . . . Ledergerber, B. (2003, Oct 13). CD4 T lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med* 2003;163:2187, 163(18), 2187-2195. doi:10.1001/archinte.163.18.2187
- Kimmig, S., Przybylski, G., Schmidt, C., Laurisch, K., Möwes, B., Radbruch, A., & Thiel, A. (2002, Mar 18). Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine*, 195(6), 789-794. Retrieved from PMID: PMC2193736
- Kolte L, G. J., Kolte, L., Gaardbo, J., Skogstrand, K., Ryder, L., Ersbøll, A., & Nielsen, S. (2009, Jan ). Increased levels of regulatory T cells (Tregs) in human immunodeficiency virus-infected patients after 5 years of highly active anti-retroviral therapy may be due to increased thymic production of naive Tregs. *Clin Exp Immunol*, 155(1), 44-52. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03803.x.
- Kusher, I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Ann NY Acad Sci*, 389, 39-48. Obtenido de PMID: 7046585
- Kushner, I. (June de 1982). The phenomenon of the acute phase response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389, 39-48. doi:10.1111/j.1749-6632.1982.tb22124.x

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

- Lapadulaa , G., Cozzi-Lepri, A., Marchetti, G., Antinori, A., Chiodera, A., Nicastrì, E., & Parruti, G. (2013, Mar 13). Risk of clinical progression among patients with immunological nonresponse despite virological suppression after combination antiretroviral treatment. *AIDS* , 27(5), 769-779. doi:10.1097/QAD.0b013e32835cb747
- Lau , B., Sharrett , A., Kingsley , L., Post, W., Palella , F., Visscher, B., & Gange, S. (2006, Jan 9). C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *ArchInternMed*, 166(1), 64–70. doi: 10.1001/archinte.166.1.64
- Lederman, M., Calabrese, L., Funderburg, N., Clagett, B., Medvik, K., Bonilla, H., & Gripshover, B. (2011, Oct 15). Immunologic Failure Despite Suppressive Antiretroviral Therapy Is Related to Activation and Turnover of Memory CD4 Cells. *The Journal of Infectious Diseases* 2011;204:1217–26., 204(8), 1217-1226. doi:10.1093/infdis/jir507.
- Lewden , C., Chene, G., Morlat , P., Raffi, F., Dupon, M., Dellamonica, P., . . . Katlama, C. (2007, Sep 1). HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm<sup>3</sup> on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. *J Acquir Immun Defic Syndr*, 46(1), 72-77. doi:10.1097/QAI.0b013e318134257a
- Li, S., Gowans, E., Chougnet, C., Plebanski, M., & Dittmer, U. (2008, Jan). Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol*, 82(1), 21–30. doi:10.1128/JVI.01768-07
- Lim A, T. D. (31 de Jul de 2007). Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. *AIDS*, 12(21), 1525–1534. doi: 10.1097/QAD.0b013e32825eab8b
- Lipsy, R J; The ATP II group. (20003). The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *J Manag Care Pharm*, 9(1), 2-5. doi:10.18553/jmcp.2003.9.s1.2
- Lu , X., Su, B., Xia, H., Zhang, X., Liu, Z., Yang, Z., . . . Mayr, L. (2016, Dec 9). Low Double-Negative CD3+CD4–CD8– T Cells Are Associated with Incomplete Restoration of CD4+ T Cells and Higher Immune Activation in HIV-1 Immunological Non-Responders. *Frontiers in Immunology*, 7(579), 1-8. doi:doi: 10.3389/fimmu.2016.0057
- Lund, J., Hsing, L., Pham, T., & Rudensky, A. (2008, May 30). Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science*, 320(5880), 1220–1224. doi:0.1126/science.1155209
- Magen, E., Elbirt, D., Agmon-Levin , N., Mishal, J., & Stoeber, Z. (2017, Apr). Eradication of *Helicobacter pylori* can facilitate immune reconstitution in HIV-1-infected immunological non-responders. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(4), e322–e327. doi:10.1016/j.ijid.2009.03.036
- Marziali , M., De Santis, W., Carello, R., Leti, W., Esposito, A., Isgrò, A., & Fimiani, C. (2006, Oct 24). T-cell homeostasis alteration in HIV-1 infected subjects with low CD4 T-cell count despite undetectable virus load during HAART. *AIDS*, 20(16), 2033–2041. doi:10.1097/01.aids.0000247588.69438.f0

## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

- Masiá, M., Bernal, E., Padilla, S., Graells, M., Jarrín, I., Almenar, M., & Molina, J. (2007, Nov). The role of C-reactive protein as a marker for cardiovascular risk associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis*, *195*(1), 167–171. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.09.013
- Mavigner, M., Delobel, P., Cazabat, M., Dubois, M., L'Faqih-Olive, F., Raymond, S., & Pasquier, C. (2009, Oct 30). HIV-1 Residual viremia Correlates with Persistent T-Cell Activation in Poor Immunological Responders to Combination Antiretroviral Therapy. *PLoS ONE*, *4*(10), e7658. doi:10.1371/journal.pone.0007658.
- Mendez-Lagares, G., Garcia-Perganeda, A., del Mar del Pozo-Balado, M., Genebat, M., Ruiz-Mateos, E., García García, M., . . . Pacheco, Y. (2012, May). Differential alterations of the CD4 and CD8 T cell subsets in HIVinfected patients on highly active antiretroviral therapy with low. *J Antimicrob Chemother*, *67*(5), 1228-1237. doi:10.1093/jac/dkr594.
- Menkova-Garnier, I., Hocini, H., Foucat, E., Tisserand, P., Bourdery, L., Delaugerre, C., . . . Lévy, Y. (2016, Apr 15). P2X7 Receptor Inhibition Improves CD34 T-Cell Differentiation in HIV-Infected Immunological Nonresponders on c-ART. *PLoS Pathog*, *12*(4), e1005571. doi:10.1371/journal.ppat.1005571
- Mocroft, A., Furrer, H., Miro, J., Reiss, P., Mussini, C., Kirk, O., & Abgrall, S. (2013, Oct). Opportunistic Infections Working Group on behalf of the Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE) study in EuroCOORD. The incidence of AIDS-defining. *Clin Infect Dis*, *57*(7), 1038-1047. doi:10.1093/cid/cit423
- Okoyee, A., & Picker, L. (2013). CD4+ T cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev*, *254*(1), 54–64.
- Okulicz, J., Le, T., Agan, B., Camargo, J., Landrum, M., Wright, E., . . . Ganesan, A. (2015, Jan). Influence of the Timing of Antiretroviral Therapy on the Potential for Normalization of Immune Status in Human Immunodeficiency Virus 1–Infected Individuals. *JAMA Intern Med*, *175*(1), 88-99. doi:10.1001/jamainternmed.2014.4010
- Onen, N., Overton, E., Presti, R., Blair, C., Powderly, W., & Mondy, K. (2009, Aug). Sub-optimal CD4 recovery on long-term suppressive highly active antiretroviral therapy is associated with favourable outcome. *HIV Med*, *10*(7), 439–46. doi:10.1111/j.1468-1293.2009.00711.x
- Pakker, N., Notermans, D., De Boer, R., Roos, M., de Wolf, F., Hill, A., & Leonard, J. (1998, Feb). Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nature Medicine*, *4*(2), 208-214. Retrieved from PMID: 9461195
- Palladino, C., Briz, V., Bellón, J., Baátol, I., Carvalho, P., Camacho, R., . . . Bastos, R. (2013, Dec 20). Predictors of Attrition and Immunological Failure in HIV-1 Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy from Different Healthcare Settings in Mozambique. *PLoS ONE*, *8*(12), e82718. doi:10.1371/journal.pone.0082718

- Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH
- Peterson , I., Togun, O., de Silva, T., Oko, F., Rowland-Jones, S., Jaye, A., & Peterson, K. (2011, Nov 13). Mortality and immunovirological outcomes on antiretroviral therapy in HIV-1 and HIV-2-infected individuals in the Gambia. *AIDS*, *25*(17), 2167–2175. doi:10.1097/QAD.0b013e32834c4adb
- Piconi S, P. S. (22 de Sep de 2011). Hydroxychloroquine drastically reduces immune activation in HIV-infected,antiretroviral therapy–treated immunologic nonresponders. *Blood*, *118*(12), 3263-3272. doi:10.1182/blood-2011-01-329060
- Piketty, C., Castiel, P., Belec, L., Batisse, D., Si Mohamed, A., Gilquin, J., . . . Jayle, D. (1998, May 7). Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease. *AIDS*, *12*(7), 745–750. Retrieved from PMID: 9619806
- Pinzone, M., Di Rosa, M., Cacopardo, B., & Nunnari, G. (2012). HIV RNA Suppression and Immune Restoration: Can We Do Better? *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*(515962), 1-12. doi:10.1155/2012/515962
- Prabhakar, B., Banu , A., Pavithra, H., Chandrashekhara , P., & Sasthri , S. (2011, Jul-Dec). Immunological failure despite virological suppression in HIV seropositive individuals on antiretroviral therapy. *Indian J Sex Transm Dis*, *32*(2), 94-98. doi:10.4103/0253-7184.85412
- Ravimohan S, T. N. (1 de Dec de 2013). Ravimohan S, Tamuhla N, Steenhoff AP, Letlhogile R, Makutu DK, Nfanyana K, et al. Early Immunologic Failure is Associated With Early Mortality Among Advanced HIV–Infected Adults Initiating Antiretroviral Therapy With Active Tuberculosis. *J Infect Dis*, *208*(11), 1784-1793. doi:10.1093/infdis/jit368
- Rawizza , H., Chaplin, B., Meloni, S., Eisen, G., Riao, T., Sankalé, J., . . . Agbaji, O. (2011, Dec). Immunologic Criteria Are Poor Predictors of Virologic Outcome: Implications for HIV Treatment Monitoring in Resource-Limited Settings. *Clinical Infectious Diseases*, *53*(12), 1283–1290. doi:10.1093/cid/cir729
- Reuter , M., Pombo , C., & Betts, M. (Aug-Oct de 2012). Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: Lessons for development of therapeutics and vaccines. *Cytokine&Growth Factor Reviews*, *4*(5), 181-191. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.05.005
- Rueda, C., Velilla, P., Chougnet, C., & Rugeles, M. (2015, Jan 29). Incomplete normalization of regulatory t-cell frequency in the gut mucosa of Colombian HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *PLoS One*, *29*(1), e71062. doi:10.1097/QAD.0000000000000511
- Rutherford, G., Lifson , A., Hessol, N., Darrow, W., O'Malley, P., Buchbinder, S., . . . Bodecker, T. (1990, Nov 24). Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11 year follow up study. *Brittish Medical Journal*, *301*(6762), 1183-1188. Retrieved from PMID: 2261554
- Saison , J., Fery, T., Demaret, J., Maucort Boulch, D., Venet, F., Perpoint, T., & Ader, F. (2014, Jun). Association between discordant immunological response to highly active anti-retroviral therapy, regulatory T cell percentage, immune cell activation and very low-level viraemia in. *Clin Exp Immunol*, *176*(3), 401-409. doi:10.1111/cei.12278.

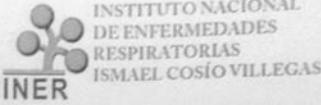
## Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

