112387

2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRIA

"DESCRIPCION DE MUTACIONES ASOCIDADAS A RESISTENCIA A INHIBIDORES NUCLEOSIDOS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA EN UNA MUESTRA DE NIÑOS CON INFECCION POR EL VIH-1, EN TRATAMIENTO COMBINADO".

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN
INFECTOLOGIA PEDIATRICA
P R E S E N T A:

DR. CARLOS ALBERTO DAZA TIMANA

TUTORES DE TESIS:
QBP MA. TERESA ALVAREZ Y MUÑOZ
DR. GUILLERMO VAZQUEZ ROSALES
ASESOR METODOLOGICO:
DR. ALEJANDRO GOMEZ DELGADO
COLABORADORES:
DR. FORTINO SOLORZANO
DR. JAVIER TORREZ LOPEZ
DR. ONOFRE MUÑOZ HERNANDEZ

México, D.F. 2000

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Dr Agustin Mercado Arellano
Jefe de Enseñanza
e Investigación.
Hospital de Pediatría CMN SXXI. IMSS.

QBP Ma Teresa Alvarez y Muñoz
Jefe del Laboratorio de Virología U.I.M.E.I.P.
Hospital de Pediatría CMN SXXI. IMSS.

Dr Guillermo Vázquez Rosales
Médico abscrito al servicio de Infectología.
Hospital de Pediatría CMN SXXI. IMSS.

DEDICATORIA.

Al amor que siempre ha acompañado nuestro hogar, y ha hecho posible forjar cada uno de mis sueños gracias padres, hermano, familia y amigos.

A cada uno de los docentes por haberme brindado no solo su tiempo sino también sus conocimientos.

A la sonrisa de los niños, esperando que este trabajo brinde una luz de esperanza.

Y a ti Dios.

MEDICINA
Servs Escolares
NOV. 18 / 2000
Servicios Escolares
Egresado

CONTENIDO.

Resumen.	Página 5
Antecedentes.	Página 7
Justificación	Página 14
Objetivos.	Página 15
Material y métodos.	Página 16
Resultados.	Página 23
Discusión	Página 28
Conclusiones.	Página 33
Bibliografía.	Página 39

DESCRIPCION DE MUTACIONES ASOCIDADAS A RESISTENCIA A INHIBIDORES NUCLEOSIDOS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA EN UNA MUESTRA DE NIÑOS CON INFECCION POR EL VIH-1 EN TRATAMIENTO COMBINADO.

La gran diversidad genética del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), es generada por su sistema de replicación, en el cual la transcriptasa reversa (TR), que transcribe RNA a DNA no cuenta [illegible] variación genética que acompaña a la dinámica de la replicación del VHI es la adquisición de resistencia a la terapia empleada para su tratamiento. Para guiar la terapia antirretroviral se han desarrollado pruebas de resistencia genotípicas y fenotipicas.

OBJETIVOS. Identificar por medio de la técnica de prueba lineal de sonda genotípica (LiPA) las mutaciones presentes en un grupo de niños infectados con VIH-1 que presentaron falla terapeútica al [illegible]

MATERIAL Y METODOS.

Diseño: descriptivo

Se incluyeron 10 pacientes con diagnóstico confirmado de HIV-1 que fueron manejados de abril de 1997 a octubre de 1998 en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo tratamiento combinado.

Se incluyeron dos muestras por paciente, una la inicio y otra cuando falló la terapia combinada, todas fueron procesadas con la técnica de LiPA en el laboratorio de virología de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias.

RESULTADOS En siete de diez pacientes se encontraron mutaciones asociadas a resistencia en el genoma de la TR del VIH-1. La mayoría de estas mutaciones se describen asociadas a resistencia a AZT (M41L, K70R,T215Y) y solamente en dos casos se encontraron mutaciones relacionadas con resistencia a ddI (L74V), para ddC (T69D). Existe una aparente asociación entre el tiempo de adminitración y el tipo de terapia con la aparición de estas mutaciones.

CONCLUSIONES. Las mutaciones más frecuentemente encontradas estan asociadas con la resistencia a AZT, el cual fue él fármaco más frecuente y por más largo tiempo utilizado. La técnica de LiPA fue capaz de detectar mutaciones capaces de conferir resistencia a fármacos antirretrovirales en el 70% de los pacientes con falla terapéutica. Se requiere el desarrollo de nuevos métodos genotípicas que tengan la capacidad de detectar todas las mutantes asociadas a los diferentes fármacos antirretrovirales hasta ahora conocidos.

ANTECEDENTES:

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), fue desconocido antes de 1982, el reconocimiento de un síndrome inusual, caracterizado por severa inmunodeficiencia e infecciones oportunistas, abocó un esfuerzo multinacional para identificar el agente etiológico. Así, en 1984 el VIH había podido ser aislado en cultivos celulares. Dos tipos de VIH pudieron ser distinguidos genética y antigénicamente, los que han sido denominados VIH-1 y VIH-2. En 1991 se logró tener la secuencia genética total del virus, constituido aproximadamente por 10,000 bases, demostrándose a través de secuenciación genética y filogenia distintos subtipos tanto para el VIH-1 como para el VIH-2, los cuales pertenecen a la familia *Retroviridae* .

Se ha calculado que diariamente son producidos aproximadamente 10 billones de viriones en un sujeto con una infección establecida por VIH[1,2]. Se conoce además, que en promedio aparece una mutación por cada 9,200 bases copiadas, dando una gran diversidad genética.

Mutación o variante es el término que se utiliza para designar a un virus que difiere en alguna forma del virus salvaje o "wild – type". Esta es principalmente generada por su sistema de replicación, en el cual la transcriptasa reversa (TR) que transcribe RNA a DNA no cuenta con un sistema para reparar los errores de su lectura con lo cual, cada virus que se produce es ligeramente diferente[5]. La más importante consecuencia de la variación genética que acompaña a la dinámica de la replicación del VIH es la adquisición de resistencia a la terapia empleada para su tratamiento [2,4], haciendo posible que surja una mutante resistente a un medicamento diariamente[2,3], sin embargo, la probabilidad que surjan mutantes resistentes a 3 o más drogas en el mismo genoma es muy baja[3]. Las mutaciones en un sitio crítico, tales como genes que codifican para proteínas estructúrales, reguladoras o enzimas, pueden afectar diferentes aspectos como: comportamiento viral, virulencia, capacidad para replicación, competencia, citotoxicidad y respuesta a la terapia antirretroviral. Las mutaciones en el

gen de la TR pueden ser usadas como marcadores genotípicos para identificar la presencia de resistencia, usualmente la suma de las mutaciones conlleva a un alto nivel de resistencia, pero también puede presentarse antagonismo en el grado de la misma.

Estas mutaciones son denominadas como: primarias, cuando son seleccionadas tempranamente en el proceso de acumulación de resistencia y son relativamente específicas para un inhibidor, pudiendo tener un efecto discernible sobra la susceptibilidad de los virus a los medicamentos Aquéllas mutaciones denominadas como secundarias, suceden cuando el genoma viral ya contiene una o más mutaciones primarias y pueden ser seleccionadas debido a que mejoran la capacidad de replicación viral, más que por la disminución en la sensibilidad a medicamentos dirigidos contra enzimas blanco[2].

Múltiples cepas de virus pueden presentar diversos niveles de resistencia a los agentes antirretrovirales, las cuales pueden persistir luego que la presión selectiva de la terapia antirretroviral ha sido retirada, como cuasiespecies dominantes o en menor nivel simultáneamente en el plasma o en los diferentes compartimentos corporales

Algunas veces han sido detectadas cepas mutantes resistentes a la terapia antirretroviral antes de iniciar el tratamiento[6,7,34]. Estas mutantes resistentes representan únicamente una pequeña porción de la carga viral, las cuales exhiben presumiblemente una desventaja en cuanto a replicación competitiva, comparada con el virus salvaje. Como ejemplo de ello en el 6% de los pacientes en el estudio DELTA 1 presentaron mutación en el codon 70 o 215 de la RT y en el 13% de los pacientes en el estudio ACTG 175 presentaron mutación en el codon 215 de la misma enzima antes de iniciar cualquier tratamiento. Sin embargo, la presión selectiva de la terapia antiviral puede llevar a que estas mutantes sean las especies dominantes.

