

RESULTATS OBJECTIU 1.

Amb la finalitat de contestar el primer objectiu de la tesi basat en l'estudi de la dinàmica viral en el rebrot com a conseqüència de les IET, es van estudiar, en les tres cohorts de pacients comentades en detall a l'apartat de material i mètodes, les característiques basals, la càrrega vírica (CV) en plasma, el comptatge de cèl.lules T CD4, el temps de duplicació i les respostes cel.lulars T limfoproliferativa i CD8 citotòxica anti-VIH-1 en les diferents interrupcions del tractament.

1. RESULTATS DE LA COHORT DE PACIENTS SOTMESOS A IET (Cohort 1)

S'han estudiat 10 pacients amb infecció crònica pel VIH-1 amb xifres basals de CD4 $>500 \times 10^6$ cèl.lules/l (com a mínim en dues determinacions separades per un període d'1 a 3 mesos) i una càrrega vírica estable > 5000 còpies/ml (com a mínim en dues determinacions separades per un període d'1 a 3 mesos). La mitja d'edat dels 10 pacients va ser de 36 ± 3 anys i 7 eren homes. Els factors de risc d'infecció per VIH-1 van ser 1 drogo-dependent, 5 homosexuals i 4 de transmissió heterosexual. Tots els pacients havien estat infectats entre els 20 i els 80 mesos abans d'iniciar el tractament antirretroviral i cap dels pacients va presentar una primoinfecció simptomàtica. Tres pacients (30%) van presentar una coinfecció pel virus de la hepatitis C (HCV). En quatre dels deu pacients (40%) es va detectar la mutació $\Delta 32$ del gen CCR5 en un dels al.lèles. Les característiques del moment basal previ a l'inici del tractament (dia -365) i aquelles prèvies a la primera interrupció del tractament (dia 0) es detallen a la taula 2. Transcorregut un any amb teràpia triple (dia 0) la càrrega vírica (CV) va ser inferior a les 20 còpies/ml en tots els pacients (< 5 còpies/ml en 5 dels 10 pacients), la CV en líquid cefalorraquidi va ser < 20 còpies/ml en tots els pacients, i la CV en teixit limfàtic va ser < 40 còpies/mg de teixit en 6 pacients i de 485 còpies /mg de teixit en 1 pacient (dels 7 pacients dels que es va poder obtenir biòpsia del teixit amigdal·lar). En 4 pacients, el quocient de

cèl.lules CD4/CD8 va ser superior a 1 en el dia 0. El pacient 156 es va perdre després de la primera interrupció. Com a grup control es van seleccionar 20 pacients naïve amb uns valors de CD4 i càrrega vírica similars i que no van rebre cap tractament antirretroviral l'any de l'estudi.

Taula 2. Característiques basals, canvis en la CV i cèl.lules T CD4 durant les tres IET

Pacients	4	107	226	72	169	170	211	12	157	156
Sexe	M	M	F	F	M	M	M	M	F	M
Edat (anys)	32	27	25	30	52	47	36	32	35	30
Factor de Risc	HMS	HMS	HET	HET	HMS	HET	ADVP	HMS	HET	HMS
Característiques basals (prèvies TARGA, setmana -52)										
Cèl.lules T CD4 (x 10 ⁶ /l)	946	500	525	629	551	520	540	658	531	739
Cèl.lules T CD8	1769	1225	482	710	911	2380	1480	852	714	1346
Carga vírica (còpies/ml)	63000	20431	5123	27231	21231	504264	109032	27502	14102	185885
Log ₁₀ CV	4.8	4.3	3.8	4.5	4.3	5.7	5.0	4.44	4.15	5.27
Característiques inici IET (dia 0)										
Cèl.lules T CD4 (x 10 ⁶ /l)	1632	535	1256	856	871	505	892	820	826	1150
Cèl.lules T CD8	1938	1234	1756	722	845	1382	1595	703	727	1972
Quocient CD4/CD8	0.84	0.43	0.71	1.18	1.03	0.35	0.58	1.17	1.15	0.58
Càrrega vírica (còpies/ml)	<5	<5	<5	<5	<5	10	10	<5	<5	19
CV teixit limfàtic (còpies/mg teixit)	<40	<40	<40	NR	<40	485	<40	<40	NR	NR
CV LCR (còpies/mg)	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Genotip CCR5	WT	Δ32	WT	Δ32	Δ32	WT	WT	WT	WT	Δ32
Temps duplicació (dies)^a										
STOP 1	1.7	3.5	3.8	2.5	1.5	1.4	1.8	1.0	2.1	NR
STOP 2	2.1	3.0	8.7	8.7	1.8	1.8	2.2	1.5	1.7	NR
STOP 3	2.4	3.8	3.8	3.2	5.8	1.9	6.5	4.3	2.5	NR
Característiques als 12 mesos sense tractament després del STOP 3										
Carga vírica (còpies/ml)	3500	3620	289	3150	9000	99000	24960	25118	144543	NR
Log ₁₀ CV ^b	3.5	3.5	2.5	3.5	3.9	5.0	4.4	4.40	5.16	NR
CV - CV basal	-1.3	-0.8	-1.3	-1.0	-0.4	-0.7	-0.6	-0.04	1.01	NR
Cèl.lules T CD4 (x 10 ⁶ /l) - valor basal	1319	625	625	731	854	594	513	851	678	NR
Cèl.lules T CD4 (x 10 ⁶ /l) - valor basal (x 10 ⁶ /l)	373	125	143	21	-57	74	-27	193	-36	NR

^aCàlcul del temps de duplicació descrit previament (Ho i col., 1995). Veure metodologia.

^bDarrera determinació disponible de CV (pacient 170 i 226 al mes 6, la resta de pacients al mes 12), NR (no disponibilitat de resultats).

1.1. Dinàmica del rebrot de la càrrega vírica (CV)

El rebrot de la CV es va detectar en tots els pacients en cadascuna de les IET. El temps de duplicació en la primera interrupció del tractament va ser de 2.01 (DS 0.29) dies (Taula 2). No es va observar un temps de duplicació més llarg en els pacients que presentaven la CV <5 còpies/ml en el dia 0 respecte d'aquells que presentaven la CV entre les 5-20 còpies/ml [temps de duplicació 2.11 (DS 0.43) dies i 1.88 (DS 0.31) dies, respectivament]. En canvi, els pacients amb la mutació $\Delta 32$ en el gen CCR5 (4 pacients) van presentar un temps de duplicació major que aquells (4 pacients) que no presentaven aquesta mutació. A més a més, es van observar atenuacions quantitatives en la dinàmica viral del rebrot que van ser més pronunciades a la tercera interrupció del tractament en la majoria dels pacients (Taula 2, Fig 15). En 4 pacients, la CV del rebrot va superar en $>0.5 \log$ la CV basal després de la primera i segona interrupció del tractament (pacients 12, 157, 169 i 170). En canvi, després de la tercera interrupció, únicament el pacient 157 va presentar la CV del rebrot superior a la basal. En aquest pacient, el rebrot de la CV de la segona IET va anar acompanyada de símptomes assemblats als d'una primoinfecció incloent un increment en el tamany dels ganglis limfàtics, rash cutani i febre. La simptomatologia va desaparèixer després de la reintroducció del mateix tractament aconseguint una disminució de la CV per sota els nivells de detectabilitat. En els 5 pacients restants (pacients 4, 72, 107, 211 i 226) l'increment de la CV en el rebrot després de la primera, segona i tercera IET va ser similar o inferior al valor de la CV basal (Figura 15).

Cal remarcar, que durant la segona interrupció en quatre dels nou pacients (4, 72, 107 i 226) la CV va disminuir espontàniament i es va mantenir per sota del valor basal en absència de TARGA (diferència entre el valor més baix de CV durant la segona interrupció i el basal, -1.10, -2.05, -0.81 i -2.07 \log_{10} , respectivament) (Figura 15). De la mateixa manera, després de la tercera interrupció, la CV va disminuir amb valors inferiors al basal en 6 dels 9

pacients. A la tercera IET, els pacients 4, 72, 107, 170, 211 i 226 presentaven una diferència entre el valor d'estabilització de la CV [definit com la mitja dels dos darrers valors de la CV separats un mínim d'un mes després d'una mitjana de 52 setmanes sense tractament (interval, 24-62 setmanes)] i de la CV basal de -1.3 , -1.0 , -0.8 , -0.7 , -0.6 , $1.3 \log_{10}$, respectivament. A més a més, 4 d'aquests 6 pacients van mantenir uns valors de CV <5000 còpies/ml després d'una mitja de 52 setmanes sense tractament (Figura 15). Dels 20 pacients del grup control amb infecció crònica pel VIH-1 i sense tractament, la CV va continuar estable o va incrementar durant l'any de seguiment (Fig 16). No es va observar una disminució mantinguda de la CV en el grup de pacients no tractats.

1.2. Resposta immuno específica anti-VIH-1

Es van estudiar les respostes cel.lulars T, CD4 proliferativa i CD8 citotòxica, específiques anti-VIH-1 per determinar si existia alguna relació amb la disminució espontània de la CV observada durant el període d'interrupció del tractament (Figura 17). En la primera interrupció no es va observar en cap dels pacients una resposta cel.lular T CD4 limfoproliferativa ni CD8 citotòxica. Després de la segona interrupció, 4 dels 9 pacients (pacients 4, 72, 107 i 226) van presentar una resposta cel.lular T CD4 limfoproliferativa contra l'antigen p24 del VIH-1 però no van presentar cap resposta contra els antigens de l'envolta, Env. A més a més, 5 dels 9 pacients (els mateixos citats anteriorment, 4, 72, 107 i 226, més el pacient 211) van presentar una resposta cel.lular T CD8 anti-VIH-1 de moderada a forta a la segona interrupció (Figura 17). Després de tres mesos d'haver-se reiniciat el tractament antirretroviral tots els pacients van perdre la resposta limfoproliferativa específica anti-VIH-1 a excepció del pacient 226. Després de la tercera interrupció del tractament, 8 dels 9 pacients (pacients 4, 12, 72, 107, 169, 170, 211 i 226), van desenvolupar una dèbil resposta cel.lular T CD4 proliferativa (Figura 17) que va ser significativament superior a l'observada durant la primera interrupció (t-test de Wilcoxon de dades aparellades, $p=0.078$). Respecte a la resposta cel.lular T

CD8 citotòxica específica anti-VIH-1, es va observar un increment de moderat a fort en 7 dels 8 pacients estudiats després de la tercera interrupció (pacients 4, 12, 72, 107, 169, 170, 211; en el pacient 226 no es va mesurar) (Figura 17). Aquesta resposta cel.lular T CD8 citotòxica específica anti-VIH-1 es va mantenir durant els períodes de no tractament en aquells pacients que presentaven una disminució espontània de la CV. D'altra banda, la resposta cel.lular T CD4 proliferativa anti-p24 del VIH-1 va ser intermitentment positiva en aquests pacients (Figura 17). Cap dels 20 pacients no tractats del grup control van presentar resposta cel.lular T CD4 proliferativa anti-VIH-1 durant l'any de seguiment. Unicament 1 dels 7 pacients als que se'ls hi va mesurar la resposta cel.lular T CD8 citotòxica específica anti-VIH-1 del grup control, va presentar una resposta moderada.

1.3. Relació entre els canvis de la dinàmica de la CV i els canvis en les respostes cel.lulars immuno específiques anti-VIH-1 durant els 3 cicles d'IET

Es va detectar una atenuació quantitativament significativa de la CV al llarg dels diferents rebrots. El temps de duplicació es va incrementar significativament entre la primera i la tercera IET (t test de Wilcoxon , $p= 0.008$; taula 2), i el valor màxim de la CV durant el rebrot va ser significativament més baix a la tercera interrupció que a la segona (t test de Wilcoxon , $p< 0.05$). Els diferents cicles d'IET van provocar una disminució espontània del valor d'estabilització de la CV en 4 dels 9 pacients a la segona IET i en 6 dels 9 pacients a la tercera IET. A més a més, 4 d'aquests 6 pacients, van mantenir una CV < 5000 còpies/ml després d'una mitja de 12 mesos sense tractament.

A la segona i tercera IET, l'increment de les respostes cel.lulars immuno específiques anti-VIH-1, respecte a la mitja del nivell abans de la interrupció del tractament, va ser significativament superior en aquells pacients que van presentar una disminució espontània del valor d'estabilització de la CV en plasma (els pacients 4, 72, 107 i 226 a la segona IET i els pacients 4, 72, 107, 170, 211 i 226, a la tercera IET) respecte als que no presentaven canvi o

van incrementar la CV (rank sum t test; $p=0.02$ per la resposta CTL i $p=0.0001$ per la resposta de les cèl.lules T CD4) (Figura 18). A més a més, la magnitud mitja de la resposta cel.lular immune detectada durant el període d'interrupció va estar inversament correlacionada amb el punt de la major disminució de la CV després del pic de virèmia en relació a la basal, a la segona i tercera IET (Correlació rank Spearman; $r=-0.60$, $p<0.02$ per un total de cèl.lules T CD8 i una $r=-0.81$, $P<0.01$ per una resposta de cèl.lules T CD4 específica de p24).