- Saison J, M. B., Saison, J., Maucort Boulch, D., Chidiac, C., Demaret, J., Malcus, C., . . . Poitevin-Later, F. (2015, May 1). Increased Regulatory T-Cell Percentage Contributes to Poor CD4+ Lymphocytes Recovery: A 2-Year Prospective Study After Introduction of Antiretroviral Therapy. *Open Forum Infectious*. *Open Forum Infectious*, 2(2), ofv063. doi: 10.1093/ofid/ofv063
- Schuler , P., Macatangay, B., Saz, Z., Jackson , E., Riddler, S., Buchanan, W., & Hildorfer, B. (2013, Jun 19). CD4 + CD73+ T cells are associated with lower T-cell activation and C reactive protein levels and are depleted in HIV-1 infection regardless of viral suppression. *27(10)*, 1545-1555. doi:10.1097/QAD.0b013e328360c7f3.
- Somsouk, M., Estes, J., Deleage, C., Dunham, R., Albright, R., & Inadom, J. (2015). Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection. *AIDS*, 29(1), 43–45. doi:10.1097/QAD.0000000000000511
- Stacey, A., Norris, P., Qin, L., Haygreen, E., Taylor, & Heitman , J. (2009, Apr). Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol*, 83(8), 3719-3733. doi:10.1128/JVI.01844-08
- Tran, D., Wilson, D., Shakeshaft, A., Ngo, A., Doran, C., & Zhang, L. (2014, Nov). Determinants of virological failure after 1 year's antiretroviral therapy in Vietnamese people with HIV: findings from a retrospective cohort of 13 outpatient clinics in six provinces. *Sex Transm Infect*, 90(7), 538-544. doi:10.1136/sextrans-2013-051353
- Vallabhaneni, S., Chandy, S., Heylen, E., & Ekstrand , M. (2013, Jun 3). Evaluation of WHO immunologic criteria for treatment failure: implications for detection of virologic failure, evolution of drug resistance and choice of second-line therapy in India. *J Int AIDS Soc*, 16(18449), 1-7. doi:doi: 10.7448/IAS.16.1.18449.
- Viard JP, S. J., Viard, J., Souberbielle, J., Kirk, O., Reekie , J., Knysz, B., . . . Gatell, J. (2011, Jun 19). Vitamin D and clinical disease progression in HIV infection: results from the EuroSIDA study. *AIDS 2011; 25:1305-1315.*, 25(10), 1305-1315. doi:10.1097/QAD.0b013e328347f6f7
- Wang Q, Y. J. (May-Jun de 2014). Swiss HIV Cohort Study. Virologic and immunologic responses in treatment-naive patients to ritonavir-boosted atazanavir or efavirenz with a common backbone. *HIVClinTrials*, 15(3), 92-103. doi:10.1310/hct1503-92
- World Health Organization (WHO). (18 de Jan de 2013). Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings: treatment guidelines for a public health approach. *Curr Opin HIV AIDS*, 8(1), 12-18. doi:10.1097/COH.0b013e32835b8123
- Yirdaw, K. D., & Hatting, S. (11 de May de 2015). Prevalence and Predictors of Immunological Failure among HIV Patients on HAART in Southern Ethiopia. *PLoS One*, 10(5), e0125826. doi:10.1371/journal.pone.0125826
- Zürcher, M., Sulzer , I., Barizzi G, Lämmle B, & Alberio, L. (Feb de 2008). Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost*, 99(2), 416-426. doi:10.1160/TH07-07-0448.

# Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## ANEXOS

### ANEXO 1. Aprobación del Comité de Ética en Investigación

**COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**

*"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"*

México D. F. a 10 de Noviembre de 2015  
INER/CEI/404/15

Dr. Gustavo Reyes Terán  
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN.  
**APROBACIÓN.**

Título del Proyecto: INCIDENCIA DE LA FALLA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL, CON ENFOQUE EN LA FALLA INMUNOLÓGICA EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH.

Código asignado por el Comité: **C59-15**

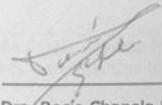
Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Agosto 2015	APROBADO
Consentimiento Informado	Versión 1, Agosto 2015	APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de noviembre 2015 a noviembre 2017.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