El mecanismo preciso por el cual esas mutaciones causan resistencia no se ha podido esclarecer, la unión del análogo de nucleósido a TR no parece estar alterada. Dos mecanismos se han propuesto con base a trabajos "*in vitro*". La mutación el codon 67 y 70 parecen incrementar la fosforilación, y la

remoción del nucleósido terminal de la cadena de DNA en crecimiento. Esta reacción puede resultar en la remoción del AZT, y así evadir el bloqueo en la TR. Estas dos propiedades complementarias, el aumento de la pirofosforilación y la remoción del nucleósido terminal pueden explicar porque los pacientes con virus resistentes a AZT son menos susceptibles a otros tratamientos con inhibidores nucleósidos de la TR [46]. Durante la terapia con AZT, se observa la aparición secuencial de estas mutaciones [13,14] La primera sustitución se presenta en el codón 70 (Arg70 a Lys) y es una dominante transitoria y decisiva durante la falla virológica, pudiendo aparecer a las 12 semanas de haber iniciado el tratamiento. Al mantenerse dicha terapia esta mutación es sustituida por una población de mutantes más estables, las cuales presentan la sustitución en el codón 215 (Thr215-Tyr y Thr215-Phe) usualmente después de un año de terapia con AZT. Posteriormente se adicionan mutaciones en el codón 41 (Met41-Leu), siendo estas dos mutaciones (215 y 41) generalmente encontradas en combinación. Los virus que las contienen son sesenta veces menos susceptibles a AZT Variantes adicionales pueden aparecer en el codón 67 (Asp67-Asn) y 219 (Lys219-Gln). La reaparición de la mutación en el codón 70 [13],pueden en conjunto con las mutaciones anteriormente señaladas dar un alto nivel de resistencia a AZT (más de cien veces).

Durante la terapia de AZT más ddI ó AZT más ddC, aparece la mutación Q151M la cual hace que el virus sea aproximadamente diez veces menos sensible al AZT. A su vez esta mutación es suficiente para generar resistencia a todos los análogos de nucleósidos, incluido ddI y ddC. La aparición de la mutación Q151M es seguida por el desarrollo de cuatro mutaciones adicionales (F77L, F116Y, A62V, V75I) que resultan en una variante viral que es 320 veces menos sensible a AZT, y que además generan resistencia a múltiples análogos de nucleósidos. La presencia de una o varias de estas cinco mutaciones parecen predisponer al virus a desarrollar las restantes mutaciones asociadas con la resistencia múltiple a los análogos de nucleósidos [4]. La frecuencia de mutaciones Q151M en el gen de la transcriptasa reversa en las personas tratadas con AZT/ddI durante un año o más se halla en el rango de cero a 10% [21].

El mecanismo de resistencia para ddI, d4T, 3TC y algunas mutantes resistentes a AZT es a través de la alteración estructural de la enzima TR, lo cual permite tomar preferencialmente el trifosfato deoxynucleosido natural, más que al inhibidor trifosfato.

La resistencia a ddI está frecuentemente asociada con una mutación en el codon 74 (Leu-Val), la cual confiere de 4 a 10 veces reducción a la susceptibilidad a ddI. Esta mutación antagonisa la resistencia fenotípica causada por el codon 215. Otras variantes asociadas con la resistencia a ddI son la mutaciones en el codon 65 y 184. La mutación en el codon 65 (Lys-Arg) se halla asociada con un incremento de 3 a 5 veces en la concentración de ddI requerida pare inhibir la replicación viral y la mutación en el codón 184 (Met-Val) se encontró que disminuía susceptibilidad en cinco veces a ddI y también se ha visto asociada con resistencia cruzada a 3TC.

La resistencia a ddC parece ocurrir menos frecuentemente que para AZT, después de un año de tratamiento ocurren en un 20-30 por ciento de los pacientes. Las mutaciones asociadas con la resistencia a ddC se han identificado en los codones: 65, 69, 74 y 184. La mutación en el codón 65 (Lys-Arg) reduce de cinco a diez veces la sensibilidad, la variante 69 (Thr-Asp) reduce en cinco veces y la mutación en el codón 74 (Leu-Val) produce una reducción de diez veces para el ddC.

Los NNRTI son potentes inhibidores de la replicación del VIH-1. Estos medicamentos no requieren de ningún metabolismo intracelular. Y su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la transcriptasa reversa por medio de la unión directa a la subunidad p66 de la enzima

El alto nivel de resistencia a NNRTI puede desarrollarse rápidamente, incluso a los pocos dias de haber iniciado la monoterapia, debido a los cambios en el sito de unión en la subunidad p66. La mayoría de las mutaciones que determinan la resistencia a los NNRTI ocurren en el grupo de los codones: 100-108 y 181-190 [11]. Ninguna de estas mutaciones se traslapa con mutaciones que

confiera resistencia a los nRTI. Sin embargo, algunas mutaciones pueden causar resistencia cruzada amplia a todos los miembros de NNRTI (por ejemplo K103N)[2].

Actualmente se recomienda que en el tratamiento de los pacientes infectados por VIH-1 los fármacos en los cuales una sola mutación es requerida para un alto nivel de resistencia como son lamivudina y nevirapine sean reservados para su uso combinado con otros medicamentos, además se recomienda usar regímenes que conduzcan a una supresión máxima de la replicación viral y la terapia debe ser diseñada para conferir supresión máxima de las variantes genéticas existentes. A pesar de ello, pueden surgir virus mutantes resistentes, en sitios como el sistema nervioso central (SNC) y el tracto genital, en donde la penetración de los medicamentos es pobre favoreciendo una continua replicación viral en estos sitios.

En el momento actual las técnicas de laboratorio existentes para determinar la sensibilidad de VIH-1 a diversos fármacos pueden ser genotípicas y fenotípicas.

Las pruebas fenotípicas son tenidas actualmente como referencia porque miden en forma directa la susceptibilidad y sus resultados son expresados en concentración inhibitoria al 50% ó 90% (CI_{50} o CI_{90}), sin embargo, entre sus inconvenientes se encuentra que los resultados son obtenidos en el término de semanas, se requiere de mayor tecnología, son costosas, y de escasa disponibilidad. Por otra parte, no detecta variantes presentes en escasa cantidad y puede existir selección viral durante los cultivos repetidos del VIH [2]. Algunas de estas técnicas son: cultivo de tejidos, virus recombinantes y determinación de la susceptibilidad de la transcriptasa reversa [2].

La resistencia genotípica de la transcriptasa reversa puede ser determinada por medio de diferentes métodos de biología molecular: Southern blotting [32], PCR primer específico [31], reacción para la detección ligasa de PCR [29], pruebas de mutación puntual [30], hibridación con sondas marcadas [28] y prueba lineal de sonda genotípica (LiPA) [33]. Esta última prueba, tiene la capacidad de detectar la

mutación entre el 82,4 - 100 % (con un promedio de 92,7%) y una especificidad del 100% [33]. Todas estas técnicas permiten obtener los resultados en corto tiempo, son de menor costo y tienen la ventaja teórica de que el genotipo precede al fenotipo. Entre sus limitaciones se encuentra el medir en forma indirecta la susceptibilidad, la cual puede no correlacionar con la resistencia fenótipica, no pueden detectar variantes presentes en menor cantidad (especies que constituyan menos del 20% del producto amplificado). Además no permite detectar y/o interpretar mutaciones que no hayan sido previamente correlacionadas con las pruebas fenotípicas [2]. La información sobre la utilidad de estas pruebas apenas comienza a ser valorada. En varios estudios se ha encontrado que el análisis genotípico sobre el VIH -1 predice de manera significativa la respuesta o no al tratamiento según el tipo y el número de mutaciones detectadas, previo al inicio de la terapia [51,52,53].

Aunque esos resultados son alentadores, es importante tener en cuenta que: 1) debido a su diseño restrospectivo, en ninguno de esos estudios el tratamiento se basó en los resultados de las pruebas de resistencia. 2) La respuesta virológica fue definida en forma variable. 3) El seguimiento fue relativamente breve y por último 4) el tamaño de las muestras en algunos de esos estudios fue relativamente pequeño.

En este año aparecieron los primeros estudios de regímenes de salvamento guiados por el genotipo como el estudio VIRADAT, en cual el conocimiento de las secuencias de genes específicos de HIV-1 mejoraron la habilidad en la selección de la terapia de salvamento al ser comparado con el grupo control en el cual los médicamentos seleccionados para la terapia de salvamento fueron basados en el juicio clínico sin conocer los datos genotípicos. La supresión de la carga viral fue mayor en aquéllos que la terapia fue guiada por los genotipos que en el grupo control a los 3 y 6 meses [40]. Similar diseño fue usado en el estudio GART (CPCRA 046), en el cual la determinación previa de sensibilidad genotípica se asociaron con un mejor resultado [35]. En estos estudios se tienen limitaciones como son: no se conocen todos los sitios de resistencia, los efectos de las interacciones entre las mutaciones sobre los diferentes codones apenas comienzan a ser entendidos y diferentes

decisiones pueden surgir de igual información genotípica, lo cual hace difícil que el estudio pueda ser reproducible. Adicionalmente los regímenes usados no fueron iguales en los dos grupos de trabajo. A pesar de esas limitaciones, el estudio VIRADAPT sugiere que los datos genotípicos unidos a antecedentes de medicamentos recibidos puede ayudar a mejorar la decisión sobre el regímenes de salvamento [54].