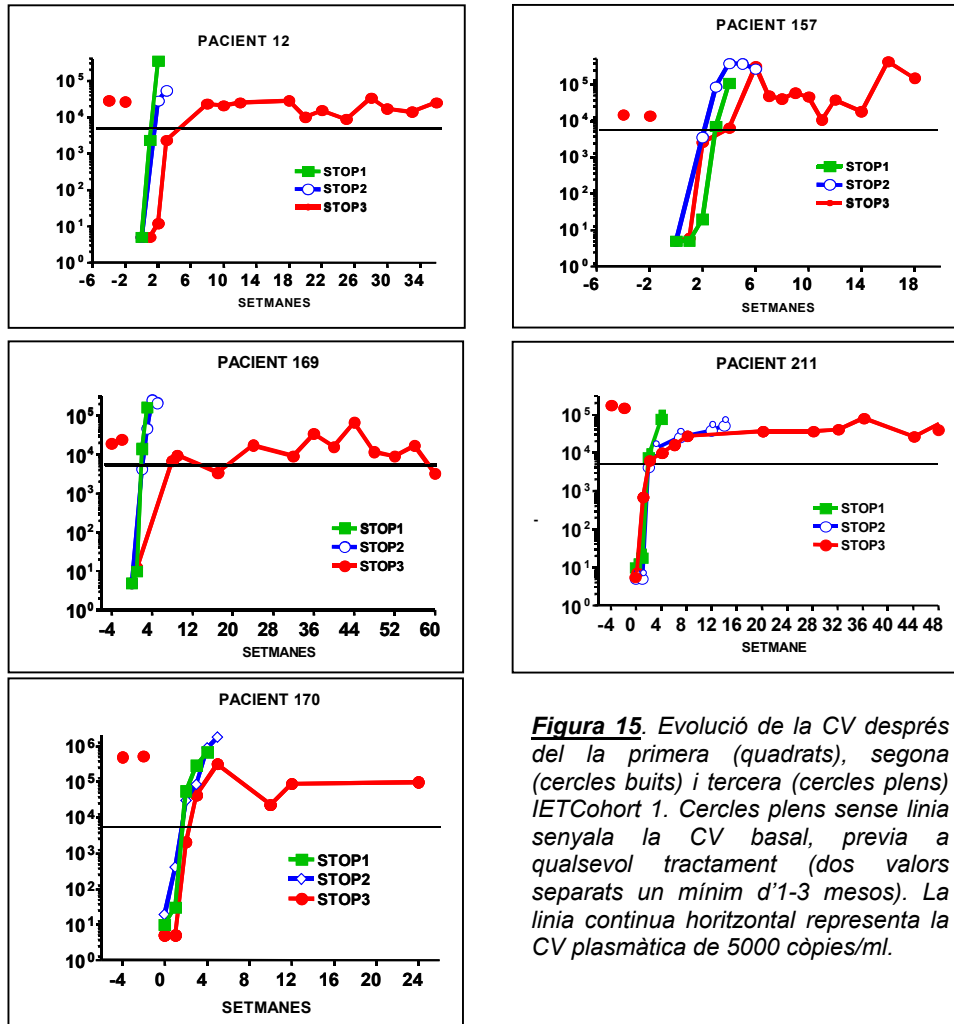


Figura 15. Evolució de la CV després de la primera (quadrats), segona (cercles buits) i tercera (cercles plens) IET Cohort 1. Cercles plens sense línia senyala la CV basal, previa a qualsevol tractament (dos valors separats un mínim d'1-3 mesos). La línia contínua horitzontal representa la CV plasmàtica de 5000 còpies/ml.

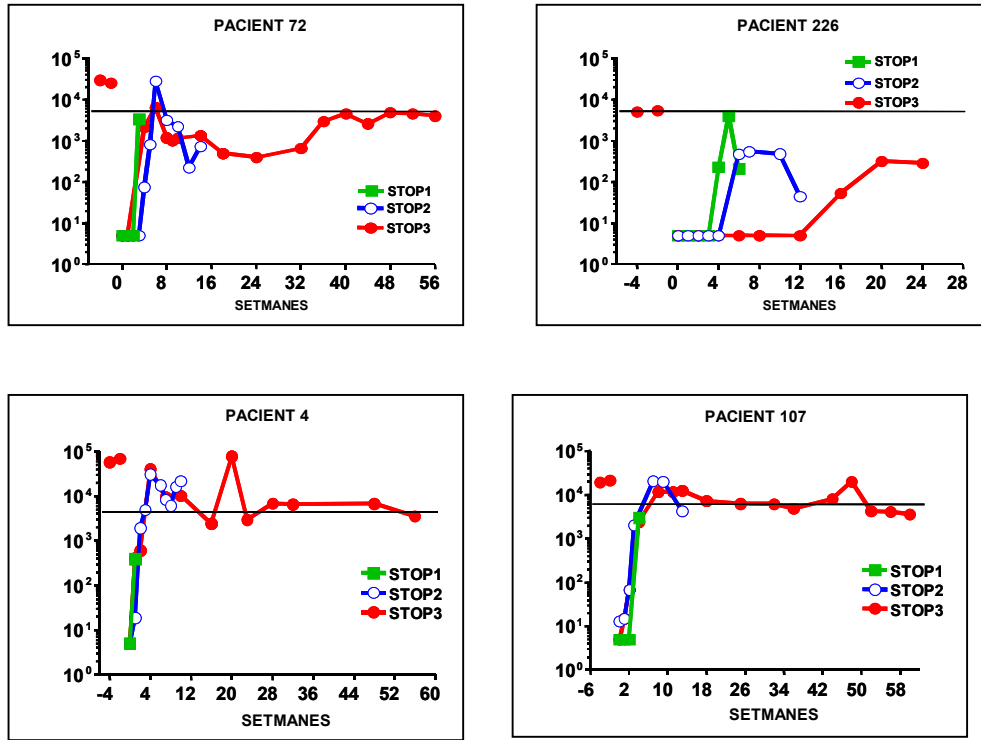


Figura 16. Evolució de la CV dels 20 pacients del grup control al llarg d'un any sense tractament.

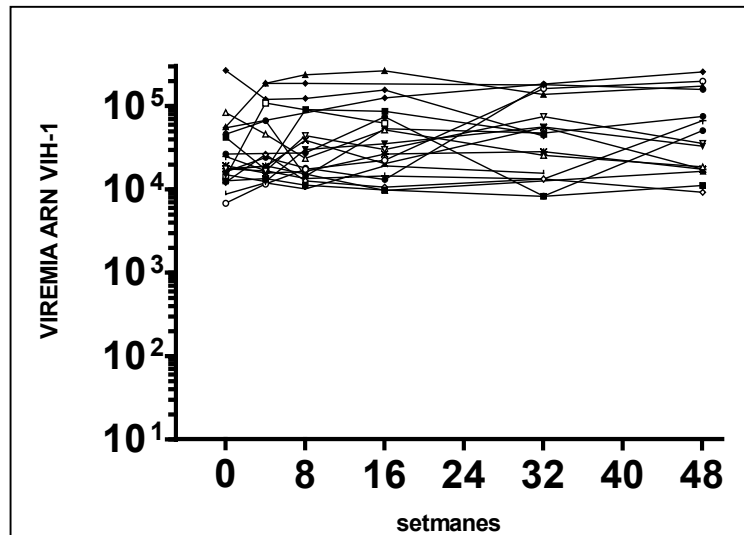
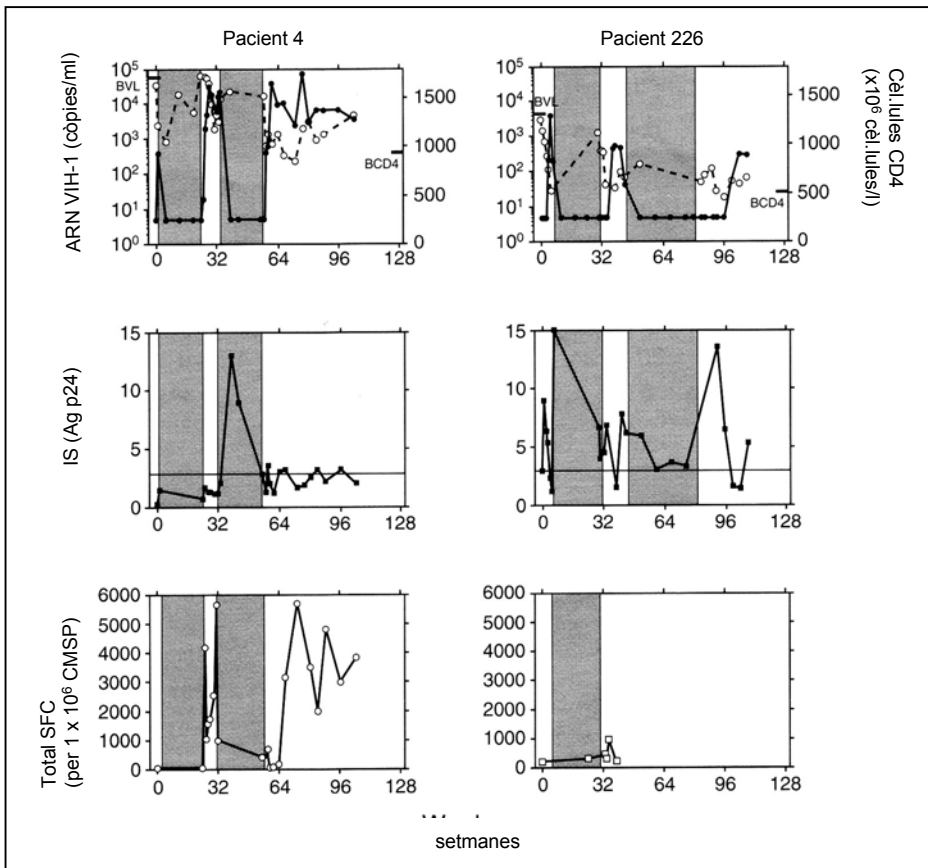


Figura 17. Canvis en la CV plasmàtica, nombre de cèl.lules CD4 i resposta cel.lular immuno específica anti-VIH-1 després de la interrupció del tractament (primera, segona i tercera IET). Les zones grises representen els períodes de tractament anitretroviral. Les zones sense gris representen els períodes d'interrupció del tractament. En el primer gràfic de cadascun dels pacients els cercles plens representen la càrrega vírica i els cercles buits representen el valor de CD4. CVB: càrrega vírica basal; CD4B: CD4 basals; la línia horitzontal en el gràfic representa l'índex d'estimulació (IS) igual 3 considerant com a positiva tota resposta superior.



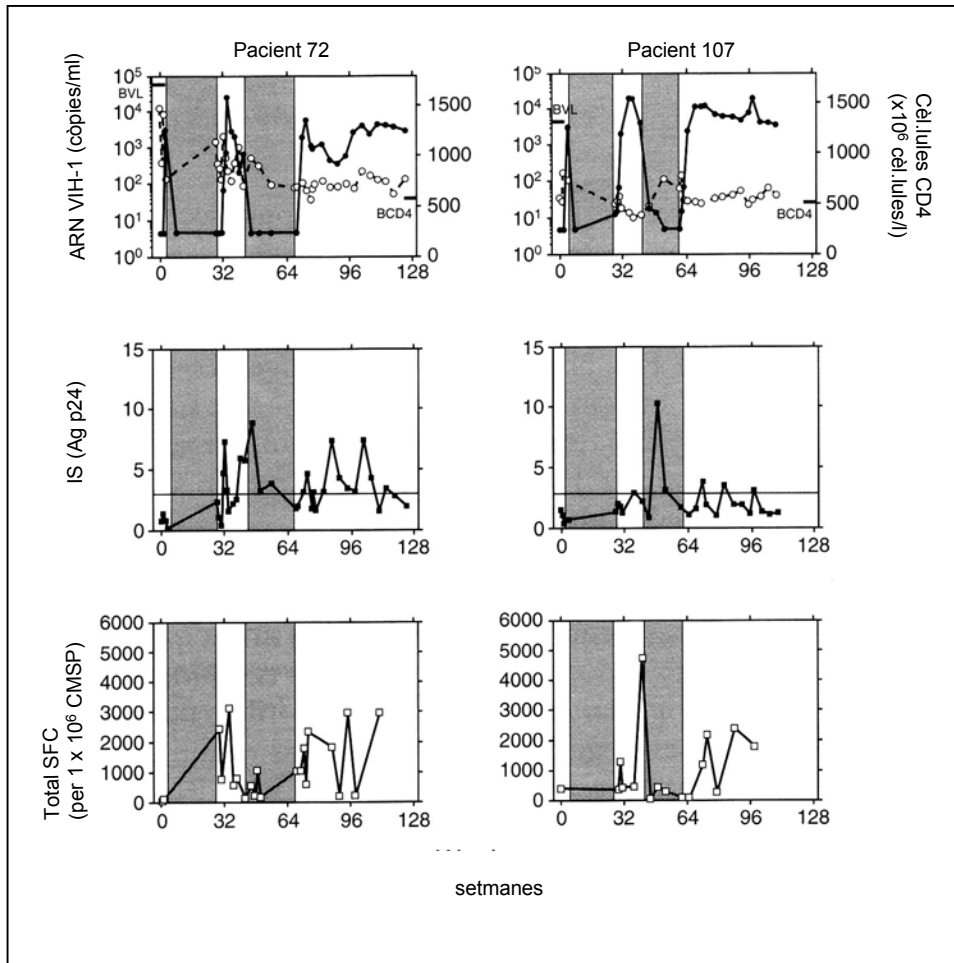


Fig 17a. Pacients amb una disminució del valor d'estabilització de la CV de $>0.5 \log_{10}$ tant a la segona com a la tercera interrupció (els pacients 4, 72, 107 i 226) i que van mantenir nivells de CV <5000 còpies/ml. La resposta CTL específica anti-VIH-1 no es va poder mesurar en el pacient 226 després de la segona interrupció.

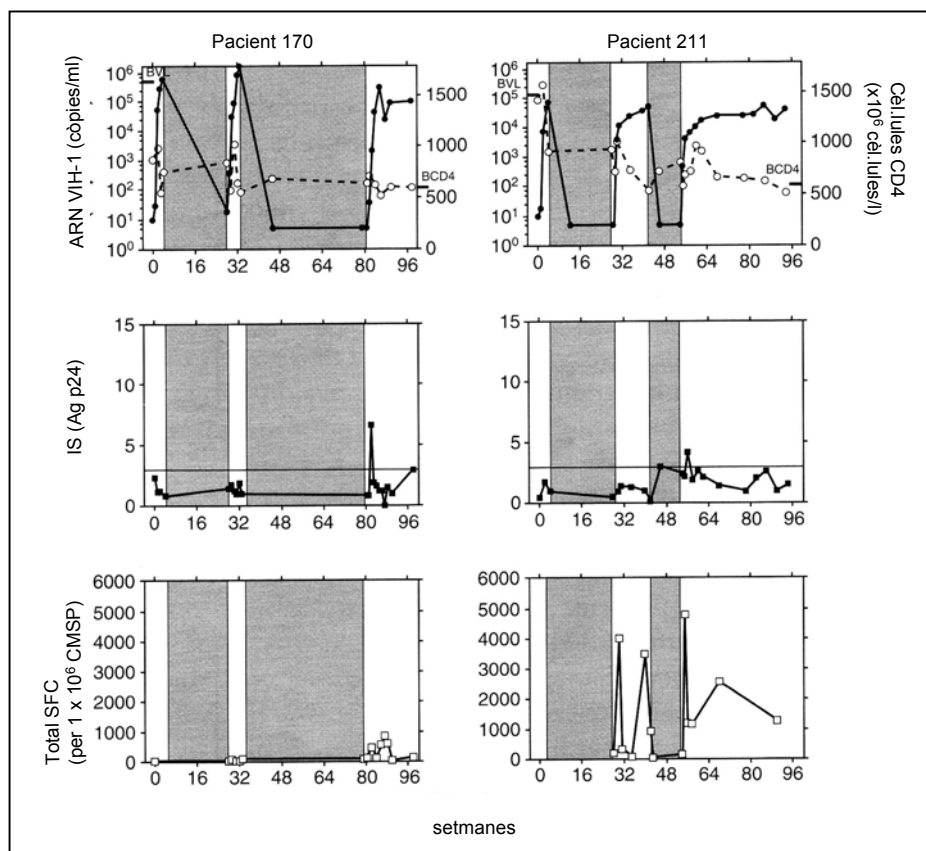


Figura 17b. Pacients amb una disminució del valor d'estabilització de la CV de $>0.5 \log_{10}$ exclusivament a la tercera interrupció i que van mantenir nivells de CV > 5000 còpies/ml (els pacients 170 i 211).