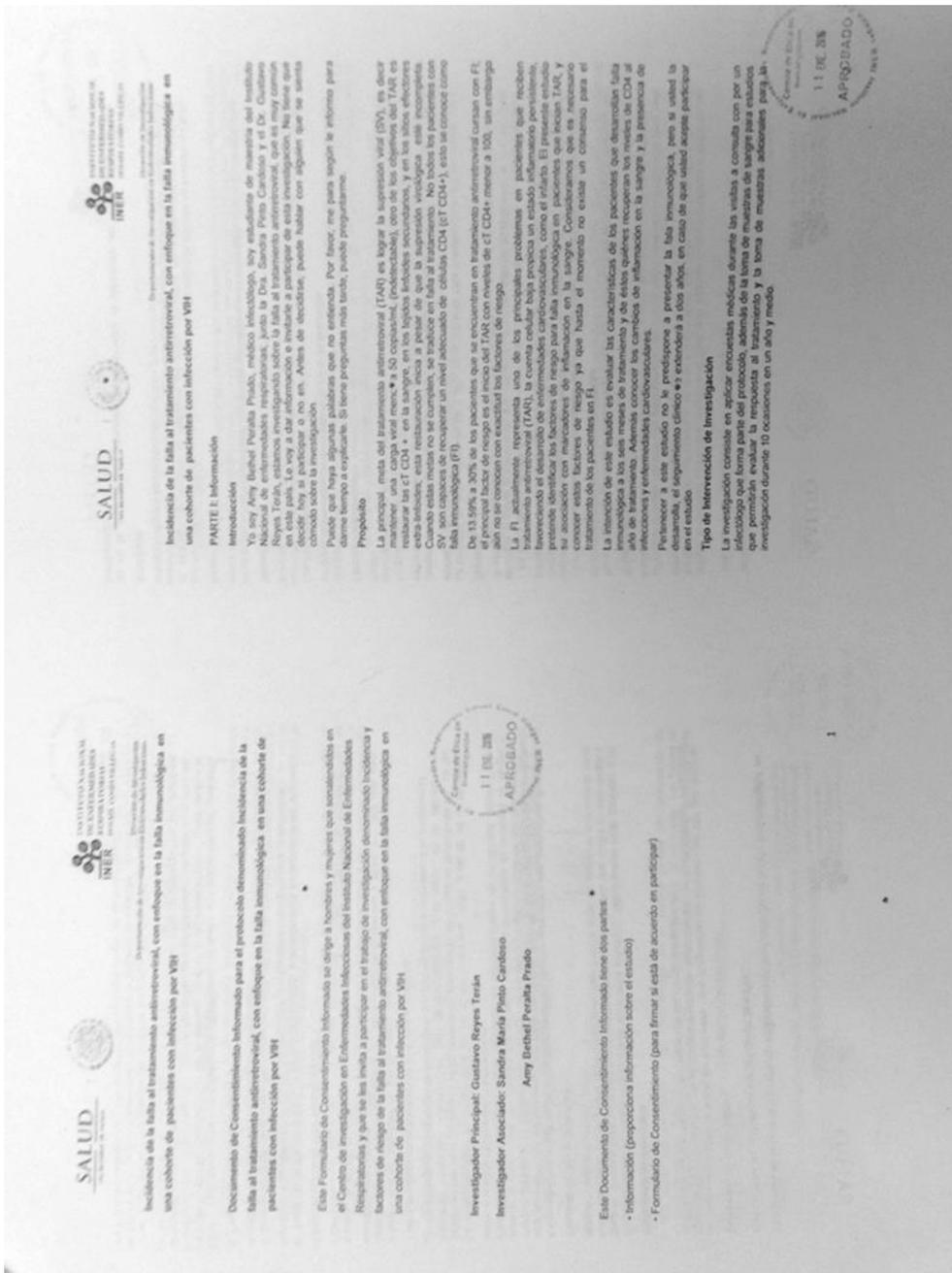
Atentamente

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rocio Chapela Mendoza  
Présidente del Comité

Calzada de Tlalpan No. 4502, Col. Sección XVI Dóleg, Tlalpan, México, D.F., C.P. 14020  
Tel. (55) 54 87 17 00 www.iner.salud.gob.mx

# Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## ANEXO 2 Documento de Consentimiento Informado para el protocolo denominado Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH. Hoja 1 y 2





# Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## ANEXO 2 Documento de Consentimiento Informado para el protocolo denominado Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH. Hoja 5 y 6

**INSTITUCIÓN NACIONAL DE ESTUDIOS Y REFERENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS**  
**INER**  
División de Investigación Epidemiológica

**SALUD**  
MINISTERIO DE SALUD

**INcidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH**

**PARTE II: Formulario de Consentimiento**

He sido invitado a participar en la investigación de falla al tratamiento antirretroviral. Entiendo que se me tomarán muestras de sangre para fines de laboratorio e investigación, y que acudiré a citas de para la toma de las muestras y para la atención médica en diferentes días. He sido informado de que los riesgos son mínimos y pueden incluir molestias menores e infección de la piel. Sé que puede que no haya beneficios para mí persona y que no se me ha prometido nada. He leído el nombre y la dirección que se me ha dado de esa persona.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntarle y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Comprendo que puedo participar en esta investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Nombre del Participante: \_\_\_\_\_  
Firma del Participante: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Dialmes/jaho

Si es analfabeto

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_  
Huella dactilar del participante: \_\_\_\_\_  
Firma del testigo: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Dialmes/jaho

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del Investigador: Amy Bethel Peralta Prado  
Firma del Investigador: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Dialmes/jaho

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado \_\_\_\_\_ (Iniciales del investigador/asistente)

**INSTITUCIÓN NACIONAL DE ESTUDIOS Y REFERENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS**  
**INER**  
División de Investigación Epidemiológica

**SALUD**  
MINISTERIO DE SALUD

**INcidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH**

**Confidencialidad**

No consideramos la identidad de aquellos que participan en la investigación. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. La información acerca de usted que se recoja durante la investigación será puesta fuera de alcance y solo los investigadores tendrán acceso a ella. Cualquier información acerca del estudio y se mantendrá a la vez de su nombre. Solo los investigadores tendrán acceso a ella. No será compartida ni entregada a nadie excepto la Dirección Ejecutiva de Investigación Epidemiológica.