En síntesis las pruebas de resistencia genotípicas y fenotípicas proporcionan información de las variantes virales predominantes y de las subpoblaciones que constituyan al menos el 20% de la población viral, la ausencia de resistencia a los medicamentos empleados no descarta la existencia de mutantes resistentes, que pueden emerger rápidamente luego que el medicamento se ha instituido. Pero en general, hay buena correlación entre mutaciones vistas en el laboratorio y los aislamientos clínicos de pacientes que fallan al tratamiento.

La información de resistencia y patrones de resistencia cruzada podrían guiar la decisión terapéutica unido con la carga viral y conteo de CD4 [34,35].

JUSTIFICACION.

Los análogos de nucleósidos fueron los primeros fármacos utilizados en el manejo del VIH-1, aunque se cuenta con estudios sobre esta terapia, no contamos con estudios dirigidos a conocer si el fenómeno de mutación en gen de la TR asociada con resistencia a los análogos de nucleósidos se presentó en un grupo de niños que fallaron al tratamiento combinado de inhibidores de TR e inhibidores de proteasas. Adicionalmente, se desconoce si las mutaciones que han sido descritas en individuos adultos están presentes en el grupo pediátrico, lo cual puede llevar a estudios prospectivos sobre la toma de decisiones al inicio o durante la modificación del manejo terapéutico.

OBJETIVOS.

PRICIPAL.

Identificar por medio de la técnica de LiPA las mutaciones presentes en un grupo de niños infectados con VIH-1 que presentaron falla terapeútica al tratamiento combinado.

SECUNDARIO:

Determinar si las mutaciones que han sido descritas en la literatura mundial en el gen de la TR que se hallan asociadas a resistencia al manejo con inhibidores de esta enzima en pacientes adultos infectados por el VIH-1, están presentes en un grupo de niños que recibieron tratamiento combinado para el VIH-1, y los cuales presentaron falla terapéutica.

MATERIAL Y METODO.

DISEÑO.

Descripción de casos.

CRITERIOS DE INCLUSION:

Diagnóstico de infección por VIH-1 confirmado.

Pacientes que recibieron manejo con triple terapia antirretroviral (dos análogos de nucleósidos y un inhibidor de proteasas)

Se contara con muestras de plasma de los pacientes correspondientes al momento del inicio de la terapia triple y al momento de presentar un incremento en la carga viral mayor o igual a 0.5 $\log_{10}$ o progresión de un estadio clínico a otro.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

Pacientes en los cuales no fue posible recolectar datos sobre: tratamiento instituido ó periodo de tiempo administrado.

Pacientes en que se contó con el antecedente de falla terapéutica pero se carecía de alguna de las dos evaluaciones de la carga viral.

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO:

Estudio de pacientes infectados por VIH-1 que fueron manejados en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, quienes recibieron manejo con triple terapia antirretroviral (dos análogos de nucleósidos y un inhibidor de proteasas). El estudio se realizó en forma prolectiva longitudinal. En los menores de 2 años, el diagnóstico estuvo basado en el cultivo viral y en la determinación del antígeno p24; en los mayores de esa edad, en la prueba de ELISA, confirmada por Western Blot De cada uno se contó con muestras de plasma: una al momento de iniciar el tratamiento combinada y otra al momento de mostrar falla terapéutica, medida por el incremento en al carga viral mayor o igual de 0.5 $\log_{10}$ o progresión de un estado clínico a otro.

Los datos se recolectaron en formularios diseñados para tal fin, la información para llenar tales cuestionarios fue obtenida de los expedientes clínicos y del proyecto de investigación de terapia combinada (ANEXO 1).

Se anotaron en el formulario los medicamentos antirretrovirales administrados a los pacientes. Estas dosis fueron comparadas con las dosis de los medicamentos antirretrovirales recomendados por el CDC en su reporte del MMWR N° 4 en 1998. Si estaba acorde con la dosis recomendada se tomó como dosis Adecuada o Inadecuada si no estaba dentro de dicho rango.

El tiempo de administración de cada medicamento se tomó de acuerdo a con lo consignado en su expediente. La verificación del cumplimiento en la toma de sus medicamentos se evaluó mediante interrogatorio dirigido a los padres o responsables del cuidado del paciente (datos tomados del proyecto de investigación de terapia combinada).

En el caso de los pacientes pediátricos en los cuales se consideró la vía vertical la forma de adquisición de la infección por VIH-1, se buscó en el expediente del niño, si la madre recibió algún

tratamiento anti VIH-1 durante la gestación. En el caso que la madre hubiera recibido tratamiento antirretroviral durante la gestación se anotó en el formulario como "positivo", anotando adjunto cual fue el medicamento o los medicamentos indicados y durante cuanto tiempo siguió la prescripción médica. Si la madre no recibió ningún tratamiento antirretroviral se clasificó como "negativo".

La carga viral durante la terapia al igual que el número de linfocitos CD4 se tomaron de los datos que aparecen en su registro médico (reporte oficial). Para la determinación de la carga viral en el grupo de pacientes pediátricos se usó la prueba de Amplicor monitor Roche® para VIH-1, versión 1.5, que consiste en una amplificación "in vitro" de ácidos nucleicos para la cuantificación del RNA del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 en plasma humano, la cual tiene un límite de detección de 400 copias/ml.

Se uso la clasificación del SIDA dada por el CDC en el MMWR N°RR-12 en 1994. Si la estadificación del paciente en el expediente aparecía en una clasificación diferente a esta, se tomaron los datos que aparecían en su historia clínica para reclasificarlo según la norma del CDC dada en 1994.

IDENTIFICACION DE MUTACIONES.

Las muestras de sanqre fueron recolectadas en tubos de 5cc con EDTA, el plasma fue separado y permaneció almacenado a menos 76°C hasta su procesamiento. Para la identificación de las mutaciones en el gen de la TR se tomó una alicuota de plasma de las muestras que fueron enviadas al laboratorio de Virología del Hospital de Pediatría del CMN IMSS Siglo XXI para la determinación de carga viral. Se determinó la presencia de mutaciones localizadas en el gen de la TR del VIH-1 mediante la técnica de LiPA (MUREX-INNOGENTICS®), para AZT (M41L, K70R, T215Y, T215F), ddI (L74V, M184V, V75T), ddC (T69D, L74V, V75T, M184V) y 3TC (M184V) [32]. El principio de esta prueba está basado en la hibridación reversa. Los iniciadores "*primers*" están dirigidos contra determinados segmentos cortos de la VIH-TR, los cuales están asociados con la

resistencia a los inhibidores de esta enzima. El material es amplificado por medio de una TR y posterior reacción de la polimerasa en cadena (PCR) anidada, en el que se utilizaron dos pares de iniciadores: un par denominado externo que sirve para una primera reacción en que se genera un fragmento de DNA, y un segundo par biotinilado, denominado interno que toma como molde al fragmento generado en la primera reacción y que tiene secuencias complementarias a una región interna de dicho fragmento. El producto de esta reacción es inmovilizado mediante una hibridación reversa sobre tiras de papel que contienen sondas de oligonucleótidos con las mutaciones específicas, la hibridación posteriormente puede ser detectada por medio del acoplamiento a estreptavidina a través un sistema colorimétrico. Las bandas se observaran como líneas paralelas sobre la tira de papel. La posición de las bandas obtenidas en cada caso, será comparada con un patrón de referencia, cada una de estas bandas representa una variante que ya ha sido previamente asociada con una resistencia genotípica.

VARIABLES.

Cualitativas

Mutaciones en el gen de TR

Mutaciones en el genoma de la TR del VIH-1 que confieren resistencia a los análogos de nucleósidos administrados, a través de la técnica de LiPA (MUREX-INNOGENETICS®)[33,44]. M41L, K70R, T215Y, T215F, L74V, M184V, V75T, T69D.