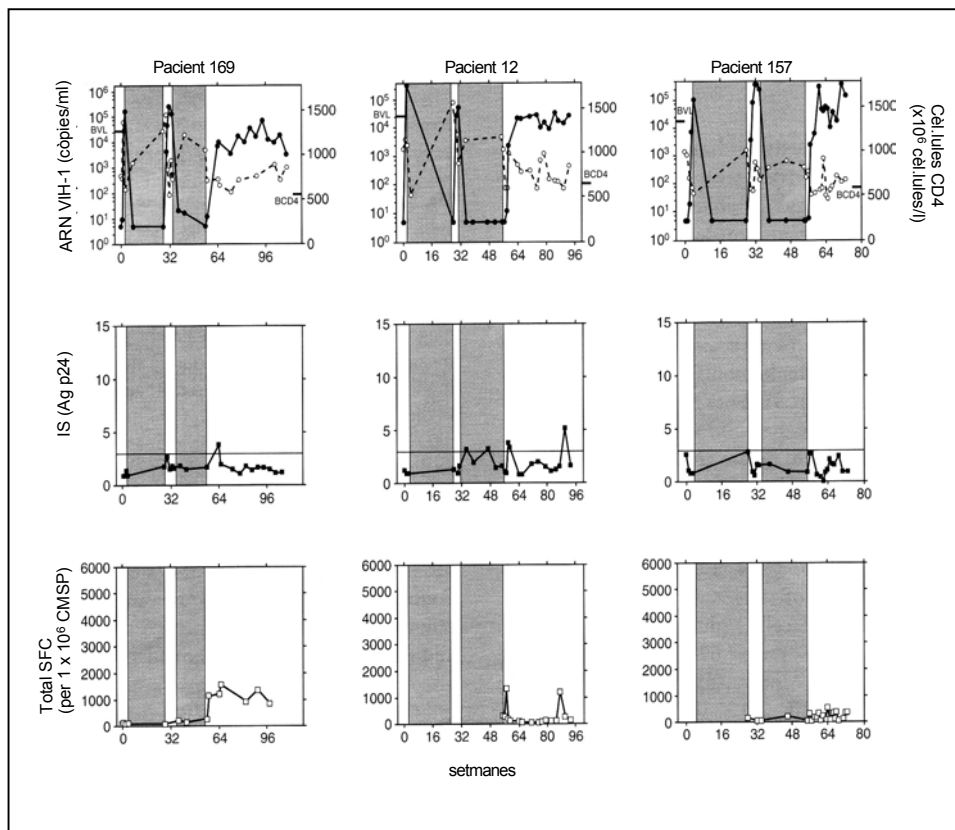
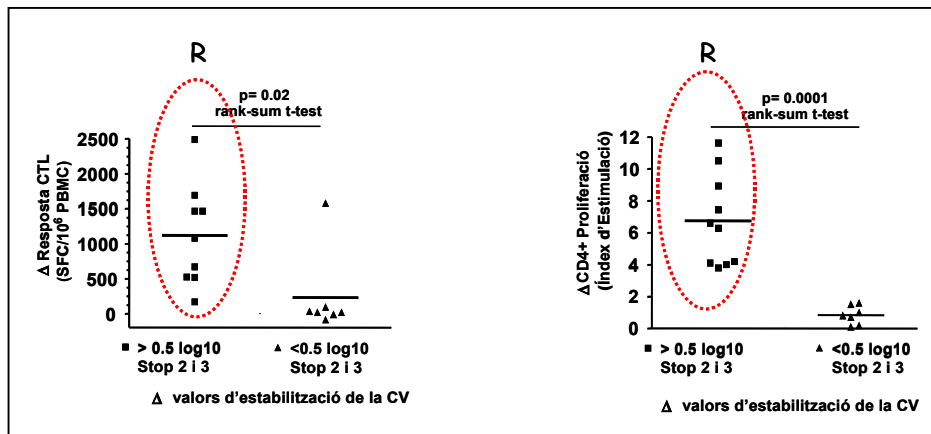


Figura 17c. Pacients on no s'ha detectat una disminució espontània del valor d'estabilització de la CV (els pacients 169, 12, 157).

Figura 18. Les respostes cel.lulars immunes van ser comparades en aquells pacients que van presentar una disminució significativa de la CV respecte de la basal i en aquells sense una disminució significativa ($<0.5 \log_{10}$).



Els canvis en la resposta immune cel.lular específica anti-VIH-1 van ser calculats restant la mitja de la magnitud de la resposta durant el període de tractament previ a les IET, de la mitja de la resposta durant les interrupcions del tractament. El canvi en la resposta CTL en relació al canvi de CV s'assenyala a la gràfica de l'esquerra, i el canvi de la resposta proliferativa CD4 a la gràfica de la dreta. Els pacients que presentaven un major increment de la resposta cel.lular immune tenien canvis més importants en el valor d'estabilització de la CV.

2. RESULTATS DE LA COHORT DE PACIENTS SOTMESOS A IET I UN IMMUNOMODULADOR, LA HIDROXIUREA (HU) (Cohort 2)

En la infecció pel VIH-1, la HU s'ha utilitzat durant anys pel seu efecte antiviral i citostàtic (Foli A, 1998). L'efecte antiviral està mediat per la reducció

dels nivells de deoxinucleòtids trifosfat (dNTPs), que inhibeix la retrotranscripció del VIH i la replicació viral (Lori F, 1994) tant en els limfòcits quiescents com en les cèl.lules diferenciades, ja siguin macròfags (Lori F, 1994) o cèl.lules dendrítiques (Piccinini G, 2002). En els limfòcits actius, la HU no exerceix una activitat antirretroviral però potencia l'activitat de determinats anàlegs de nucleòsids, com és la didanosina (ddl). A l'estudiar l'efecte immunomodulador d'aquest antiviral, s'observa que la principal conseqüència cel.lular deguda a la reducció dels dNTPs és un efecte cistostàtic (Maurer B, 1988). En canvi, l'efecte en el sistema immune d'aquesta acció cistostàtica no ha estat encara revelada (Lori F, 1999).

En aquest treball hem hipotetitzat que, des de que la interrupció del TARGA indueix una ràpida activació antigènica amb la presència d'elevats pics de replicació vírica que podria destruir els clons reactius en front de l'estímul antigènica, la utilització d'un citostàtic ajudaria als limfòcits T a romandre quiescents, evitant la infecció productiva pel VIH-1 i evitant pics de virèmia que poguessin destruir la resposta immuno-específica anti-VIH-1.

S'han estudiat 20 pacients amb infecció crònica pel VIH amb una xifra basal de CD4 $>500 \times 10^6$ cèl.lules/l (com a mínim en dues determinacions separades per un període d'1 a 3 mesos) i una càrrega vírica estable > 5000 còpies/ml (com a mínim en dues determinacions separades per un període d'1 a 3 mesos). L'esquema de tractament d'aquests 20 pacients està representat al disseny experimental. Al comparar les característiques basals dels dos grups de pacients (grup HU i grup de TARGA) com són sexe, mitjana d'edat, factor de risc, mitja de cèl.lules T CD4 i CD8 i la CV en plasma, no es van observar diferències significatives entre els dos grups (Taula 3).

Tots els pacients van estar sotmesos a cinc interrupcions del tractament separades per 8 setmanes de tractament amb el mateix règim antirretroviral. El TARGA es va interrompre en cadascuna de les interrupcions. La hidroxiurea es va retirar durant la primera, segona i tercera interrupció, i es va mantenir durant la quarta i la cinquena interrupció. La raó de mantenir la HU a la quarta i cinquena interrupció va ser demostrar d'una manera més

plausible quin era el seu efecte en les IETs. La hidroxiurea en un principi podria actuar de dos maneres diferents. En primer lloc, inhibint el rebrot inicial procedent dels reservoris, tant dels limfòcits que es troben en un estadi quiescent, com dels macròfags o de les cèl.lules dendrítiques, a on el fàrmac ha demostrat ser efectiu en monoteràpia (Lori F i col., 1994); en aquest cas, l'efecte de la hidroxiurea es podria observar inclús quan aquesta s'interromp. En segon lloc, la HU podria limitar la segona ona de replicació vírica procedent dels limfòcits T activats, com a conseqüència de la seva activitat citostàtica; en aquest cas l'efecte de la replicació vírica s'observaria en cas de mantenir la HU.

Aquests pacients es van seguir una mitjana de 48 setmanes (IQR, 28-76) després de la cinquena i darrera interrupció. Els pacients que no van presentar una bona resposta (CV < 5000 copies/ml) se'ls hi va reintroduir el mateix tractament transcorregudes 24 setmanes de la interrupció. Un dels pacients del grup d'HU va ser exclòs de l'estudi perquè se'l va canviar de protocol.

Taula 3. Característiques basals de la Cohort 2

	Grup HU + TARGA	Grup TARGA
Sexe [%homes]	60	100
Edat (mitja, anys)	32	31
Factor de Risc (%Drogo-dependent)	20	30
Cèl.lules T CD4 (mitja x 10 ⁶ cèl.lules/l)	695	710
Cèl.lules T CD4 (mitja x 10 ⁶ cèl.lules/l)	1069	1014
CV en plasma (mitja log ₁₀ copies/ml)	4.6	4.5

2.1. Dinàmica de la càrrega vírica

Al llarg de les IET es va detectar en tots els pacients, tant en el grup de TARGA com en el grup d'HU, un increment de la CV. D'altra banda, al comparar els dos grups es va observar un canvi en el rebrot de la CV de la primera respecte a la cinquena interrupció, així, el temps de duplicació de la CV en el rebrot va incrementar de la primera a la cinquena interrupció [dels 2.08 dies (SE, 0.38) als 6.2 dies (SE, 2.8) ($p < 0.05$) en el grup d'HU i de 3.3 dies (SE,

0.65) a 5.6 dies (SE, 1.6) ($p < 0.05$) en el grup de TARGA] sense detectar-se una diferència significativa entre els dos grups (Figura 19). Dos dels pacients d'aquesta cohort (67HU i 138AR) no es van representar a la figura 19 per manca de punts valorats de CV per poder calcular el temps de duplicació.

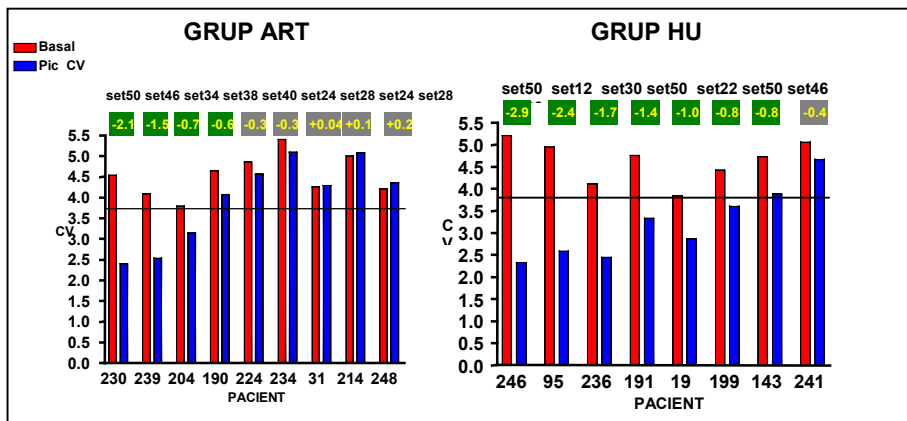
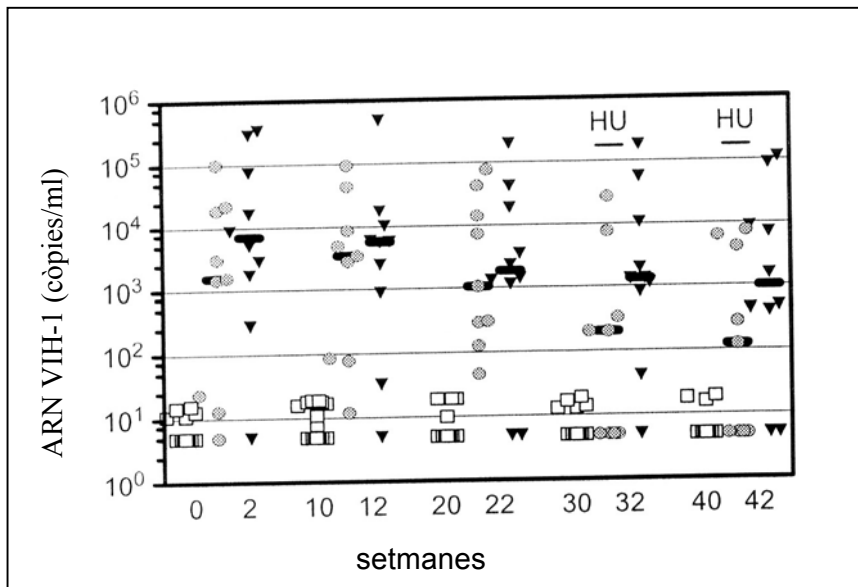


Figura 19. Diferències de CV entre el moment basal i la cinquena interrupció. Cohort 2