**Compartiendo los Resultados**

Los hallazgos de la investigación serán compartidos más ampliamente, mediante publicaciones y conferencias, y no se usarán datos personales de identificación y no se compartirá información confidencial.

**Derecho a negarse o retirarse**

Usted no tiene que participar en esta investigación si no desea hacerlo y si negarse a participar no le afectará en ninguna forma a que sea tratado en el futuro. Puede dejar de participar en la investigación en cualquier momento que desee sin perder sus derechos como paciente aquí. Su tratamiento en esta clínica no será afectado en ninguna forma.

**A Quién Contactar**

Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea hacer preguntas más tarde, puede contactarme:

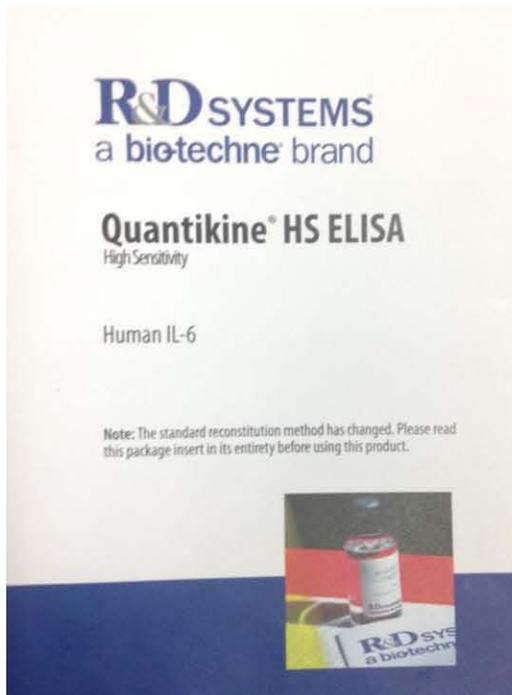
Amy Bethel Peralta Prado  
Celular: 04455 4495 5394  
e-mail: amy\_pp34@hotmail.com

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el comité de investigación y bioética del Centro de Estudios e Investigaciones Epidemiológicas. Si usted desea averiguar más sobre este comité, contacte

**APROBADO**  
11 DE 2016  
INER

# Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

## ANEXO 3. Protocolo de ELISA IL-6



**REAGENT PREPARATION**  
Bring all reagents to room temperature before use.

**Note:** Alkaline phosphatase is detectable in saliva. Take precautionary measures (e.g. wear a mask and gloves) to prevent reagents during preparation and use while running the assay (always preparation through the addition of Stop Solution).

**Wash Buffer** - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 100 mL of Wash Buffer Concentrate to deionized or distilled water to prepare 1000 mL of Wash Buffer.

**Substrate Solution** - Reconstitute the lyophilized Substrate with 6.0 mL of Substrate Diluent at least 10 minutes before use. **Re-stopper and re-cap** the vial, and mix thoroughly. Avoid contamination.

**Amplifier Solution** - Reconstitute the lyophilized Amplifier with 6.0 mL of Amplifier Diluent at least 10 minutes before use. **Re-stopper and re-cap** the vial, and mix thoroughly. Avoid contamination.

**Calibrator Diluent RD6-11 (diluted 1:2) - For urine samples only.** Add 10 mL of Calibrator Diluent RD6-11 Concentrate to 10 mL of deionized or distilled water to prepare 20 mL of Calibrator Diluent RD6-11 (diluted 1:2).

**Human IL-6 HS Standard - Refer to the vial label for reconstitution volume.** Reconstitute the Human IL-6 HS Standard with Calibrator Diluent RD6-11 Concentrate (for serum/plasma samples) or Calibrator Diluent RD6-11 (diluted 1:2) (for urine samples). This reconstitution produces a stock solution of 10 pg/mL. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions.

Pipette 500 µL of Calibrator Diluent RD6-11 Concentrate (for serum/plasma samples) or Calibrator Diluent RD6-11 (diluted 1:2) (for urine samples) into each tube. Use the stock solution to produce a dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The reconstituted standard stock serves as the high standard (10 pg/mL). The appropriate Calibrator Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).