Falla terapéutica

Basados en el consenso del grupo de Infectólogos Pediatras del Hospital de Pediatría CMN siglo XXI, se consideró falla al tratamiento antirretroviral cuando se presentó alguna de las siguientes circunstancias: progresión de una categoría clínica a otra (criterio de falla clínica), descenso menor de 0.5 $\log_{10}$ en la carga viral a los tres meses de tratamiento; aumento de la carga viral de 0.5 $\log_{10}$ en ese mismo periodo de tiempo o un incremento de la carga viral mayor de 1 $\log_{10}$ una vez

alcanzado el nadir de la carga viral(criterio de falla virológica).

Medicamentos antirretrovirales.

Medicamentos antirretrovirales análogos de nucleósidos (AZT, ddI, ddC) e inhibidores de proteasa (SQV cápsulas de gel duro).

Dosis de los medicamentos utilizados.

Se tomaron de referencia las dosis de los medicamentos y las interaciones medicamentosas antirretrovirales dadas por el CDC en su reporte del MMWR N° 4 en 1998 para la prescripción de estos fármacos.

Estadificación del SIDA.

Se usó la clasificación del SIDA dada por el CDC en el MMWR N°RR-12 en 1994. Si la estadificación del paciente en el expediente aparece en una clasificación diferente a esta, se tomaron los datos que aparecen en su historia clínica para reclasificarlo según la norma del CDC dada en 1994.

Cuantitativas

Tiempo de administración de los medicamentos.

Tiempo de administración de cada medicamento. El cual se tomó de acuerdo a con lo consignado en su expediente.

Carga viral y conteo de CD4.

Para la determinación de la carga viral en el grupo de pacientes pediátricos se usó prueba de Amplicor monitor Roche® para VIH-1, versión 1.5. Para el estudio se tomaron los datos que aparecen en su registro médico en el reporte oficial de carga viral al igual que el número de linfocitos CD4 al inicio de la terapia triple y al momento de presentar un incremento en la carga viral mayor o

igual a 0.5 log_{10}.

Tratamiento prenatal

En el caso de los pacientes pediátricos en los cuales se consideró la vía vertical la forma de adquisición de la infección por VIH-1, se buscó en el expediente del niño, si la madre recibió algún tratamiento anti VIH-1 durante la gestación.

VARIABLE DE CONFUSION:

La verificación del cumplimiento en la toma de sus medicamentos se evaluó mediante interrogatorio dirigido a los padres o responsables del cuidado del paciente(datos tomados del proyecto de investigación de terapia combinada).

Tratamiento previo antirretroviral recibido por el paciente: La información se obtuvo de los datos de la historia clínica anotando: el esquema de tratamiento y dosis indicada, fecha del inicio de la terapia y el tiempo que siguió la prescripción médica.

ANALISIS ESTADISTICO:

Los datos como edad y sexo se analizaron con medidas de tendencia central mediana (Md). En la descripción de las concentraciones del RNA viral en plasma, se utilizó el logaritmo de base diez de la carga viral obtenida para cada muestra y media geométrica (MG) para la descripción en conjunto. Para las variables de tipo cuantitativo (tiempo de administración de cada medicamento, y células CD4+) se utilizaron como medidas de resumen, rangos y mediana según su distribución.

PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO.

La metodología que se siguió en el laboratorio, estuvo basada en las recomendaciones del inserto de LiPA (MUREX-INNOGENETICS®).

RESULTADOS

De abril de 1997 a octubre de 1998 en el Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI, recibieron terapia combinada (AZT, ddI y SQV) 14 pacientes. Cuatro pacientes fueron excluidos: dos pacientes no presentaron falla terapéutica a esta terapia, otro paciente falleció y el otro egresó por mayoría de edad, en los cuales no se pudo contar con las muestras de plasma al inicio de la terapia combinada y/o al momento de la falla terapéutica. El grupo quedó constituido por seis niños y cuatro niñas. En la Tabla 1 se describen las características generales de los pacientes, así como sus parámetros de carga viral y células CD4+.

Vías de transmisión de infección.

Las rutas de transmisión perinatal y transfusional representaron 5 de 10, cada una de ellas. Los pacientes que adquirieron la infección de VIH-1 por vía vertical tenían una mediana (Md) de edad de 2.2 años (límites de 1.4 a 6.5), la mayoría (4 de 5) fueron clasificados a su ingreso en la categoría clínica B y en las categorías inmunológicas 2 y 3. Los cinco pacientes que adquirieron la enfermedad por transfusión, tuvieron a su ingreso una Md de edad de 14.9 años(límites de 10.4 a 16.8), de estos 2 fueron clasificados a su ingreso en la categoría C3, dos más en A3 y uno en B2 (Tabla 2).

Carga viral y cuenta de CD4+.

La MG de la carga viral al inicio de la terapia combinada para el grupo general fue de 5.24 copias/ml (rangos de 4.14 a 6.8), en el grupo de pacientes con infección perinatal la MG de la carga fue de 5.68 copias/ml (rangos de 4.5 a 6.8) y en el grupo de pacientes con infección transfusional fue de 4.83 copias/ml (rangos de 4.14 a 6.6). (Tabla 2).

La población de linfocitos CD4+ en el grupo de estudio al inicio de la terapia combinada presentó una Md de 183 cél/ul (rangos de 0 a 769). En el grupo de pacientes con infección perinatal la Md de la cuenta de CD4+ fue de 260 cél/ul (rangos 139 a 769) y en el grupo de pacientes con infección transfusional fue de 13 cél/ul (rangos de 0 a 300). (Tabla 2).

La MG de la carga viral al momento de presentar falla a la terapia combinada para el grupo general fue de 5.04 copias/ml (rangos de 4.19 a 6.3), en el grupo de pacientes con infección perinatal la MG de la carga fue de 4.73 copias/ml (rangos de 4.19 a 5.05) y en el grupo de pacientes con infección transfusional fue de 5.37 copias/ml (rangos de 4.7 a 6.3) (Tabla 3).

La población de linfocitos CD4+ en el grupo de estudio al momento de presentar falla a la terapia combinada presentó una Md de 160 cél/ul(rangos de 1 a 790). En el grupo de pacientes con infección perinatal la Md de la cuenta de CD4+ fue de 359 cél/ul(rangos 122 a 790) y en el grupo de pacientes con infección transfusional fue de 54 cél/ul(rangos 1 a 451). (Tabla 3).

Criterio de modificación de la terapia antirretrovaral.

El criterio de modificación de la terapia fue en 9 de 10 pacientes por incremento de la carga viral y en el 1 paciente por progresión clínica. (Tabla 1).

Terapia antirretroviral previa al tratamiento combinado.

Antes de la primera muestra para determinación de los genotipos asociados a resistencia en el genoma de TR del VIH-1, 9 de 10 pacientes habían recibido terapia previa con uno o dos inhibidores de TR. De estos, 2 recibieron monoterapia con AZT, (19 y 62 meses respecivamente), la cual fue seguida por terapia doble con AZT y ddI por 8 y 36 meses y posteriormente se adicionó SQV por 2 y 3 meses en cada uno de ellos. Otros 4 pacientes recibieron desde el inicio terapia doble con AZT y

ddI por una Md de 10 meses (rango de 4 a 10), también hubo 2 pacientes que recibieron AZT como monoterapia durante 26 y 46 meses respectivamente, la cual fue seguida por terapia doble con AZT y ddC por 7 y 19 meses respectivamente. Uno de ellos, previo al inicio del ddC había recibido 7 meses con ddI, el motivo de este cambio fue el desarrollo de pancreatitis. Solo un paciente recibió monoterapia con AZT durante una año y otro ingresó a la terapia combinada sin haber recibido tratamiento antirretroviral previo. (Tabla 4).

De las madres de los pacientes con infección perinatal, ninguna de ellas recibió tratamiento antirretoviral o profiláctico durante su gestación.

Mutaciones encontradas al inicio de la terapia combinada.

Al inicio del estudio se detectaron mutaciones en el gen de la TR asociadas con resistencia a los análogos de nucleósidos en el 70% (7 / 10) de los pacientes (tabla 4). Las mutaciones asociadas con resistencia al AZT se hallaron en siete pacientes de nueve que recibieron este medicamento, las cuales presentaron la siguiente distribución: en el codon 215 en 6 pacientes, en el codon 70 en 3 pacientes y en el codon 41 en 1 paciente. Dos pacientes habían recibido terapia con ddC, solo en uno de ellos se halló una mutación asociada con resistencia al ddC (codon 69). Siete pacientes recibieron ddI y se encontró solo en uno de estos pacientes la mutación en el condon 74 la cual se halla asociada a resistencia a ddI. No se encontraron mutaciones en 3 de 10 pacientes, uno de ello no había recibido tratamiento previo (tabla 4). La prevalencia de mutaciones según el número de fármacos recibidos en un grupo de niños con infección por VIH-1 previo al inicio de la terapia combinada se presenta en la tabla 5.