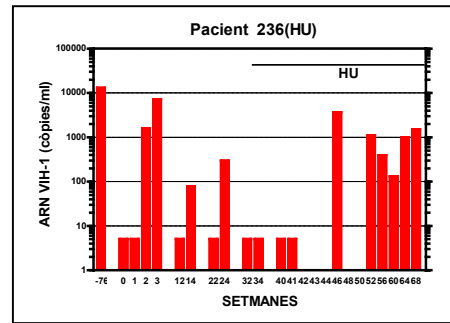
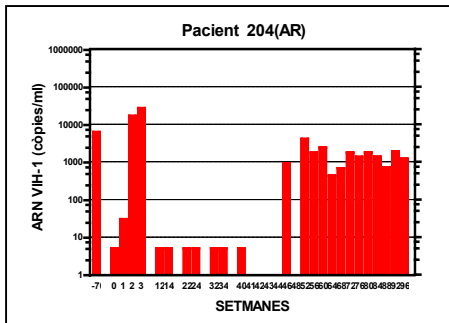
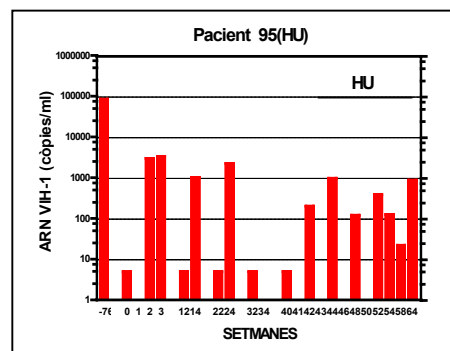
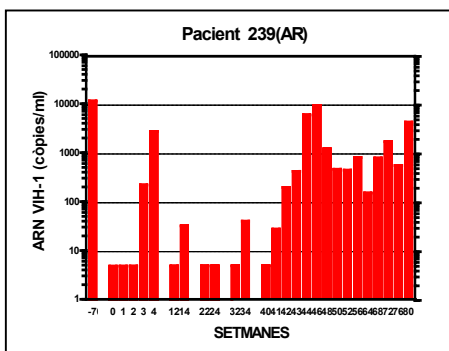
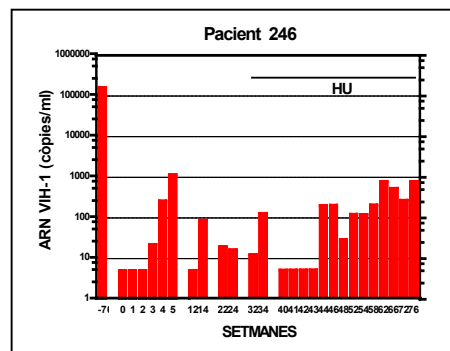
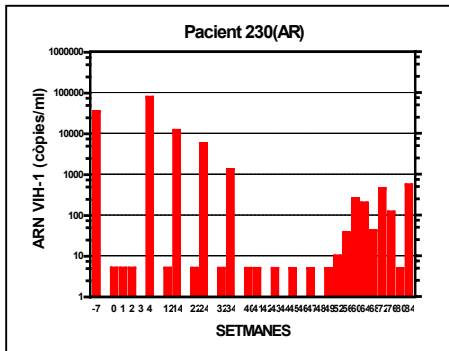
Tampoc es van observar diferències en el rebrot de la CV transcorregudes dues setmanes de la interrupció del tractament quan es compara el grup de la HU (mitja VL 3.1, 3.5, 3.5 \log_{10} còpies/ml durant la primera, segona i tercera IET respectivament) i el grup de TARGA (mitja CV 3.7, 3.4, 3.2 \log_{10} còpies/ml) (Figura 20). En canvi, durant el període de temps, que incloïa la quarta i cinquena interrupció del tractament, en el que el citostàtic es va continuar administrant en el grup d'HU, la CV del rebrot després de 2 setmanes d'interrupció del tractament en el grup d'HU va ser de 2.2 i 2.2 \log_{10} còpies/ml, respectivament (que és, 1 \log_{10} còpies/ml inferior al del període previ a la IET en el mateix grup), mentre que el rebrot de la CV no va variar en el grup de TARGA (mitja CV 3.2 i 3.1 \log_{10} còpies/ml durant la quarta i cinquena interrupció, respectivament) (Figura 20).

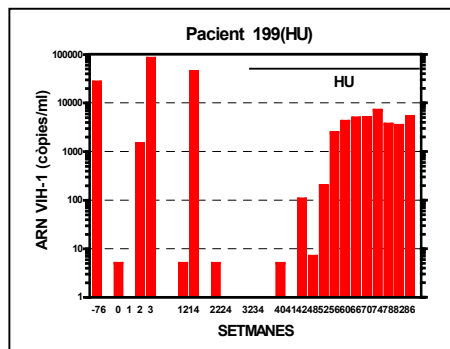
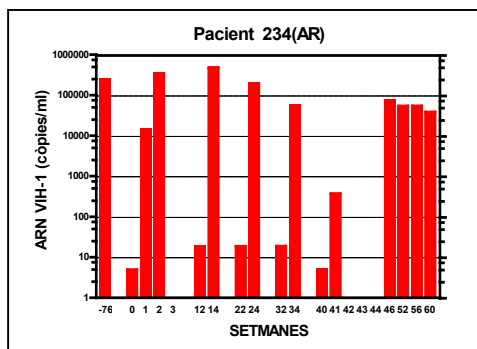
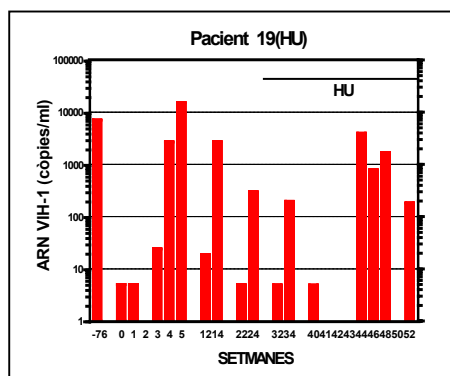
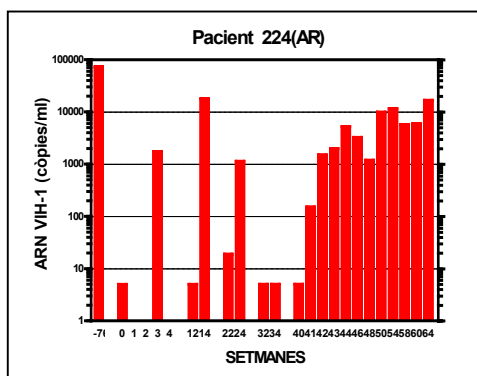
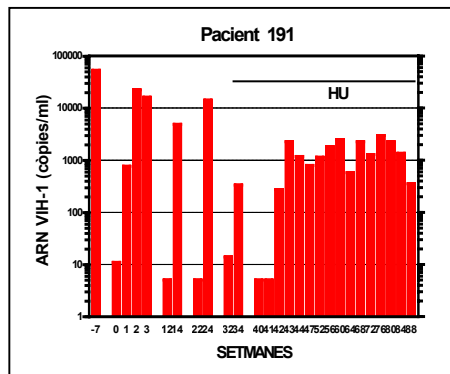
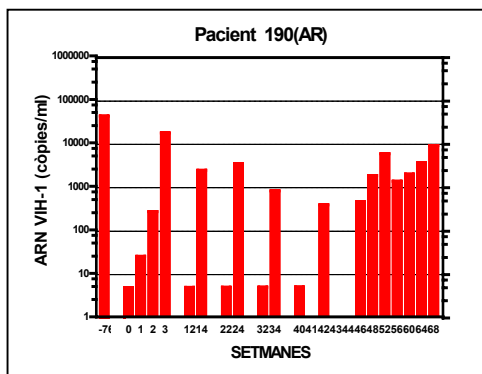
Figura 20. CV durant les IET. Cohort 2

Els quadrats buits representen els períodes de tractament i els símbols plens representen la CV després de 2 setmanes sense tractament en cada cicle d'IET; els cercles representen el grup d'HU + TARGA, triangles representen el grup de TARGA. Les línies horitzontals representen la mitjana dels valors de la CV. En el grup d'HU + TARGA, únicament la HU es va continuar administrant (entre la setmana 30 i 32 i entre la setmana 40 i 42) durant la quarta i cinquena interrupció del tractament.

Després de la cinquena interrupció del tractament, el valor màxim de la CV en el rebrot va ser inferior en el grup que mantenia la HU (Figura 20). En aquest grup es va observar un valor màxim de la CV > 5000 còpies/ml en únicament dos dels nou pacients comparat amb l'observat en els vuit dels deu pacients del grup de TARGA ($p= 0.0185$). Un dels fets més importants va ser que la CV va mantenir-se <5000 còpies/ml en 8 dels 9 pacients del grup d'HU i en 4 dels 10 pacients en el grup de TARGA transcorreguda una mitja de 48 setmanes de seguiment després de la cinquena interrupció ($p= 0.039$) (Figura 21, 22). La mitja de la diferència entre la CV basal, prèvia a qualsevol tractament i el valor d'estabilització de la CV, determinat per la mitja de les

dues darreres mesures estables (amb una diferència de menys de $0.3 \log_{10}$ còpies/ml) separada un mínim d'un mes després de 24 setmanes de la interrupció durant la cinquena IET va ser de -1.4 a $-0.6 \log_{10}$ còpies/ml en el grup d'HU i el grup de TARGA, respectivament.





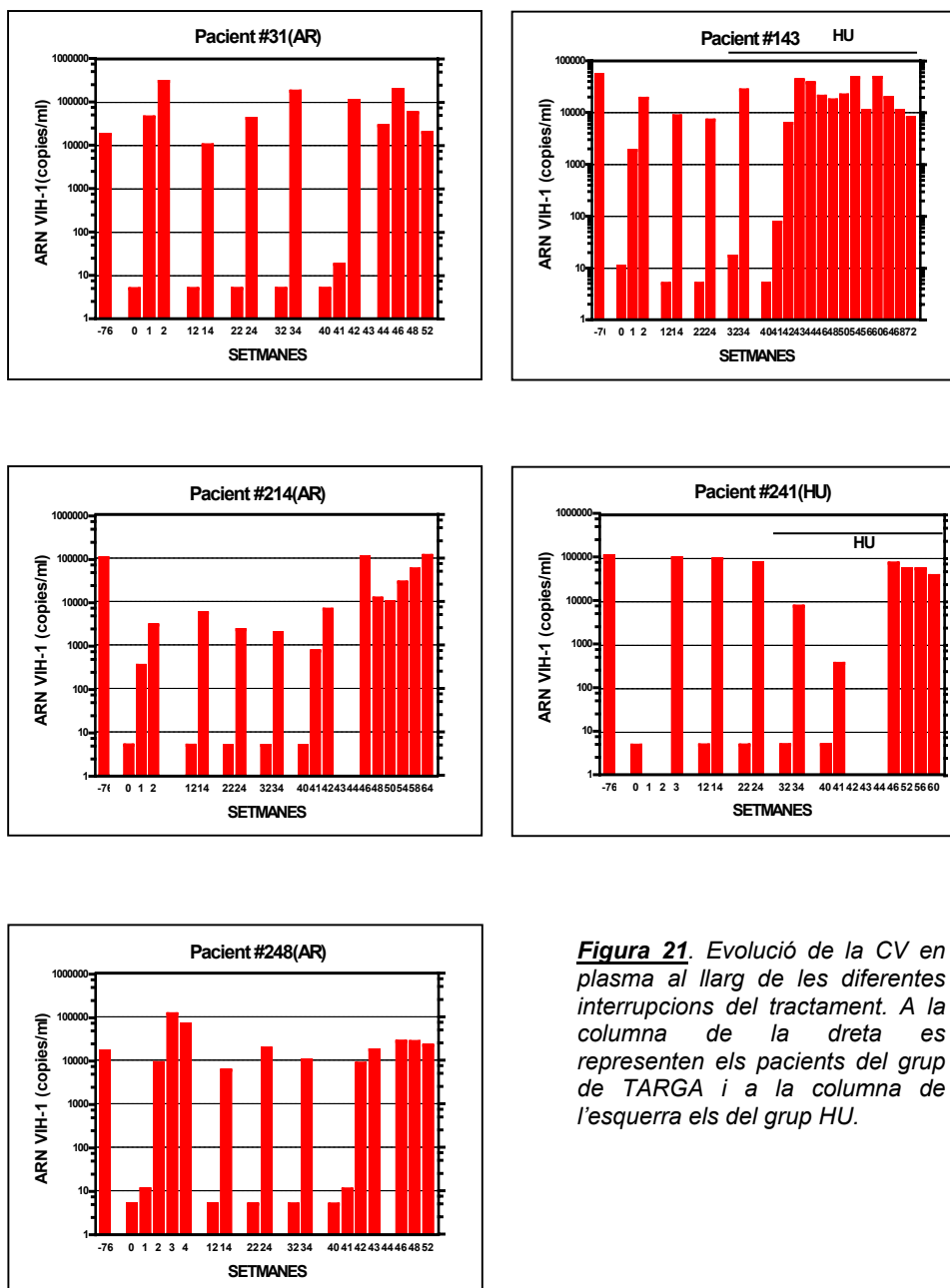
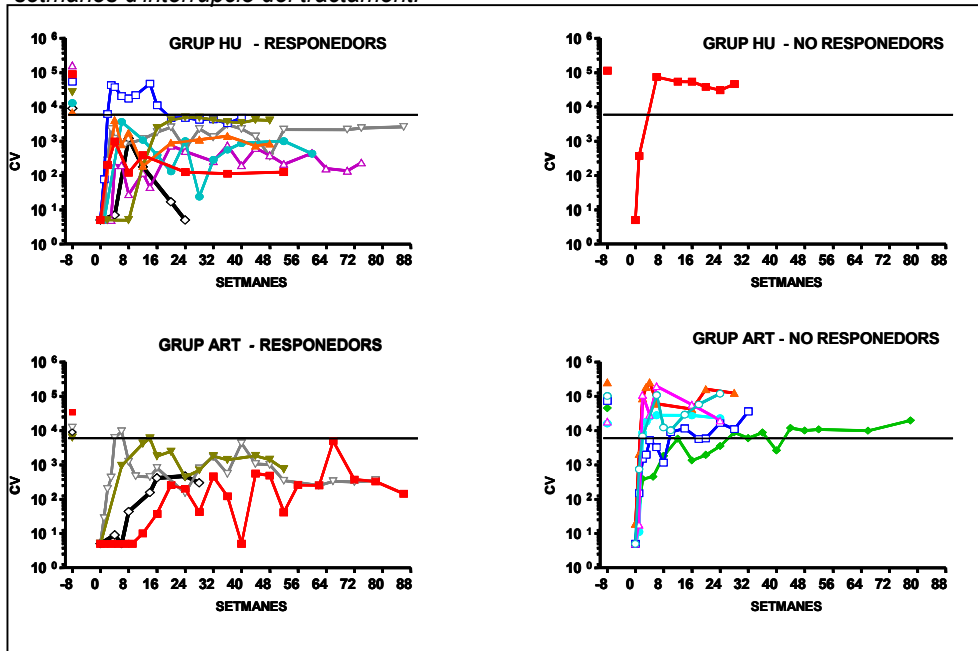


Figura 21. Evolució de la CV en plasma al llarg de les diferents interrupcions del tractament. A la columna de la dreta es representen els pacients del grup de TARGA i a la columna de l'esquerra els del grup HU.