**ASSAY PROCEDURE**  
Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.

**Note:** Alkaline phosphatase is detectable in saliva. Take precautionary measures to protect reagents (e.g. wear a mask and gloves).

1. Prepare all reagents and working standards as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reuse.
3. Add 100 µL of Assay Diluent RD1-75 to each well. *Assay Diluent RD1-75 may contain a preservative. Mix well before and during use.*
4. Add 100 µL of Standard or sample per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal orbital microplate shaker (0.121 m/s<sup>2</sup>) set at 500 ± 50 rpm. A plate layout is provided to record standards and samples assayed.
5. Wash
  - a. Excessive drying of the wells can lead to poor assay performance and irregularities. Subsequent reagents should be added immediately after washing the plate, and the wells should not be allowed to dry. Additionally, avoid prolonged exposure of the wells to vacuum aspiration apparatus.
  - b. Inclusion of a 30 second soak between each addition of Wash Buffer and decanting of the plate contents will improve the precision of the assay.
6. Wash Procedure
  - a. Remove liquid from the wells by inserting the plate and decanting the contents.
  - b. Remove excess liquid by grasping the plate firmly and quickly tapping the plate inverted on a clean paper towel at least 5 times.
  - c. Fill each well with 400 µL of Wash Buffer using a squirt bottle, manifold dispenser, or auto-washer.
  - d. Remove liquid from the wells by inserting the plate and decanting the contents or by aspirating the contents with an auto-washer.
  - e. Repeat steps b-d five times for a total of 6 washes. After the last wash, quickly cap the inverted plate on a clean paper towel at least 10 times to remove excess Wash Buffer.
7. Add 200 µL of Human IL-6 HS Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 2 hours at room temperature on the shaker.
8. Repeat the wash as in step 5.
9. Add 50 µL of Substrate Solution to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 60 minutes at room temperature **on the benchtop. Do not wash the plate.**
10. Add 50 µL of Amplifier Solution to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 30 minutes at room temperature **on the benchtop.**

**Note:** The addition of Amplifier Solution initiates the color development.
11. Add 50 µL of Stop Solution to each well. The addition of Stop Solution does not affect the color in the wells.
12. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 490 nm. If wavelength correction is available, set to 650 nm or 690 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 650 nm or 690 nm from the readings at 490 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 490 nm without correction may be higher and less accurate.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

www.rndsystems.com

# Incidencia de la falla al tratamiento antirretroviral, con enfoque en la falla inmunológica en una cohorte de pacientes con infección por VIH

### CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.).

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the human IL-6 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

### TYPICAL DATA

These standard curves are provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.

#### SERUM/PLASMA ASSAY

(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.150	0.112	—
	0.174	—	—
0.156	0.168	0.170	0.018
	0.173	—	—
0.313	0.214	0.221	0.089
	0.222	—	—
0.625	0.296	0.304	0.172
	0.311	—	—
1.25	0.447	0.458	0.326
	0.469	—	—
2.5	0.711	0.732	0.620
	0.722	—	—
5.0	1.148	1.133	1.043
	1.401	—	—
10	2.195	2.428	2.346
	2.566	—	—

#### URINE ASSAY

(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.113	0.111	—
	0.133	—	—
0.156	0.165	0.167	0.014
	0.168	—	—
0.313	0.210	0.214	0.081
	0.217	—	—
0.625	0.301	0.306	0.173
	0.332	—	—
1.25	0.445	0.467	0.314
	0.489	—	—
2.5	0.712	0.779	0.646
	0.806	—	—
5.0	1.111	1.139	1.206
	1.346	—	—
10	2.429	2.639	2.328
	2.888	—	—

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

### PRECISION

#### Intra-assay Precision

(Precision within an assay)  
Three samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess intra-assay precision.

#### Inter-assay Precision

(Precision between assays)  
Three samples of known concentration were tested in separate assays to assess inter-assay precision. Assays were performed by at least three technicians using two lots of components.