Mutaciones al momento de la falla terapéutica.

La nueva determinación de la presencia de genotipos asociados con resistencia a los análogos de

nucleósidos (mutaciones), se realizó al momento de la falla terapéutica con la terapia combinada, la cual se presentó para el grupo en general por una Md de 8 meses (rangos 2 a 20) de haber sido iniciada esta. Para el grupo de pacientes con infección perinatal la falla terapéutica se presentó por una Md de 9 meses (rangos 6-20) y en el grupo de infección transfusional por una Md de 4 meses (rangos 2-10). Ver tabla 3.

Al momento de la falla terapéutica se hallaron mutaciones en el gen TR del VIH-1 en 7 pacientes.

La presencia de mutaciones asociada a resistencia a el AZT halladas en estos 7 pacientes presentaron la siguiente distribución: en los codones 215 y 70 en 4 pacientes y en el codon 41 en 2 pacientes. (Tabla 4).

Al momento de falla al tratamiento combinado se encontraron las siguientes variaciones en el patrón de mutaciones. De las asociadas a resistencia a AZT: supresión de la mutación 215 en dos pacientes y aparición de la mutación 70 en otros dos. No se encontró variación de las mutaciones asociadas a resistencia a ddI y ddC. (Tabla 4).

Se observó una tendencia al incremento en el número de mutaciones presentes en el gen de la TR, al comparar las mutaciones encontradas al inicio de la terapia combinada y al momento de la falla de esta terapia. (Tabla 6). La Tabla 7 muestra esta misma tendencia cuando la población es comparada según la forma de adquisición.

Al momento de la falla a la terapia combinada no se hallaron mutaciones en el gen TR del VIH-1 en tres pacientes. En dos de ellos, no se habían detectado mutaciones tanto al inicio como al momento de la falla a la terapia combinada. Otro paciente no presentó mutaciones en el gen TR del VIH-1 al inicio de la terapia combinada pero al momento de la falla de esta, se encontraron dos mutaciones (codones 41 y 70), las cuales se hallan asociadas a resistencia a AZT. Un paciente en quien se

habían encontrado mutaciones en el gen TR del VIH-1 al inicio de la terapia combinada, al momento de la falla no se logró detectar mutaciones. (Tabla 4).

En los pacientes en los cuales se adicionó al tratamiento previo únicamente el SQV tres conservaron sus mutaciones, en dos aumentaron y en uno disminuyeron. En dos pacientes en los que se adicionaron dos o tres medicamentos nuevos, entre los cuales se hallaba el SQV, no hubo variación de el número de mutaciones presentes por el método de LiPA. (Tabla 8).

DISCUSION.

La infección por el VIH-1 es un proceso dinámico de una población viral en constante replicación y progresivo deterioro del sistema inmune. A pesar de la diversidad de los fármacos antirretrovirales existentes y de las diversas combinaciones que se pueden lograr con ellos, no hay un régimen que suprima totalmente la replicación viral. Esta incompleta supresión de la replicación viral y la presencia de mutaciones, algunas de las cuales están relacionadas con la disminución de la susceptibilidad a los fármacos antirretrovirales favorecen la falla terapéutica [39].

En el presente estudio se evaluó la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a inhibidores nucleósidos de transcriptasa reversa en una muestra de niños con infección por el VIH-1 en tratamiento combinado. La presencia de estas mutaciones fue determinada por medio de la técnica de LiPA (MUREX-INMUNOGENTICS®), siendo esta prueba escogida por el grupo de investigadores en vista de la rapidez con la cual los resultados son obtenidos y su alta sensibilidad para detectar simultáneamente secuencias asociadas con resistencia para: AZT, ddI, ddC, d4T y 3TC [33,41,42,43,44].

La información de patrones de resistencia y resistencia cruzada a los agentes antirretrovirales ha ido en aumento, lo cual es importante conocer para la toma de decisiónes sobre cuál combinación de medicamentos debe emplearse para alcanzar un óptimo efecto antirretroviral [34,40].

Aunque la falla a la terapia es un fenómeno complejo, la resistencia viral es una de las principales causas de esta. Este parece ser el caso de nuestros pacientes analizados, en los cuales el 70 % (7/10 ptes) presentaban mutaciones en el gen de la TR asociadas a resistencia para los medicamentos que se encontraban recibiendo, fenómeno que se presenta incluso con los pacientes bajo terapia altamente efectiva (HAART), donde se ha reportado que afecta del 30 al 50% de los individuos que fallan a esta terapia [45].

En este estudio, las mutaciones encontradas en la población de virus presentes en los pacientes, correlacionaron con el o los medicamentos utilizados, este hecho está acorde con lo reportado en la literatura, donde los virus susceptibles declinan y aquellos virus que han mutado y que tienen una replicación menor que el virus nativo en ausencia del inhibidor, pueden llegar a ser la población de virus predominantes [39].

En el grupo de pacientes estudiados se encontró una baja frecuencia de mutación en el codon 70 y una mayor frecuencia de mutación en el codon 215, que induce resistencia a AZT. Este hallazgo está acorde con los diversos estudios en donde se ha descrito la mutación en el codon 70 como una mutante transitoria la cual es reemplazada por una población de virus mutantes más estables, los cuales presentan la mutación en el codon 215.

En nuestro grupo solo un paciente (pte 3) de siete que habían recibido ddI, se halló una mutación asociada a disminución de la resistencia al ddI. Esta baja frecuencia de mutaciones asociadas con la resistencia a ddI se esta acorde con lo descrito en la literatura mundial, donde la terapia de AZT con ddI previene la aparición de mutaciones en la TR asociadas con la resistencia a ddI, sin alterar la aparición de mutaciones típicas a AZT [18].

Se ha reportado que la mutación en el codón 69 produce una reducción de cinco veces la sensibilidad a ddC, sin causar resistencia cruzada al AZT o ddI y es la mutación más frecuentemente seleccionada por el ddC [16,26]. Esta se halló en uno de los dos pacientes que recibieron terapia con AZT más ddC previo a la adición del IP (pte 7 y 10).

Por otra parte es común que la adición de mutaciones lleve a un alto nivel de resistencia. A pesar de ello el paciente número tres quien presentó el mayor número de mutaciones asociadas (41, 70, 215, 74) previas al inicio del IP, fue el paciente que pudo mantenerse por más tiempo con terapia triple. Una explicación a este fenómeno puede ser la presencia de la mutación en el codon 74 la cual ha

sido asociada a reversión del efecto de la resistencia generada por la mutación en el codon 215 [15]. Además la adición del IP logró suprimir las cuasiespecies virales con mutaciones en los codones 215 y 41, las cuales están asociadas con resistencia al análogo de nucleósidos utilizados.

En el caso del paciente 7 en quien a pesar de haber logrado suprimir la mutación en el codon 215 y en los pacientes 2 y 5 en quienes no se encontraron mutaciones asociadas a resistencia por el método de LiPA, no es posible descartar la presencia de otras mutaciones asociadas a la falla terapéutica. Las explicaciones a este fénomeno puede ser falta de adherencia al tratamiento, ya que la ausencia de presión farmacológica causaría un predominio de virus salvajes, sin embargo la adherencia al tratamiento se documentó en todos los pacientes Otra posibilidad pudo ser debida a las limitaciones de la técnica de LiPA actualmente disponible, que no detecte todas las mutaciones que actualmente han sido descritas, entre las que destacan la mutación Q151, la cual puede aparece durante la terapia con AZT más ddI, como en los pacientes 1 y 5, quienes la recibieron desde su diagnóstico.

La aparición de esta mutación, Q151, es seguida por el desarrollo de cuatro mutaciones adicionales en los aminoácidos 77, 116, 62 y 75, que resultan en un virus que es 320 veces resistente a AZT y a todos los análogos de nucleósidos. Los virus que presentan estas variantes no poseen las mutaciones típicas asociadas con la resistencia a AZT, sugiriendo que la presencia de las primeras en una población viral puede predisponer a la resistencia a múltiples análogos de nucleósidos más que al desarrollo de resistencia exclusiva a AZT. Esto sugiriere que existen dos vías mutuamente excluyentes para el desarrollo de resistencia a los diversos inhibidores de TR. [48 49]

Adicionalmente, la técnica utilizada no detecta mutaciones para los inhibidores de proteasas, las cuales pudieron haberse desarrollado durante el tiempo que duró la terapia combinada.