Figura 22. Evolució de la CV després de la cinquena interrupció (IET). Els pacients se'ls va considerar responedors si mantenien una CV <5000 còpies/ml després de 24 setmanes d'interrupció del tractament.



2.2. Respostes immuno específiques anti-VIH-1

En el moment basal, tan sols 7 dels 19 pacients estudiats van presentar una resposta immune CD8 citotòxica (CTL) anti-VIH-1 entre moderada i forta. El valor de la mitja de la resposta CTL basal va ser de 570 SFC/ 10^6 CMSP i de 698, 582, 1080, 1429 i 2814 SFC/ 10^6 CMSP durant els 5 cicles d'interrupció del tractament ($p= 0.0001$). L'espectre de la resposta CTL va incrementar d'una mitja de 3 pèptids (rang de 0-8) basals a 6 pèptids (rang de 4-16) a la cinquena interrupció. Es va detectar una dèbil resposta limfoproliferativa (LPR) en front a la proteïna p24 del VIH-1 en 3 dels 19 pacients basalment, i en 14 dels 19 pacients estudiats després de la cinquena interrupció del tractament ($p= 0.0003$). En ningun dels punts estudiats es van observar diferències significatives en la resposta CTL ni LPR entre els dos grups de TARGA i HU.

Es va observar una tendència d'una major resposta CTL i LPR en els pacients responedors ($p=0.10$ pels dos grups) que es va mesurar quan la CV va arribar al valor d'estabilització després de la cinquena interrupció. En canvi, en el grup d'HU, 3 dels 8 pacients responedors no van presentar una resposta CTL ni LPR. D'altra banda, en el grup de TARGA, 3 dels 6 pacients no responedors van presentar una forta resposta CTL i LPR. Aquests increments en determinats pacients es van analitzar més detalladament amb l'objectiu de correlacionar-los amb l'allargament del temps de duplicació de la CV durant els rebrots de la primera i cinquena interrupció del tractament. Es va observar que l'increment de la resposta CTL d'aquests pacients no presentava cap correlació amb l'allargament del temps de duplicació ($r= -0.11$; $p= 0.68$), en canvi l'increment en la resposta LPR sí que va presentar una forta correlació amb el temps de duplicació del virus del rebrot ($r= 0.73$; $p= 0.003$). A més a més, la resposta LPR, quan la CV assolía el valor d'estabilització després de la cinquena interrupció, també presentava una forta correlació amb l'allargament del temps de duplicació de la CV del virus del rebrot ($r= 0.95$; $p= 0.0001$).

3. RESULTATS DE LA COHORT DE PACIENTS SOTMESOS A IET I UN IMMUNOMODULADOR, L'ÀCID MICOFENÒLIC (MMF) (Cohort 3)

Aquest estudi compara l'eficàcia en quant a la dinàmica viral del rebrot i al control de la replicació vírica, en dues estratègies de teràpia intermitent, una amb TARGA i l'altra amb TARGA+MMF, mantenint l'immunomodulador durant les interrupcions del tractament.

El micofenolat mofetil (MMF) és un fàrmac ampliament utilitzat en el transplantament de ronyó per la seva capacitat d'inhibir selectivament la divisió limfocitària (Brunet M, 1999). El MMF és l'èster morfolinoetil de l'àcid micofenòlic (MPA), que és el compost actiu. L'activitat del MPA en l'activació cel·lular i en l'infecció pel VIH-1 ha estat estudiada *in vitro* i *in vivo* utilitzant models animals:

- a) El MPA és un potent inhibidor de la proliferació de les cèl.lules T activades, inclús en presència de la IL-2.
- b) El MPA suprimeix la proliferació cel.lular induïnt l'apoptosi i la mort cel.lular d'una gran proporció de cèl.lules T activades.
- c) El MPA pot inhibir la infecció pel VIH en les cèl.lules T CD4, al disminuir la síntesi *de novo* dels nucleòtids de guanosina, substrat necessari per dur a terme la transcripció inversa (Chapuis A, 2000; Margolis D, 2002 ; Brunet M, 2000).

Per tant, el MPA pot inhibir la infecció pel VIH-1 a través d'un doble mecanisme, que inclouria una activitat antiviral en base a la depleció del substrat necessari per dur a terme la transcripció inversa i a una activitat immunològica capaç de reduir el *pool* de limfòcits T CD4 activats, que en definitiva dona suport a la infecció productiva pel VIH-1 (Margolis D, 1999).

Es van estudiar 17 pacients amb infecció crònica pel VIH-1. El tractament d'aquests pacients es basava en la combinació d'abacavir, efavirenz i nelfinavir durant 12 mesos. Després es van randomitzar (dia 0) a rebre el mateix tractament més MMF (0.25 g bid) (grup MMF, n=9) o a rebre el mateix tractament TARGA (grup TARGA, n=8) durant un període de 120 dies. L'esquema de tractament es detalla a l'apartat de disseny experimental. Dos pacients del grup de TARGA es van perdre durant el seguiment després de la randomització i abans d'iniciar les interrupcions de tractament. No es van incloure en l'anàlisi.

Les característiques basals com el sexe, l'edat, el factor de risc, el nombre de cèl.lules CD4 i la CV, d'aquests pacients es detallen a la taula 4. Al realitzar l'anàlisi estadístic no es van observar diferències significatives entre els dos grups (TARGA i TARGA+MMF).

Al dia 0 (dia de la randomització) i al dia 120 (dia de la primera IET), tots els pacients van presentar la CV en plasma indetectable (CV<5 còpies/ml) (Figura 23A). En canvi, la CV en el teixit limfàtic va ser detectable en el dia 0, en 3 dels 9 pacients del grup de TARGA + MMF i en 2 dels 6 pacients del grup

de TARGA. En el dia 120 tots el pacients tenien la CV en teixit limfàtic indetectable (CV<40 còpies/mg de teixit) (Figura 23B).

Per fer l'anàlisi dels resultats d'aquesta cohort es van realitzar dues dicotomies: a) tenint en compte els dos grups de pacients avants esmentats, TARGA (n=6) i TARGA+MMF (n=9) i b) tenint en compte l'eficàcia del tractament amb MMF en base a la capacitat del sèrum del pacient en inhibir la resposta proliferativa de la linea cel.lular CEM de dél.lules T humanes limfoblastoides. Grup amb capacitat inhibidora (grup-inh+, n= 6) versus al grup sense capacitat inhibidora (grup-inh-, n=9). Aquest últim inclou el 6 pacients del grup de TARGA i 3 pacients del grup de TARGA+MMF en els que la dosi del immunosupressor no va ser suficient per inhibir la proliferació dels limfòcits T (Taula 4).

Taula 4. Característiques basals Cohort 3. Notes: H: home. ADVP: Drogo-dependent; CV: càrrega vírica. GRUP MMF: Pacients randomitzats a TARGA+MMF, GRUP TARGA: pacients randomitzats a TARGA. GRUP INH+: pacients amb una inhibició de la proliferació cel.lular >60%; GRUP INH- : pacients sense una inhibició de la proliferació cel.lular mantinguda en el temps. Mitja ^acèl.lules/mm³, ^bcòpies/mL.

	Global pacients	Grup TARGA-MMF	Grup TARGA	Grup-INH+	Grup-INH-
N	17	9	8	6	11
Sexe (H) (%)	9 (53)	5 (55)	4 (50)	3 (50)	6 (54)
Edat (anys)	36	34	37	36	36
Factor de risc (ADVP%)	4 (24)	3 (33)	1 (13)	1 (17)	3 (27)
CD4 basals ^a	652	602	728	616	676
Log ₁₀ CV plasma ^b	3.18	3.1	3.3	3.05	3.3

Al realitzar l'anàlisi estadístic no es van observar diferències entre els dos grups (TARGA i TARGA+MMF). Al dia 0 (dia de la randomització) i al dia

120 (dia de la primera IET), tots els pacients van presentar la CV en plasma indetectable (CV<5 còpies/ml) (Figura 23A). En canvi, la CV en el teixit limfàtic va ser detectable en el dia 0, en 3 dels 9 pacients del grup de TARGA + MMF i en 2 dels 6 pacients del grup de TARGA, però en el dia 120 tots els pacients tenien la CV en teixit limfàtic indetectable (CV<40 còpies/mg de teixit) (Figura 23B).

Figura 23. Basal Cohort 3: CV abans de qualsevol tractament. Dia 0: dia de la randomització. Dia 120: dia previ a la interrupció del tractament. Dia 150: 30 dies després de la interrupció del tractament.

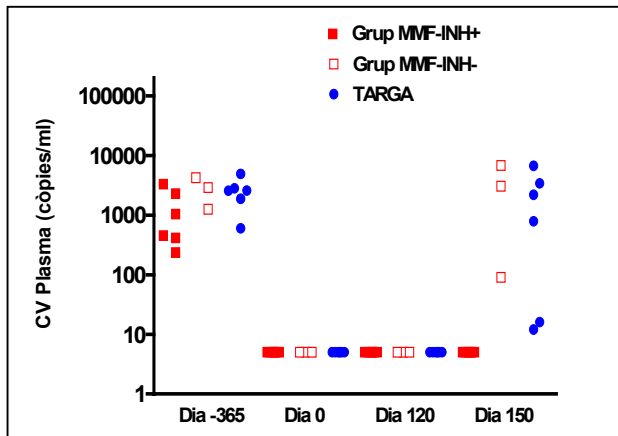


Fig. 23A (la CV en plasma)

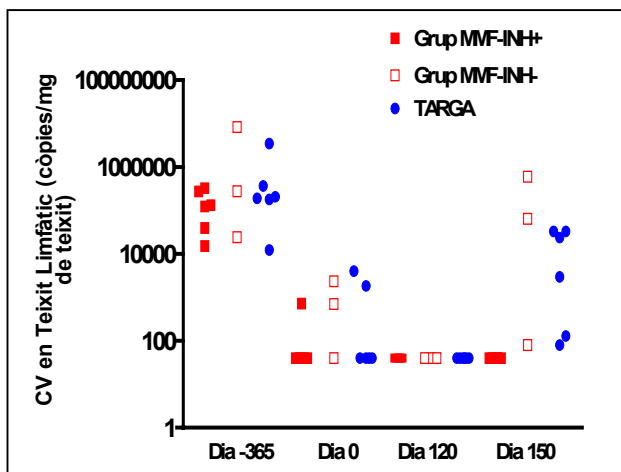


Figura 23B. (la CV en teixit limfàtic)

3.1. Dinàmica viral en el rebrot

No es van observar diferències en el rebrot de la CV després de la interrupció del tractament quan es comparen els dos grups, TARGA i TARGA+MMF (Taula 5).

Després de la primera IET, 5 dels 9 pacients del grup de TARGA+MMF versus 1 dels 6 pacients del grup de TARGA van mantenir un valor de CV < 200 còpies/ml durant un mínim de 6 mesos (Figure 24) (p=0.28).

Transcorregut un mes de la interrupció del tractament, la CV en plasma i en teixit limfàtic es va incrementar per damunt del límit de detecció en 0/6 dels pacients del grup-inh+ i en tots els pacients del grup-inh- (Figura 24) (p= 0.0001).

El temps de duplicació va ser significativament superior en el grup-inh+ 10.22 ± 1.3 comparat amb el grup-inh- 4.6 ± 1.6 (p=0.03). L'àrea sota la corba del rebrot de la CV(AUC) de la primera interrupció va ser significativament inferior en el grup-inh+ 0.82 ± 0.23 que en el grup-inh- 1.92 ± 0.2 (p=0.003). No es van observar diferències significatives en el pic de CV després de la primera interrupció (p= 0.28) (Taula 5, Figura 24).

Taula 5 Grup MMF: pacients randomitzats a TARGA + MMF, Grup TARGA : pacients randomitzats a únicament TARGA Grup INH+ : pacients que aconseguixen una inhibició mantinguda de la proliferació cel.lular >60%; Grup INH-: pacients sense una inhibició de la proliferació cel.lular mantinguda en el temps. AUC: àrea sota la corba (\log_{10} CV). PIC: pic de la CV al rebrot. TD: temps de duplicació. Nombre de pacients amb un valor d'estabilització de la CV <200 còpies/ml. S'han ressaltat en vermells valors en els que s'ha observat una diferència significativa al comparar dos grups.

	AUC	p	PIC	p	TD	p	Valor estabilització CV <200 (n)	p
Grup TARGA-MMF N=9	1.27	0.2	3.8	0.28	8.12	0.16	5	0.28
Grup TARGA N=6	1.82		3.4		4.9		1	
Grup INH+ N=6	0.82	0.003	3.4	0.28	10.22	0.03	5	0.01
Grup INH- N=9	1.94		3.8		4.6		1	

3 dels 6 pacients del grup-inh+ en comparació a 8 dels 9 pacients del grup-inh-, van complir els criteris per reintroduir el tractament després de 4 mesos de la seva interrupció, ja que presentaven la CV >200 còpies/ml.

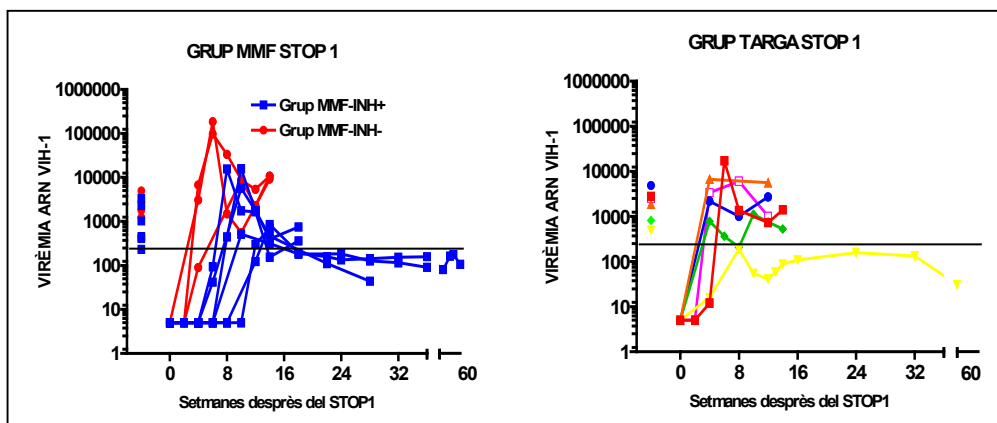
Una pacient del grup-inh+ va quedar embarçada després de reintroduir el tractament, éssent exclosa de l'estudi. Al igual que un pacient del grup-inh- que va decidir no reiniciar TARGA.