#### SERUM/PLASMA ASSAY

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	36	36	36
Mean (pg/mL)	0.436	2.45	5.53	0.490	2.78	5.65
Standard deviation	0.030	0.19	0.41	0.047	0.20	0.37
CV (%)	6.9	7.8	7.4	9.6	7.2	6.5

#### URINE ASSAY

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	35	35	35
Mean (pg/mL)	0.526	1.09	5.77	0.502	2.78	5.62
Standard deviation	0.052	0.18	0.32	0.056	0.19	0.31
CV (%)	9.8	5.8	5.5	11.2	6.8	5.5

### RECOVERY

The recovery of human IL-6 spiked to levels throughout the range of the assay in various matrices was evaluated.

Sample Type	Average % Recovery	Range
Serum (n=8)	94	87-99%
EDTA plasma (n=8)	97	84-119%
Citrate plasma (n=8)	106	90-125%
Urine (n=8)	102	93-112%

www.RnDSystems.com

### LINEARITY

To assess the linearity of the assay, samples spiked with high concentrations of human IL-6 were serially diluted with the appropriate Calibrator Diluent to produce samples with values within the dynamic range of the assay.

	Serum (n=8)	EDTA plasma (n=8)	Citrate plasma (n=8)	Urine (n=8)
1:2	Average % of Expected: 106 Range (%): 101-112	107 99-114	102 96-112	100 96-106
1:4	Average % of Expected: 107 Range (%): 94-118	107 102-115	98 90-105	98 91-105
1:8	Average % of Expected: 108 Range (%): 100-120	103 90-116	102 93-112	98 91-102
1:16	Average % of Expected: 108 Range (%): 99-118	98 78-114	108 98-120	99 94-106

### SENSITIVITY

Seventy-one assays were evaluated and the minimum detectable dose (MDD) of IL-6 ranged from 0.016-0.110 pg/mL. The mean MDD was 0.039 pg/mL.

The MDD was determined by adding two standard deviations to the mean optical density value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

### CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against a highly purified *E. coli*-expressed recombinant human IL-6 produced at RnD Systems.

The NIBSC/WHO IL-6 1st International Standard 89/548, which was intended as a potency standard, was evaluated in this kit. This standard is a CHO cell-derived recombinant human IL-6. Each ampule contains a nominal 1 µg of glycosylated recombinant human IL-6 and was assigned a unitage of 100,000 International Units/ampule.

The dose response curve of this 1st International Standard parallels the Quantikine HS standard curve. To convert sample values obtained with the Quantikine HS Human IL-6 kit to approximate NIBSC 89/548 mass values, use the equation below.

NIBSC (89/548) approximate value (IU/mL) = 0.124 x Quantikine HS Human IL-6 value (pg/mL)

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

### SAMPLE VALUES

Samples from apparently healthy volunteers were evaluated for the presence of human IL-6 in this assay. No medical histories were available for the donors used in this study.

Sample Type	Mean of Detectable (pg/mL)	% Detectable	Range (pg/mL)
Serum (n=52)	1.77	100	0.443-9.96
EDTA plasma (n=23)	1.49	100	0.428-6.87
Citrate plasma (n=16)	1.57	100	0.415-6.17
Urine (n=14)	1.67	91	80-6.76

ND=Non-detectable

### SPECIFICITY

This assay recognizes natural and recombinant human IL-6.

The factors listed below were prepared at 50 ng/mL in Calibrator Diluent and assayed for cross-reactivity. Preparations of the following factors at 50 ng/mL in a mid-range recombinant human IL-6 control were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed.

Recombinant human:	Recombinant mouse:	Recombinant rat:
Epo	CTLA-4	CNTF
Fas	Fas	GDNF
GDNF	IFN-γ	IFN-γ
GTR	IL-6	IL-1α
GTR Ligand		IL-1β
IFN-γ		
IL-4		

Recombinant porcine IL-6 shows 0.01% cross-reactivity and recombinant mouse CT-1 shows 0.004% cross-reactivity in this assay.

Recombinant human (rh) sgp130 and rhIL-6 sR and the rhsgp130/rhIL-6 sR complex were prepared at physiological levels in Calibrator Diluent and assayed for cross-reactivity. Preparations of rhsgp130, rhIL-6 sR, and rhsgp130/rhIL-6 sR complex in a mid-range recombinant human IL-6 control were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed with sgp130. IL-6 sR interfered at concentrations ≥ 20 ng/mL. The rhsgp130/rhIL-6 sR complex interfered at concentrations ≥ 500 ng/mL. rhsgp130 and ≥ 50 ng/mL rhIL-6 sR.

www.RnDSystems.com