Causas como interacciones medicamentosas también han sido asociadas a falla terapéutica. Algunos

fármacos antifímicos como isoniacida, rifampicina se han encontrado asociados a disminución en los niveles de inhibidores de proteasas, con la consecuente falla al tratamiento. Sin embargo estas interaciones no se presentaron en la mayoría de nuestro pacientes, excepto en uno de ellos, que reicibió tratamiento con tres drogas antifímicas, pero en quien se incrementó la dosis de saquinavir.

Otras causas como defectos en la absorción de las drogras e inadecuada activación de los medicametos como la presencia de alteración en la fosforilación, la cual es importante para transformar a los análogos de nucleósidos en su forma activa, no fueron investigadas.

La repuesta virológica con el tratamiento triple fue leve, transitoria y sin mejoría del recuento de los CD4+. Una posible razón para la pobre respuesta pudo ser debida a la baja biodisponibilidad cercana al 4% de SQV en la presentación utilizada (cápsulas de gel duro-Invirase®) debido a su pobre absorción y al importante metabolismo hepático de esta presentación [38,50] Otra posible explicación de la pobre respuesta virológica es la presencia de mutaciones en el genoma TR del VIH-1 que confieren resistencia a los análogos de nucleósidos que siguieron siendo utilizados. Adicionalmente las mutaciones más comunes fueron encontradas en nuestros pacientes en los codones 70 y 215, las cuales se han visto asociadas con una pobre respuesta al tratamiento, independientemente de la terapia de salvamento [40]. El 70% (7/10) de los pacientes presentaron mutaciones asociadas a resistencia a los inhibidores de la TR, previos a la adición de el IP, a su vez este antirretroviral no logró inhibir todas las cuasiespecies mutantes presentes al momento del diagnóstico de falla a la terapia combinada.

Los pacientes con infección perinatal contaban con un menor tiempo de tratamiento previo al inicio de la terapia combinada con una Md 10 meses, comparado con una Md de 40 meses de los pacientes con infección transfusional. Al realizar el análisis se observó la tendencia de que los pacientes con menor tiempo de tratamiento presentaron un menor número de mutaciones y adicionalmente fueron los pacientes que más tiempo se pudieron mantener con el tratamiento combinado (Md 9 meses).

Este hallazgo apoya lo reportado en la literatura, donde la monoterapia o la terapia secuencial con inhibición parcial de la replicación viral facilita la aparición de mutaciones y la acumulación de las mismas, llevando a la falla terapéutica.

Por otra parte algunos factores que pueden estar relacionados con un alto porcentaje de adherencia en nuestro grupo de pacientes son: contacto frecuente de los tratantes con la familia de los pacientes infectados por VIH, la conscientización de la importancia de seguir las indicaciones terapéuticas que se realizaba en cada consulta y el desarrollo de vínculos afectivos entre los padres o tutores del paciente, además de la disponibilidad de los fármacos gracias al sistema de seguridad social al cual se hallan asociados. Este porcentaje de adherencia supera al reportado en la literatura en adultos, donde la adherencia solo ha llegado al 58% de los pacientes con mono o doble terapia, en que la adherencia es un factor fundamental y se ha estimado que se requiere al menos de un 75% de esta para obtener el control de la replicación viral [65].

Nuestros resultados parecen apoyar los estudios realizados tanto "in vivo" como "in vitro", donde la continuación de la terapia con medicamentos antirretrovirales para los cuales el paciente presenta mutaciones que confieren resistencia, y a los cuales se les añade un nuevo medicamento (terapia secuencial), la respuesta será pobre y de corta duración. Por esto los esquemas de salvamento deben incluir el inicio simultáneo de al menos dos medicamentos, los cuales no tengan resistencia cruzada con los medicamentos que venía recibiendo el paciente.

Las pruebas de resistencia que brindan una rápida y confiable información acerca de una población viral, orientarán al clínico sobre cuáles medicamentos antirretrovirales deben ser evitados, en los esquema de salvamento.

CONCLUSIONES.

- Las mutaciones en el gen de la RT del VIH-1 en un grupo de niños con falla a la terapia combinada secuencial se encontraron en los codones 215, 41, 70, 74 y 69 las cuales han sido descritas en pacientes adultos con falla a la terapia antirretroviral.

- La presencia de mutaciones asociadas a resistencia a inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleosidos correlacionó con el o los fármacos recibidos.
- Las mutaciones más frecuentemente encontradas estan asociadas con la resistencia a AZT, el [illegible]

- La técnica de LiPA fue capaz de detectar mutaciones capaces de conferir resistencia a fármacos antirretrovirales en el 70% de los pacientes con falla terapéutica.

- Se requiere el desarrollo de nuevos métodos genotípicos que tengan la capacidad de detectar todas las mutantes asociadas a los diferentes fármacos antirretrovirales hasta ahora conocidos

Tabla 1. Características generales de los pacientes pediátricos infectados por VIH-1, con sus respectivas cargas virales y recuentos de linfocitos CD4+ al inicio de la terapia triple (AZT, ddI y SQV) (I), en el nadir de la carga viral durante ese tratamiento (N), y al momento de presentar la falla terapéutica (F).

Pte	Sexo	Transmisiòn	Edad años	[a]Ctg CDC	[b]Carga viral (log_{10})			CD4+ (cél/ul)		Criterio modif
					I	N	F	I	F	terapia
1	F	Perinatal	1.8	A2	5.79	3.48	5.05	532	790	Viral
2	F	Perinatal	2.8	B2	4.50	3.93	4.7	769	527	Viral
3	F	Perinatal	6.5	B2	5.60	4.53	5.05	227	122	Viral
4	M	Perinatal	2.2	B3	5.96	3.70	4.19	260	198	Viral
5	M	Perinatal	1.4	C3	6.80	4.97	4.7	139	359	Viral
6	M	Transfusional	11.3	A3	4.14	NSR	4.68	54	54	Viral
7	M	Transfusional	16.0	A3	4.30	NSR	5.8	3	1	Viral
8	F	Transfusional	10.4	B2	6.60	NSR	6.3	300	451	Clínico
9	M	Transfusional	16.8	C3	4.42	BLD	4.7	0	86	Viral
10	M	Transfusional	14.9	C3	5.04	4.08	5.55	13	12	Viral

F: Femenino.
M: Masculino
Pte: Paciente.
NSR: No se realizó.
BLD: Bajo límite de detección.
[a]**Ctg CDC**: Categoría clínica-inmunológica definidas por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas (CDC Atlanta).
[b]**Carga viral log_{10}**: log_{10} copias de RNA del VIH-1 en plasma / ml .
CD4+ (cél/ul): Recuento de linfocitos CD4+ cél/ml mediante citometría de flujo.
Criterio modif terapia: Criterio de falla terapéutica basado en el consenso del grupo de infectólogos pediatras del CMN Siglo XXI.

Tabla 2. Características inmunológicas, carga viral y tiempo de tratamiento administrado previo ainicio de la terapia combinada en 10 pacientes, según la vía de adquisición de infección.

	Perinatal	Transfusional
Edad en años Md	2.2 (1.4- 6.5)	14.9 (10.4-16.8)
CV Log $_{10}$ MG	5.68 (4.5 - 6.8)	4.83 (4.14 -6.6)
CD 4+cél/ul Md	260 (139 - 769)	13 (0 -300)
Número de ptes por estadificación	A2-(1); B2-(2); B3-(1); C3-(1)	A3-(2); B2-(1); C3-(2)
Meses de tratamiento previo Md	10 (0-55)	40 (4 -70)

CV MG: Media geométrica (MG) de $\log_{10}$ copias de RNA del VIH-1 en plasma / ml.

Número de ptes por estadificación: Número de pacientes por estadificación basados en Categoría clínica-inmunológica definidas por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas (CDC Atlanta).

Meses de tratamiento previo Md: Hace referencia a la Md de tiempo en meses que recibió el paciente tratamiento antirretroviral antes del inicio de la terapia combinada.

Table 3. Características inmunológicas, carga viral y tiempo de tratamiento con terapia combinada en 10 pacientes al momento de falla, según la vía de adquisición de la infección.

	Perinatal	Transfusional
CV log $_{10}$ MG	4.73 (4.19 - 5.05)	5.37 (4.7- 6.3)
CD4+ cél/ul Md	359 (122 - 790)	54 (1- 451)
Meses de Tx combinado Md	9 (6 -20)	4 (2 -10)

CV log $_{10}$ MG: Media geométrica (MG) $\log_{10}$ de copias de RNA del VIH-1 en plasma/ml.

CD4+ cél/ul Md: Mediana (Md) del recuento de linfocitos CD4+ cél/ul .