En tots els pacients que van reiniciar el tractament la CV va disminuir fins arribar als nivells d'indetectabilitat (<5 còpies/ml) tant el la primera com en la segona IET.

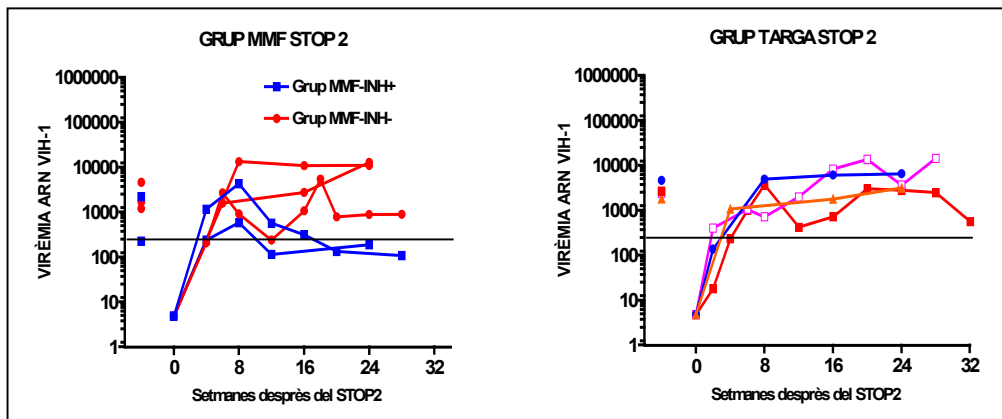
Després de la segona IET el temps de duplicació de la CV en el rebrot i el pic de la CV va ser similar al de la primera IET (Figura 24 i 25). En dos pacients del grup d'inhibició (pacient 78 i 34) el rebrot de CV va ser més ràpid en la segona IET que en la primera (Figura 26).

Els nivells d'unió de l'anexina V, mesura d'apoptosi, no van variar al llarg de l'estudi. No és van observar diferències dels nivells d'anexina V al comparar el grup de MMF amb el de TARGA, ni el grup d'inhibició de la proliferació cel.lular amb el grup de no inhibició.

Figura 24. Evolució de la CV en plasma després de la primera interrupció. Cohort 3

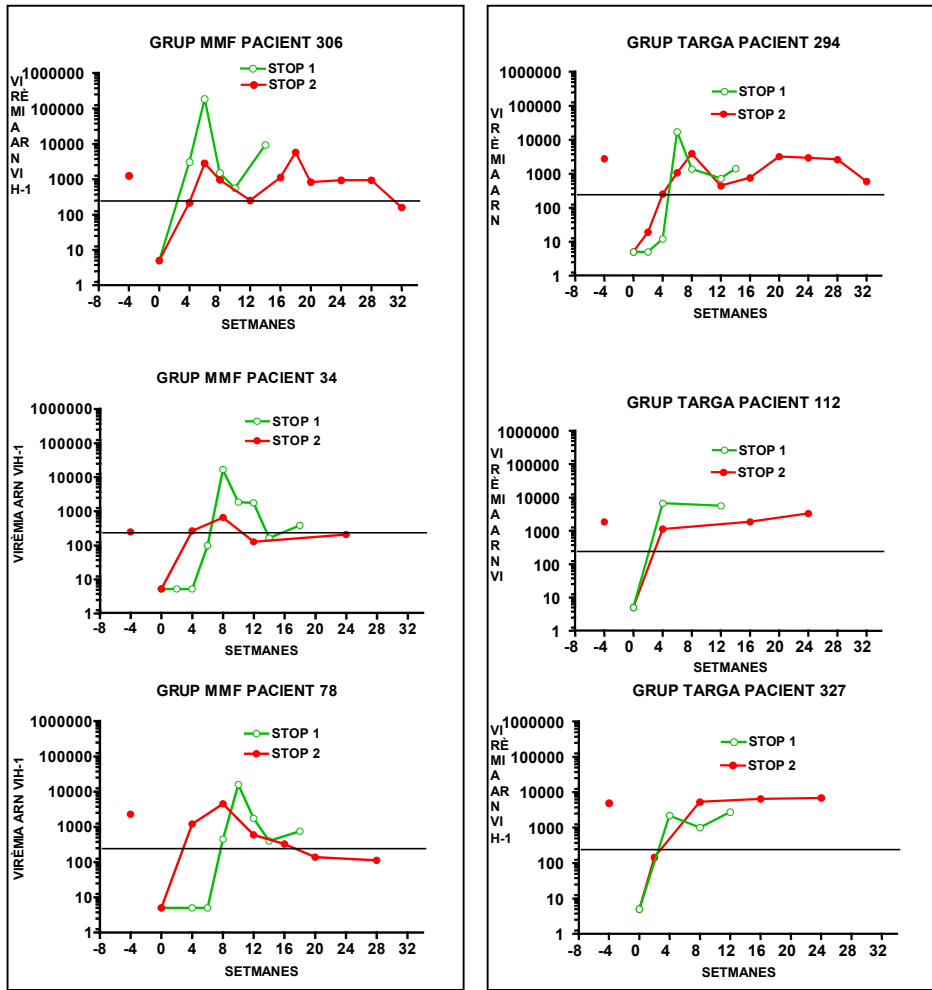


El gràfic de l'esquerra representa els pacients del grup del MMF. La línia blava (inhibició completa) són els pacients inh+, la línia vermella (no inhibició) són els tres pacients inh- del grup de micofenòlic. El gràfic de la dreta representa el pacients del grup de TARGA .

Figura 25. Evolució de la CV en plasma després de la segona interrupció. Cohort 3

El gràfic de l'esquerra representa els pacients del grup de MMF. El gràfic de la dreta representa el pacients del grup de TARGA

Figura 26. Pacients 78 i 34. Evolució de la CV en plasma durant la primera i segona interrupció en comparació a altres pacients del estudi.



En resum, considerant els dos pacients que van abandonar l'estudi com a fracassos, 5 dels 6 pacients del grup-inh+ van mantenir la CV <200 còpies/ml després de la primera o segona IET, un mínim de 6 mesos, en comparació a tan sols 1 dels 9 pacients del grup-inh- (Taula 5).

3.2. Efectes secundaris

Ningun dels pacients va haver d'abandonar l'estudi per efectes secundaris. 4 pacients van haver de canviar de tractament degut a efectes secundaris (tots ells durant el període anterior a les IET). Dos d'ells van tenir diarrees, es va canviar el nelfinavir per l'indinavir. Un pacient va fer un rash a l'abacavir, que es va canviar per l'estavudina i un pacient que va tenir desordres psiquiàtrics per l'efavirenz, se li va canviar per lamivudina. La mitja dels nivells del colesterol, triacilglicèrids i glucosa no van variar de manera significativa durant el període de seguiment. No es van observar casos de lipodistrofia. Cap dels pacients que prenen MMF van presentar efectes secundaris durant les IET. La proporció de pacients amb efectes secundaris no va diferir entre el grup de MMF i TARGA (33% en els dos grups).

RESULTATS OBJECTIU 2.

Els resultats que es presenten a continuació contesten l'objectiu 2 d'aquesta tesi, on s'estudia l'evolució del virus al llarg de les diferents IET.

S'ha hipotetitzat que la impossibilitat de generar una forta resposta immunològica a través de les IET en aquests pacients pot ser degut a l'emergència de diferents variants virals en cadascuna de les interrupcions. El gen *env* del VIH-1 es caracteritza per la seva elevada variabilitat en la seqüència, essent una regió important per l'estudi de l'evolució. La interacció del virus amb l'hoste és una de les principals forces que condueixen l'evolució del gen *env*.

S'ha descrit ampliament l'elevada variabilitat del gen *env* en els pacients infectats i la marcada diversificació intraindividual al llarg del curs de la infecció. En un extens estudi longitudinal de pacients progressors típics es va descriure l'existència de tres fases diferents de diversificació genètica del VIH-1 durant el període asimptomàtic (Shankarappa, 1999). Una fase primerenca de duració variable durant la que s'observa un increment linial (~1% per any) tant de la divergència (distància al virus original) com de la diversitat o heterogeneïtat (distància entre seqüències en un moment donat) de la quasiespècie viral. Una fase intermitja caracteritzada per una estabilització o reducció de la diversitat viral tot i el continu increment de la divergència, i una fase tardana en la que la taxa de divergència disminueix o s'estabilitza mentre la diversitat continua amb la seva tendència a la reducció. La transició de la fase primerenca a la intermitja s'associa amb l'emergència d'un virus sincitial, que assoleix la seva màxima representació en la quasiespècie quan està pròxima la fase de transició de la fase intermitja a la tardana. La transició a la fase tardana també s'associa amb una reducció del nombre de cèl·lules T CD4 ≤ 200 cèl·lules/ μ l. Tot i que aquest sembla ser un patró suficientment sòlid per progressors típics, no està clar si es pot generalitzar a pacients amb altres taxes de progressió (és a dir, progressors ràpids o progressors lents a llarg plaç). Per últim, la fase simptomàtica de la infecció es caracteritza per una homogenització de la població vírica (que s'havia iniciat al final del període

assimptomàtic), probablement reflexe de la replicació massiva d'una variant de major eficàcia biològica i del col.lapse del sistema immune (Delwart E, 1997). Tambè s'ha descrit que la taxa de divergència en els pacients amb infecció pel VIH-1 amb un TARGA efectiu, és de <0.05% per any, sempre que es pugui detectar (Günthard, 1999). D'altra banda, no hi han estudis conclusius sobre l'evolució genètica del VIH-1 en pacients inclosos en protocols d'interrupcions estructurades del tractament (Dybul, 2003), tot i que s'ha suggerit que l'evolució genètica hauria de ser menor que l'observada en pacients no tractats (Günthard i col., 1999).

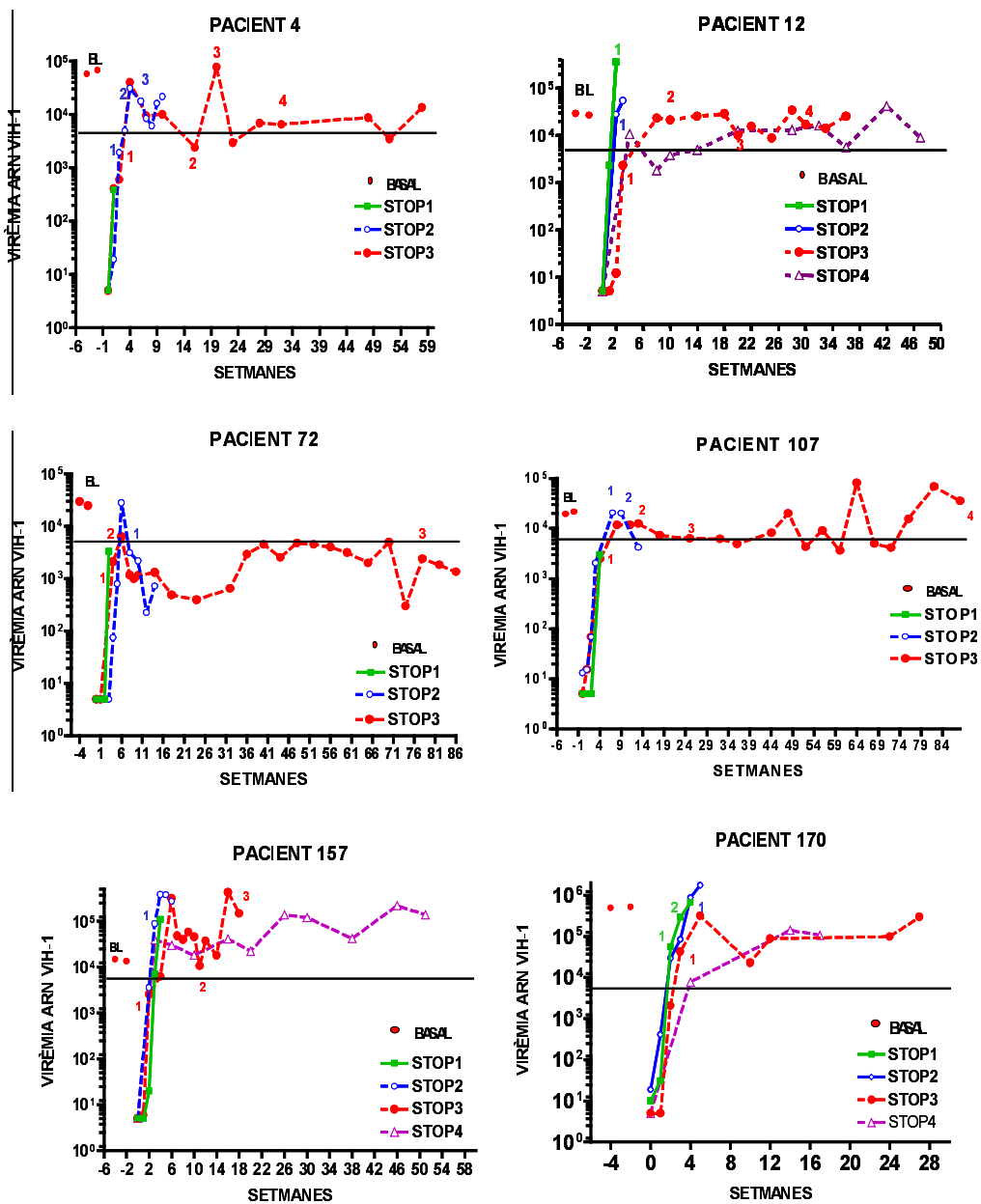
En aquest treball s'han estudiat els pacients amb infecció crònica pel VIH-1 de la cohort 1 (sotmesos a 3 cicles d'interrupcions estructurades del tractament). En l'anàlisi únicament s'han analitzat els resultats de 7 dels 10 pacients de la cohort 1 (el pacient 156 va abandonar el protocol, el pacient 226 va presentar virèmies majoritàriament inferiors a les 1000 còpies/ml, dificultant la seva amplificació i el pacient 211 no es va poder estudiar per manca de mostra) i un sub-grup de 3 pacients del grup control sense tractament. A material i mètodes s'especifiquen les característiques d'aquests pacients. En tots ells es va fer un anàlisi filogenètic amb seqüències consens del gen *env*, una inferència del correceptor utilitzat a partir de l'estudi de la regió V3 del gen *env* i un anàlisi de paràmetres bioquímics a sang.

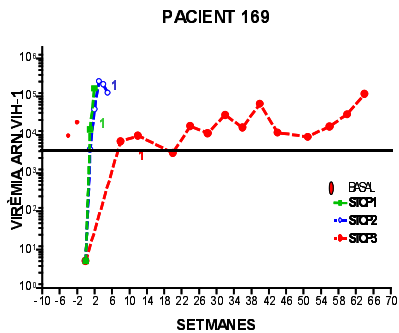
Anàlisi filogenètic

Es van estudiar les seqüències consens de la regió C2V4 del gen *env* que codifica per les proteïnes de l'envolta del VIH-1. Es van analitzar, sempre que la CV ho permetia (CV>1000 còpies/ml) diferents punts en cadascuna de les interrupcions de tots els pacients, el virus del rebrot, el virus del pic i els virus del període d'estabilització de la CV que es detallen a la figura 27.

En tots els casos, les seqüències consens dels virus de cada pacient estudiades en cadascun dels punts al llarg de les IET es van agrupar juntes i no amb les dels virus d'altres pacients amb un bootstrap altament significatiu (valors > 80 a 100) (Figura 28).

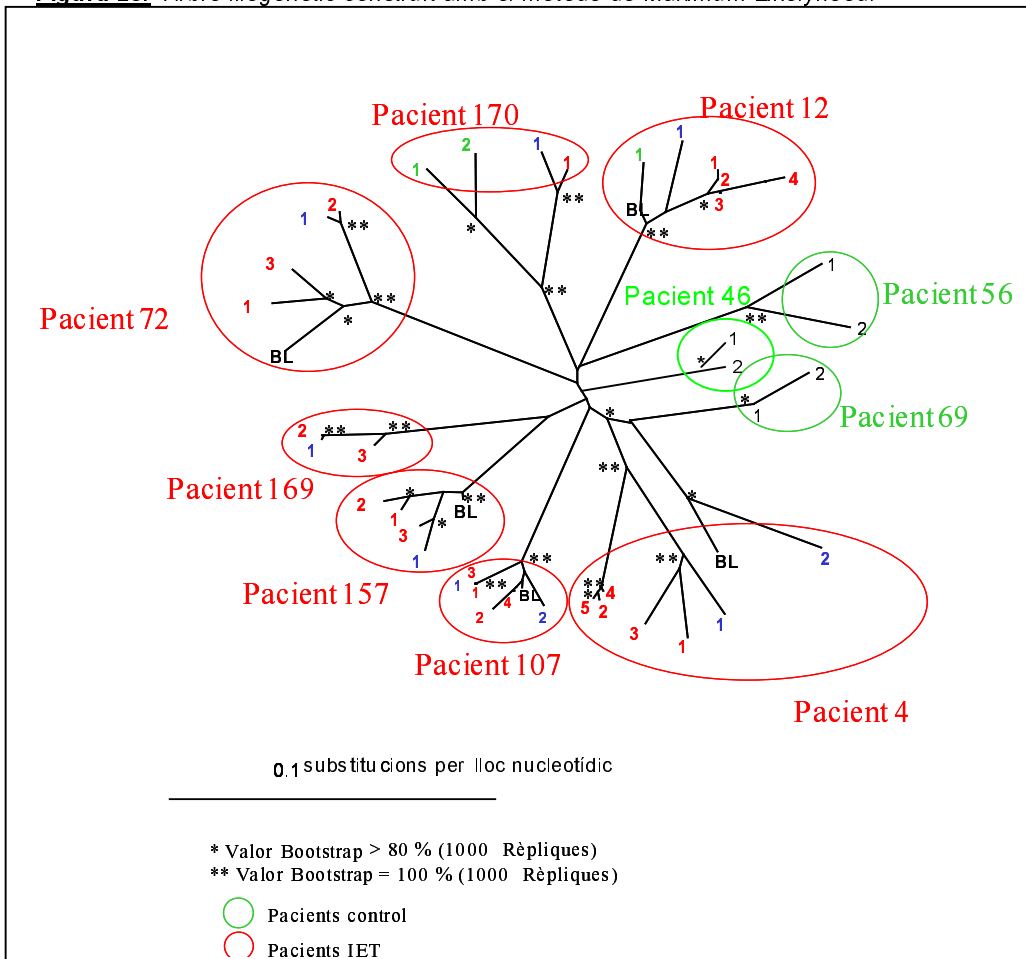
Figura 27. CV durant els períodes de no tractament dels 7 pacients sotmesos a IET.





Els dos punts vermells (basal) indiquen la CV basal previa a qualsevol tractament. La línia verda, blava i vermella indiquen la CV durant el període de la primera, segona i tercera interrupció respectivament. En aquestes gràfiques estan assenyalats amb números els diferents punts on s'ha estudiat la regió C2V4 del gen env per l'estudi d'evolució

Figura 28. Arbre filogenètic construït amb el mètode de Maximum-Likelihood.



Cercles vermells i verds engloben la seqüència C2V4 dels virus estudiats en diferents punts en el temps de cadascun dels pacients sotmesos a IET o sense tractament respectivament.

En els pacients 12 i 170 es va observar una evolució linial, es a dir, la distància genètica respecte la seqüència del virus basal de cadascun dels pacients incrementava en les successives interrupcions al llarg del temps. D'altra banda, en els pacients 4, 72, 107, 157 i 169 l'evolució no va seguir un patró d'evolució concret, els diferents virus de cada pacient no semblen segregar en el temps.

Per cadascun dels pacients es va calcular la diversitat nucleotídica i la freqüència de mutació. No es va observar cap diferència significativa en la distància genètica ni en la freqüència de mutació entre: els pacients responedors (4, 226, 170 i 211) i els no-responedors (169, 12, 157) ($p=0.53$); els pacients responedors i els pacients del grup control ($p=0.81$ respectivament) i els pacients no-responedors i els del grup control ($p=0.98$) (Taula 6, figura 15).

PACIENT	<u>Distància Genètica</u>	<u>% Distància Genètica Mitja</u>	<u>SD</u>	<u>Freqüència Mutació</u>
4	0,094	9,4±5	0,9	0,085
12	0,027	2,7±1.3	0,6	0,033
72	0,045	4,5±1.6	0,6	0,068
107	0,015	1,5±0.8	0,3	0,015
157	0,023	2,3±0.9	0,5	0,018
170	0,073	7,3±3.3	0,8	0,067
169	0,017	1,7±0.4	0,4	0,016
46	0,03	3	0,7	0,009
56	0,059	5,9	0,9	0,056
69	0,017	1,7	0,7	0,008

Taula 6. Distàncies genètiques i freqüències de mutació dels virus de cadascun dels pacients estudiats

Inferència del correceptor.

En tots els pacients, els virus estudiats en diferents punts al llarg de les IET eren soques CCR5. Amb la excepció dels virus del pacient 72 que en 3 punts (moment basal, a la segona IET i en un punt de la tercera IET) es van detectar soques CXCR4 (Figura 29).

Figura 29. Inferència del correceptor utilitzat a partir de la seqüència d'aminoàcids de la regió V3 del gen env.

Inferència d'utilització del correceptor loop V3									
		11		25		CCR5	CCR4		
CCR5	CTRPNNNTRK	S	I H I G P G R A F Y A T G	E/D	V I G D I R Q A H				
4. BL		SE	E	+	-		
4.1		G	QY	+	-		
4.2		GX	QY	+	-		
4.3		II	QY	+	-		
4.1	TS		QY	+	-		
4.2			..X..	QY	+	-		
4.3	TS		QY	+	-		
4.4	TS	Y	+	-		
12. BL		I	+	-		
12.1		I	+	-		
12.2		N..	+	-		
12.1		N..	+	-		
12.2		N..	+	-		
12.3		N..	+	-		
12.4		N..	+	-		
72. BL			..M-..T.	KI	-	+		
72.1	G		..M-..T.	R	..I..	-	+		
72.1			..M-..T.	GI	+	-		
72.2	G		..M-..T.	R	..I..	-	+		
72.3			..M-..T.		..N..	+	-		
107. BL		K.	I	+	-		
107.1		K.	XI	+	-		
107.2		K.	G	..N..	+	-		
107.1		K.	XI	+	-		
107.2		K.	EI	+	-		
107.3		K.	XI	+	-		
107.4			..X.K.	XI	+	-		
157. BL	H		..XX..	I	+	-		
157.1	H		..X..K.	XI	+	-		
157.1	H	R	..X..T.		..X..	+	-		
157.2	H	R	..X..T.		..I..	+	-		
157.3	H		..X..K.	I	+	-		
169.1		R	..V-..I.	K.	+	-		
169.1		R	..V-..I.	K.	+	-		
169.2		R	V.V-..I.T.		..V..	+	-		
170.1	X	RA.L.T.	I	+	-		
170.2	R	RA.L.T.	K.	+	-		
170.1	R		..M-..X.		..N..	+	-		
170.2	R		..M-..		..X..	+	-		

La nomenclatura utilitzada és la mateixa que en els gràfics de la figura 27 i l'arbre filogenètic de la figura 28. Aliniament de les seqüències aminoacídiques consens de la regió V3. La primera seqüència (seqüència de referència) és la d'un virus CCR5 de laboratori. (.) indica que existeix en aquella posició aminoacídica el mateix aminoàcid que la seqüència de referència. (-) indica una delecció en aquella posició aminoacídica respecte a la seqüència de referència. Es van emprar les abreviacions estàndars d'una única lletra del codi d'aminoàcids. Les posicions aminoacídiques 11 (S) i 25 (E/D) són a partir de les quals es pot inferir la utilització del correceptor.

Anàlisi dels paràmetres bioquímics.

Es van avaluar diferents paràmetres hematològics i bioquímics, la mitjana de l'hemoglobina, la mitjana del nombre de leucòcits i de limfòcits, la mitjana de les plaquetes i de les transaminases per atribuir les possibles diferències trobades a nivell d'evolució del virus amb una pressió "ambiental" deguda a diferències fisiològiques i no a una pressió immunològica (Taula 7). No es van observar diferències significatives al comparar el grup sotmès a IET i el grup control ($p=0.12$).

<i>Pacients IET</i>	Hb	LEUCO	LINF	PLQ	GOT	GPT
Mitja	46,1	4,820	2,015	203,6	49,38	76,57
Std. Dev	16,84	2,231	0,7788	92,6	65,67	139,2
Std. Error	3,590	0,4758	0,1660	19,74	14,33	30,37
<i>Pacients Ctrl</i>	HB	LEUCO	LINF	PLQ	GOT	GPT
Mitja	154,3	5,050	1,687	143,3	98,83	194,7
Std. Dev	23,40	0,8983	0,3235	105,4	109,9	230,2
Std. Error	9,552	0,3667	0,1321	43,02	44,87	93,99

Taula 7. Mitjana dels paràmetres bioquímics del dos grups de pacients (sotmesos a IET i pacients naïve). (Hb: hemoglobina ; LEUCO: leucòcits; LINF: limfòcits; PLQ: plaquetes; GOT: glutàmic oxaloacètic transaminases; GPT: glutamat piruvat transaminases).

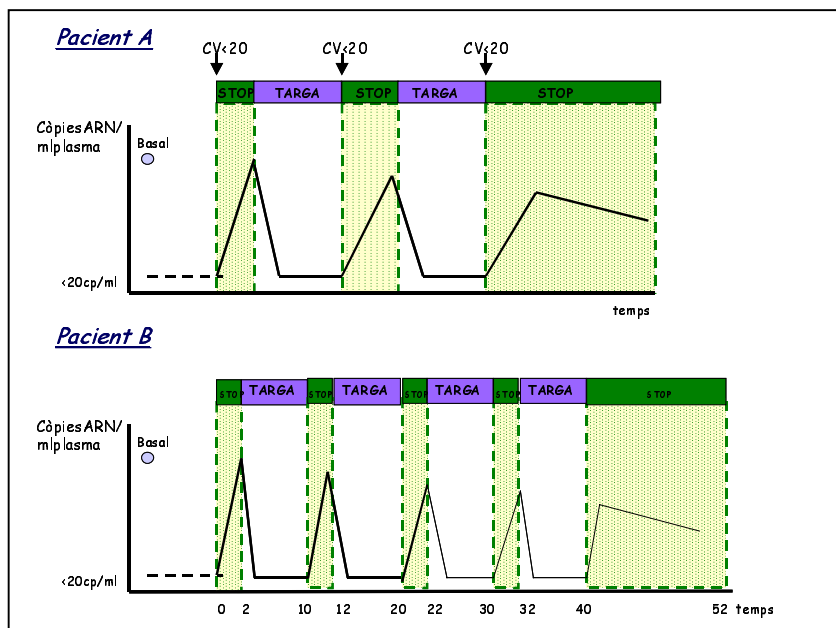
Amb la finalitat d'aprofundir en l'evolució viral al llarg de les IET es va estudiar una parella heterosexual de pacients infectats pel VIH, que es van transmetre l'infecció entre ells, seguits al llarg de 10 anys, durant els quals van estar sotmesos a diferents pautes de tractament antirretroviral

Els pacients d'aquest estudi són una parella heterosexual que es van infectar pel VIH-1 durant l'any 1992. El pacient A (dona) va transmetre-li la infecció pel VIH-1 al pacient B (home) per via sexual després de 10 mesos de la seva infecció primària. La possibilitat de superinfecció és va descartar pel fet que els dos pacients eren monògams durant el període de l'estudi i estaven en un programa d'inseminació artificial. L'any 1996, els dos pacients van començar tractament antirretroviral: el pacient A (la CV era de

27260 còpies/ml) va iniciar tractament amb d4T (estavudina) + 3TC (lamivudina) + RTV (ritonavir) que va ser canviat a AZT (zidovudina) + 3TC + IDV (indinavir) una setmana més tard degut a una parestèsia. Dos anys més tard, l'any 1998, el tractament se li va canviar a AZT + 3TC+ NFV (nelfinavir). El pacient B va començar el tractament antirretroviral amb AZT + ddl (didanosina) (la CV era de 39602 còpies/ml) i dos anys més tard, l'any 1998, va canviar a d4T + 3TC + RTV.