Meses de Tx combinado Md. La Md de tiempo en meses que duro con tratamiento combinado hasta el momento de falla a esta.

Tabla 4. Tratamiento previo al inicio de la terapia combinada (AZT, ddI y SQV), mutaciones presentes al inicio de ésta (I) y al momento de la falla terapéutica (F), en un grupo de niños infectados con VIH-1.

Pte	Tratamiento previo (meses)	Mutación	Tiempo Tx	Mutación
		I	combinado	F
1	AZT(10m); ddI(10m)	No se detectaron	9m	L41;R70
2	AZT(10m); ddI(10m)	No se detectaron	9m.	No se detectaron
3	AZT(55m);ddI(36m);SQV(2m)	L41; R70; Y215; V74	20m	R70; V74
4	AZT(10m); ddI(10m)	Y215	6m	Y215
5	Ninguno	No se detectaron	11m	No se detectaron
6	AZT(70m); ddI(8m); SQV(3M)	F215	4m	F215;R70
7	AZT(65m); ddC(19m)	Y215	4m	No se detectaron
8	AZT(12m)	F215	2m	F215
9	AZT(4m); ddI(4m)	R70; Y215	10m	R70; Y215; L41
10	AZT(40m); ddI(7m); ddC(7m)*	R70; N69	7m	R70; N69

Pte: Paciente.

Tiempo Tx combinado: Se refiere al tiempo que duró con tratamiento combinado antes de presentarse la falla terapéutica.

Terapia previa (meses): Se refiere a los medicamentos que el paciente había recibido previo al ingreso al estudio y los meses que recibió el medicamento.

*El paciente recibió ddI durante 7 meses, se debió suspender este medicamento por el desarrollo de pancreatitis medicamentosa y se realizó el cambio a ddC.

Tabla 5. Prevalencia de mutaciones según el número de fármacos recibidos en un grupo de niños con infección por VIH-1 previo al inicio de la terapia combinada.

Tratamiento previo	No se detectaron mutaciones	Una mutación	Dos Mutaciones	Más de dos mutaciones
Ninguno	1	----	----	----
Monoterapia	----	1	----	----
Terapia doble	2	1	1	----
Terapia aditiva	----	2	1	1

Ninguno: No recibió tratamiento antirretrovial antes del inicio de la terapia combinada.
Monoterapia: Solo recibió tratamiento con AZT antes el inicio de la terapia combinada.
Terapia doble: Recibió desde el inicio terapia con AZT y ddI antes de la terapia combinada.
Terapia aditiva: Recibió al inicio monoterapia con AZT y posteriormente se adicionó ddI ó ddC previo a la terapia combinada.

Tabla 6. Prevalencia de mutaciones por paciente, al inicio de la terapia combinada y al momento de la falla de esta, en un grupo de niños con infección por VIH-1.

Número de mutaciones	Al ingreso a terapia combinada (número de ptes)	Al momento de la falla a la terapia combinada (número de ptes)
No se detectaron	3	3
Una	4	2
Dos	2	4
Más de dos	1	1

No se detectaron: No se hallaron mutaciones en el genoma de la TR del VIH-1.
Una: Se detectó solo una mutación en el genoma de la TR del VIH-1.
Dos: Se encontraron dos mutaciones en el genoma de la TR del VIH-1.
Más de dos: La presencia de dos o más mutaciones en el genoma de la TR del VIH-1.

Tabla 7. Número de pacientes por frecuencia de mutaciones inductoras de resistencia, al ingreso al estudio y al momento de la falla según el modo de transmisión.

Número de mutaciones	Perinatal ingreso(número de ptes)	Transfusional ingreso(número de ptes)	Perinatal Falla(número de ptes)	Transfusional falla(número de ptes)
No se detectaron	3	----	2	1
Una	1	3	1	1
Dos	----	2	1	2
Más de dos	1	----	1	1

No se detectaron: No se hallaron mutaciones en el genoma de la TR del VIH-1.
Una: Se detectó solo una mutación en el genoma de la TR del VIH-1.
Dos: Se encontraron dos mutaciones en el genoma de la TR del VIH-1.
Más de dos: La presencia de dos o más mutaciones en el genoma de la TR del VIH-1.

Tabla 8. Número de pacientes por frecuencia de mutaciones inductoras de resistencia, al momento de la falla terapéutica según los medicamentos que adicionó la terapia combinada

Medicamentos que adicionó la terapia combinada	No se detectaron mutaciones	Una Mutación	Dos Mutaciones	Más de dos mutaciones
2 AN + 1 IP	1	----	----	----
1 AN + 1 IP	----	1	----	----
Continuación de la Terapia doble + 1IP	1	1	1	1
Continuación de la terapia aditiva + 1IP	1	----	3	----

2AN + 1IP: Dos análogos de nucleósidos (AZT + ddI) junto al inhibidor de proteasas (SQV) cápsulas de gel duro.
1AN + 1IP: Un análogo de nucleósido (ddI) más el inhibidor de proteasas (SQV)cápsulas de gel duro
Continuación de la terapia doble + 1IP: Recibió desde el inicio terapia con AZT y ddI a la cual la terapia combinada solo agregó SQV cápsulas de gel duro.
Continuación de la terapia aditiva + 1IP: Recibió al inicio monoterapia con AZT y posteriormente se adicionó ddI ó ddC, a este tratamiento la terapia combinada únicamente agregó SQV en cápsulas de gel duro.

BIBLIOGRAFIA:

1 Perlson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clerance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science 1996;271:1582-1586.

2 Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT. et all. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection. JAMA 1998;279:1984-1991.

3 Perelson AS, Essunger P, Ho DD, Dynamics of HIV-1 and CD4 lymphocytos in vivo. AIDS 1997;11(suppl A):517-524.

4 Graeme J M. Current knowledge of HIV reverse transcriptase mutations selected during nucleoside analogue therapy: the potencial to use resistance data to guide clinical decisions. J.Antimicrobial chemoterapy 1997;40:765-777.

5 Mayers DL. Drug resistant HIV-1 the virus strikes back. JAMA 1998;279:2000-2002.

6 Ruy MR, Sebastian B and Martin AN. The frequency of resistant mutant virus berofe antiviral terapy. AIDS 1998;12:461-465.

7 Najera I, Holquin A QM, Muñoz Fernandez MA, Najera R, Lopez Galindez C. et al Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus:mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. J Virol 1995;69:23-31.

8 Numberg JH, Schleif WA, Boots EJ, et al. Viral resistance to human immunodeficiency virus type 1-specific pyridinone reverse transcriptase inhibitors. J Virol 1991;65:4887-4892.

9 Richman DD, Havlir D, Corbeil J et al Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. J Virol 1994;68:1660-1666.

10 Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R, et al. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearence of drug-resistant dine (3TC) J Infect Dis 1995;171:1411-1419.

11 Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Cristal structure al 3.5A resolution of HIV-1 reverse transcriptasa complexed with an inhibitor. Science 1992; 256:1783-1790.

12 Zhang D C, Caliendo AM Eron JJ, et all. Resistance a 2',3'dideoxycytidine conferred by a mutation in codon 65 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 282-287.

13 Boucher CA, O'Sulivan E, Mulder JW, Ramautarsing C, Kellam P, Darby G. et al. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. J Infect Dis 1992; 165:105-110.

14 Larder BA, Kellam P & Kemp SD. Zidovudine resistence predicted by direct detection of mutatns in DNA fron HIV-infected lymphoctes. AIDS 1991;5:137-144.

15 St Clair MH, Martin JL, Tudor-Williams G, Bach MC, Vavro CL, King DM et al. Resistance to ddI and senstivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. Science 1991;253:1557-1559.

16 Fitzgibbon JE, Howell RM, Haberzettl CA, Sperber SJ, Gocke DJ & Dubin DT. Human immunodeficiency virus type 1 pol gene mutations which cause decreased susceptibility to 2',3'-dideoxy-3'-thiacydine. Antimicrob Agents Chemotherapy 1992;36:153-7.

17 Fitzgibbon JE, Farnham AE, Sperber SJ, Kim H & Dubin DT. Human immunodeficiency virus type 1 *pol* gene mutations in an AIDS patient treated with multiple antiretroviral drugs. J Virol 1993;67:7271-7275.

18 Shafer RW, Iversen AKN, Winters MA, Aquiniga E, Katzenstein DA & Meringa TC. Drug resistance and heterogeneous long term virologic resposes of humnan immnodeficency virus type 1 infected susjects to zidovudine and didanosine combination therapy. J Infect Dis 1995;172:70-78.

19 Shafer RW, Kozal MJ, Winters MA ,Iversen AKN, Katzenstein DA, Ragni MV et al . Combination therapy with zidovudine and didanosine selects for drug resistant human immunodeficiency viurs type 1 strains with unique patterns of *pol* gene mutations. J Infect Dis 1995;169:722-729

20 Gao Q, Gu ZX, Parniak MA, Cameron J, Cammack N, Boucher C, et al . The same mutaion that encondes low level human immunodeficency virus type 1 resistance to 2',3' dideoxyinosine and 2',3'dideoxycytidien confers high level resistance to the enantiomer of 2'3'dedoxy3'thiacytidine Antimicrob Agents Chemotherapy 1993;37:1390-1392.

21 Shafer RW, Winters MA ,Iversen AKN & Meringa TC. Genotypic and phenotypic changes during culture of a multinuceosides resitant human immunodeficiency rirus type 1 strain in the presence

and absence of additional reverse transcriptase inhibitors. Antimicrob Agents Chemotherapy 1996;40:2887-2890.

22 Schmit JD, Cogniaux J, Hermans P, Van Vaeck C, Sprecher S, Van Remoortel B et al. Multiple drug resistance to nucleoside analogues and nonnucleoside reverse transcriptasa ihibitors in an efficiently replicating human immunodefiency virus type 1 patient 1 strain. J Infect Dis 1996;174:962-968.

23 DeJong MD, Loewenthl M, Boucher CAB, et al. Alternating nevirapine and zidovudine treatment of human immunodeficency virus type 1 infected persons does not prolong nevirapine activity. J Infect Dis 1994; 169: 1346-1350.

24 Havlir D, Cheeseman SH, Daughlin M, et al. High dose nevirapine: Safety, pharmacokinetics and antiviral effect in patients wwith humena immunodeficency virus infection. J Infect Dis 1995;171:537-545.

25 Holodnly M, Katzenstein D, Mole L, Winter M and Merigan T. Human immunodeficency virus reverse transcriptase codon 215 mutations diminish virologic response to didanosine zidovudiene therapy in subjects with non syncytium inducing viral phentype. J Infect Dis 1996; 174, 854-857.

26 Sylvester S, Caliendo A, An D, Savara A, Byingto R, Strick D, et al. HIV-1 resistance mutations and plasma RNA during ZDV and ddC combination therapy. In Proceedings of the 4th international HIV Drug resistance Workshop, Sardinia 1995. Abstract 47.

27 Vella S and Floridia M. HIV resistence to antiviral drugs. International AIDS Society.1996; 4:3 Sept.

28 Eastman PE, Boyer E, Mole L, Kolberg J, Urdea M and Holodniy M. Nonisotopic hybridization assay for determination of relative amounts of genotypic human immunodeficency virus type 1 zidovudine resistance. J Clin Microbiol 1995;33:2777-2780.

29 Frenkel L M, Wagner II LE, Atwood SM, Cummins TJ and Dewhurst S. Specific, senstive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine. J Clin Microbiol 1995;33:342-347.

30 Kaye S, Loveday C and Tedder RS. A microtitre format point mutation assay: application to the detection of drug resistance in human immunodeficiency virus tipe 1-infected patients treated with

zidovudine. J. Med Virol 1992;37:241-246.

31 Larder BA, Kellam P and Kemp SD. Zidovudine resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from HIV infected lymphocytes. AIDS 1991;5:137-144.

32 Richman DD, Guatelli JC, Grimes J, Tsiatis A and Gingeras T. Detection of mutations asoccited with zidovudiemn resistance in human immnodicincy virus by use of the polymerase chain reaction. J Infect Dis 1991;164: 1075-1081.

33 Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scacrez T, Verhofstede C. et al. Line probe assay for rapid detection of drug selected mutations in the human immunodificency virus tipe 1 reverse transcriptase gene. Antimicrob Agents Chemotherapy 1997;41: 284-291.

34 Stephenson J.. HIV drug resistance testing show promise. JAMA 1999; 281:309-310.

35 Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, et al: A pilot study of the short term effects of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral therapy . Presentance at the 6th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, Chicago, I11, January 31 february 4, 1999. Abstract LB8.

36 Lacey SF and Lander BA. Novel mutation (V75T) in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to 2'3' didehydro 2'3 dideoxythymidin in cell culture. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1428-1432.

37 Gu Z, Gao Q, Fang H, et al. Identification of novel mutations that confert drug resistance in the human immunodeficency virus polymerase gene leukemia 1994;8 (suppl 1): 5166-5169.

38 Sáez-Llorens X and Ramilo Octavio. Early experience with proteasa inhibitors in human immunodeficiency virus infected children. Pediatr Infect Dis J 1998; 17:728-738.

39 Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy.Science 1995; 267: 483-489.

40 Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, et al. Drug resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. Lancet 1999; 353: 2195-2199.

41 Fontaine E, Lamber C, Nivone D, et all. Fast genotypic detection of drug resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene of treatment naive patients. J Human Virol 1998; 1:451-456.

42 Schneider F, Plesseria JM, Stuyver L, et al. LiPA HIV-1 RT predicts phenotypic zidovudine resistance in HIV-1 patient isolates. 5Th Conf retrovir oppor infect: 1998 142(abstract no.333)

43 Evans C, Parker D, Sheridan F, et all. Novel clinical applications of the LiPA HIV-1 RT mutation detections assay. Int Conf AIDS 1998; 12: 786-787 (abstract no 41223).

44 Rayner MM, Meek J, Bidwell R. Line probe assay compared with clonal and population based sequencing for detection of resistance mutations in HIV-1 RT. Int Conf AIDS 1998; 12: 786 (abstract no. 41219).

45 Perrin L and Telenti A. HIV treatment failure: testing for HIV resistance in clinical practice. Science 1998 ;280:1871-1873.

46 Arion D, Kaushik N, Mc Cormick S. et al. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3' deoxithymidina (zidovudine). Antiviral therapy 1998;3(suppl 1):13 (Abstract 14).

47 Mayers DL. Japour AJ, Arduino JM, et al. Dideoxynucleoside resistance emerges with prologed zidovudine therapy. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:307-314.

48 Iverson AKN, Shafer RW, Wehrly K, et al. Multidrug resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antirretroviral therapy. J Virol 1996;70.1086-1090.

49 Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, et al. Multidrug resistant human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:2398-2402.

50 Kitchen VS, Skinner C, Ariyoshi K, et al. Safety and activity of saquinavir in HIV infection. Lancet 1995; 45:952-955.

51 Deeks SG, Parkin N, Petropoulos CJ, et al. Correlation of baseline phenotypic drug susceptibility with 16 week virologic response in a pilot combination therapy in HIV-infected patients who failed indinavir therapy. Antiviral therapy 1998;3(suppl 1):36.

52 Patick A, Zhang M, Hertogs K, et al. Correlation of virological response with genotype and phenotype of plasma HIV-1 variants in patients treated with nelfinavir in the US expanded acces program. Antiviral therapy 1998;3(suppl 1):39.

53 Harrigan PR, Montaner JS, Hogg RS, et al. Baseline resistance profile predicts response to

ritonavir/saquinavir therapy in a community setting. Antiviral therapy 1998;3(suppl 1):38.

54 Falloon J. Time to genotype for selection of antiretrivural regimens in previously treated patients? Lancet 1999; 353:2173-2174.

55 Watson DC and Farley JJ. Efficacy of and adherence to highly active antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus type 1. Pediatr Infect Dis J 1999;18:682-689.

ANEXO 1

NOMBRE CEDULA
EDAD
ORIGEN PROCEDENICIA

FECHA DEL DIAGNOSTICO

PESO (PERCENTIL)

FORMA DE TRANSMISION PERINATAL SI NO TRANSFUSION SI NO
SEXUAL SI NO INDETERMINADA SI NO

RECIBIO PREVIAMENTE MEDICACION ANTIRRETROVIRAL: SI NO

MEDICAMENTOS USADO DOSIS TIEMPO

ESTADIO

CARGA VIRAL AL INICIO DEL TRATAMIENTO (FECHA)

CONTEO DE CD4 INICIO DEL TRATAMIENTO (FECHA)

MEDICAMENTOS INICIADOS DOSIS

INDICACION DE CAMBIO DE TRATAMIENTO (FECHA)

RECUENTO DE CD4

CARGA VIRAL (LOGARITMO EN BASE 10)

PROGRECION CLINICA DE LA ENFERMEDAD SI NO

NUEVO ESQUEMA DE TRATAMIENTO (FECHA).

MEDICAMENTOS EMPLEADOS DOSIS

MEDICAMENTOS CONCOMITANTES UTILIZADOS .