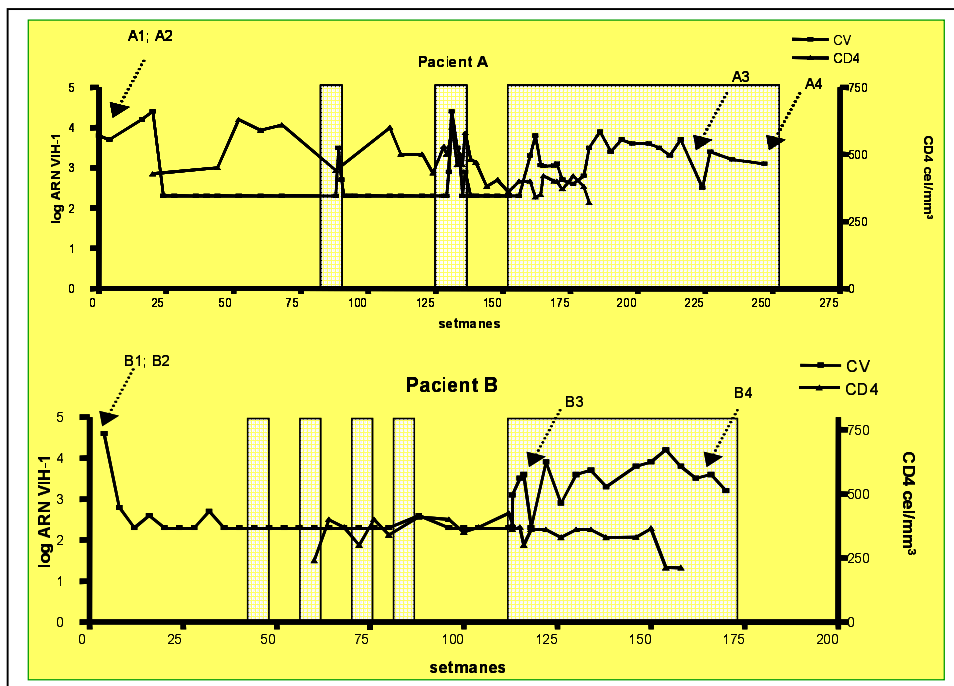
Els dos pacients van tenir la CV per sota del límit de detecció (5 còpies/ml) durant el període de tractament TARGA. A les darreries de l'any 1998, els dos van ser inclosos en protocols diferents d'IETs (pacient A, pertanyia a la cohort 1 d'IET descrita a l'apartat de material i mètodes; el pacient B pertanyia a la cohort suïssa d'IET descrit per Fagard C i col., 2003) (Figura 30). En els dos pacients es va observar un rebrot de la CV després de la darrera interrupció del TARGA, tot i que aquest va ser inferior a la CV basal, mantenint-se amb un nivell d'estabilització, sense tractament, per sota de les 5000 còpies/ml durant un mínim de dos anys (Figura 31).

Figura 30. Estratègies d'interrupcions estructurades del tractament dels dos pacients.



Al pacient A se li va interrompre el tractament 3 vegades en funció de la CV (veure material I mètodes); al pacient B se li va interrompre el tractament un total de 5 vegades. 4 interrupcions del tractament de dues setmanes amb TARGA, la cinquena interrupció va ser de 12 setmanes, considerant-se responentor quan la CV no superava les 5000 còpies/ml.

Figura 31. Evolució de la CV i nivells dels CD4 des del pre-tractament (setmana 0), durant el tractament i el període de les IET fins la darrera interrupció.



Les ombres representen el període d'interrupció del tractament. Les fletxes senyalen els punts on es van estudiar les seqüències del genoma del virus per cadascun dels pacients. Pacient A (A1: plasma basal; A2 ADN proviral basal; A3 i A4 plasma darrera interrupció). Pacient B (B1: plasma basal B2 ADN provial basal; B3 i B4 plasma darrera interrupció).

Dinàmica de la CV i nivells de CD4

Els dos pacients amb infecció crònica pel VIH-1 crònics presentaven uns nivells de CD4 basals estables $>500 \times 10^6$ cèl.lules/l (en un mínim de dues determinacions separades en el temps entre 1 i 3 mesos) i la CV estable > 5000 còpies/ml i (en un mínim de dues determinacions separades

en el temps entre 1 i 3 mesos) durant el període sense tractament de 4 anys de durada. Trancorreguts dos anys de l'inici del tractament els dos pacients tenien una CV < 20 còpies/ml. Els dos pacients, A i B, es van sotmetre a 3 i 5 interrupcions del tractament respectivament (Figura 31). En els dos pacients es va detectar un rebrot de la CV en cadascuna de les interrupcions. Però es van detectar atenuacions d'aquest rebrot de la CV, sent més pronunciades a la darrera interrupció. Paral·lelament es va observar una disminució dels nivells de CD4 immediatament després de cadascuna de les interrupcions. En canvi, els valors de CD4 després de 24 mesos sense tractament de la darrera interrupció es van recuperar al reintroduir el tractament (figura 31).

Anàlisi de seqüències.

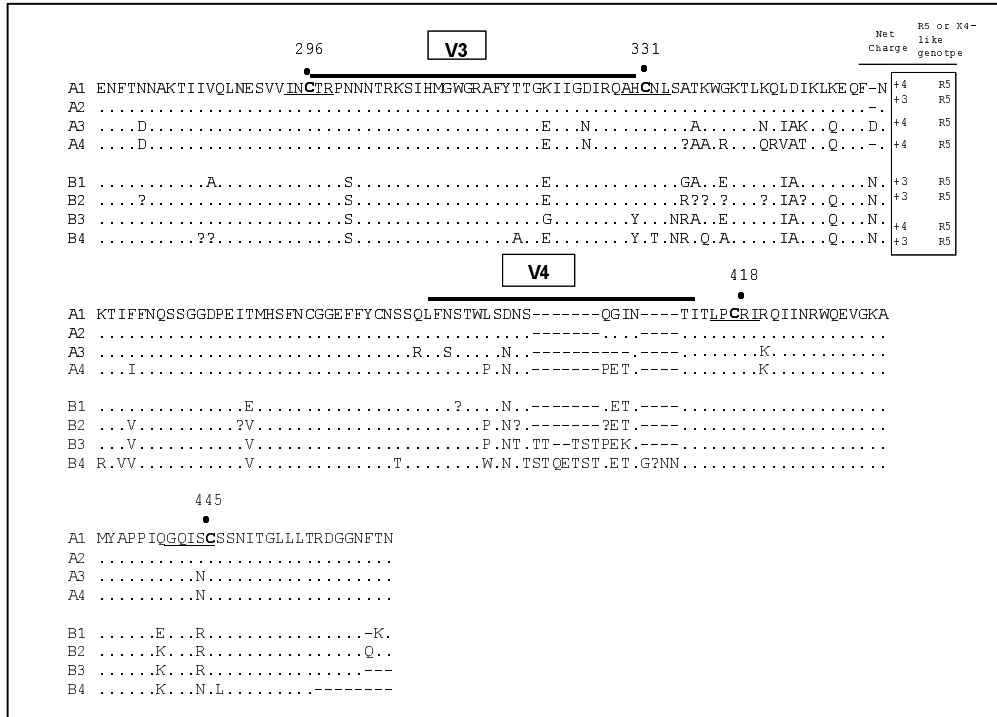
L'alinament creat amb les seqüència d'aminoàcids obtingudes a partir de les seqüències del gen *env* procedents de les diferents quasiespècies víriques estudiades en diferents punts està representat a la figura 32. El detall de les seqüències dels diferents clons s'ha adjuntat a l'anexe. La majoria de les seqüències que codifiquen per les proteïnes de l'envolta dels clons virals mantenen la pauta de lectura. Els 4 residus de cisteïnes a les posicions 296 (IINCTR), 331 (AHCNI), 418 (LPCRI) i 445 (IRCSN) (enumerats segons la seqüència de referència del VIH-1 HXB2 que estan involucrats en la formació del pont disulfur del loops de la regió V3 i V4) estaven completament conservats en les seqüències dels virus dels dos pacients. Canvis en aquestes posicions podrien tenir conseqüències estructurals fonamentals en la conformació de la proteïna de l'envolta, i al mateix temps, aquests canvis podrien representar substitucions que comportessin l'aparició d'un virus defectiu (Miedema i col., 1994).

A partir de la seqüència de la regió V3 del gen *env* es va identificar quin correceptor emprava el virus per infectar les cèl·lules. En aquest cas tots empraven el CCR5 (figura 32). A partir de l'anàlisi de mutants es van identificar dos clons en la mostra A4 del pacient A que empraven el correceptor CXCR4. A més a més, es va detectar la presència d'un codó de terminació, degut a una mutació puntual, en un dels 10 clons obtinguts en la mostra A4 del pacient A i

en un dels 9 clons de la mostra B2 del pacient B (veure aliniaments de l'anexe).

El subtipus del VIH-1 es va determinar a través del gen *env* i es va observar que els virus dels dos pacients pertanyien en el subtipus B.

Figura 32. Aliniament de les seqüències consens de 650 parells de bases del gen *env*, regió C2V4.



Les regions variables V3 i V4 estan marcades amb una línia horitzontal. Les cisteïnes que formen ponts disulfur involucrats en la formació dels loops V3 i V4 també estan assenyalades. La càrrega neta de la regió V3 i la inferència del tropisme R5 o X4 del virus estan assenyalats a la part dreta de l'aliniament. El (?) indica que no hi ha informació en aquest punt

Les seqüències del gen *pol* van ser analitzades emprant la base de dades de Stanford (www.hivdb.stanford.edu), no detectant-se mutacions de resistència als antirretrovirals (figura 33). S'ha de resaltar que les seqüències es van estudiar durant períodes d'interrupció del tractament. No es van detectar diferències en els polimorfismes entre les mostres A1 i A4 i les mostres B1 i B4. En canvi, es van detectar alguns canvis entre els virus dels dos pacients als aminoàcids 35, 63, 93 del gen *pol* que codifica per la proteasa i els aminoàcids

189, 202, 209, 244, 248 i 266 del gen *pol* que codifica per la transcriptasa inversa. A més a més, val a dir que la variació a nivell de seqüència del gen *pol* entre els virus dels dos pacients va ser molt petita després de 10 anys d'infecció.

Figura 33. Aliniament de les seqüències consens del gen *pol*.

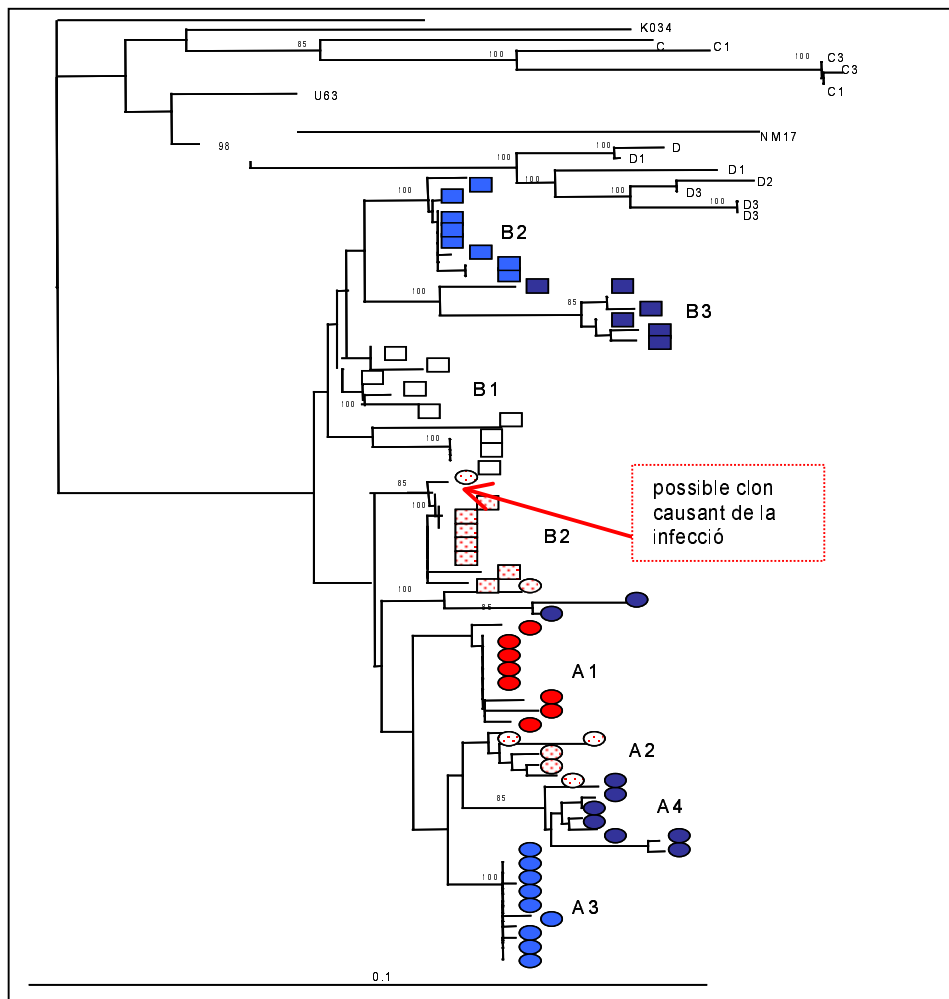


L'asterisc marca l'inici de la pauta de lectura de les dues proteïnes, proteasa i transcriptasa inversa. Es va seqüenciar la regió completa de la proteasa i 888 parells de bases de la transcriptasa inversa. En aquest aliniament de seqüències consens s'observen algunes poblacions mixtes en determinats aminoàcids de la transcriptasa inversa: 210 S/F i 246 S/F en el pacient A i 250 K/R i 268 P/Q en pacient B. Es van emprar les abreviacions estàndars d'una única lletra del codi d'aminoàcids.

Amb la finalitat de conèixer les relacions evolutives entre els virus dels dos pacients es va fer un estudi filogenètic de totes les seqüències del gen *env* obtingudes dels diferents clons emprant una matriu de distàncies de Kimura dos-paràmetres dins de l'algoritme de construccions d'arbres del Neighbor-joining. Les seqüències de cadascun dels pacients van agrupar juntes en un mateix cluster, indicant l'absència de contaminació (Figura 34). La filogènia va demostrar la presència d'una forta relació epidemiològica entre les seqüències

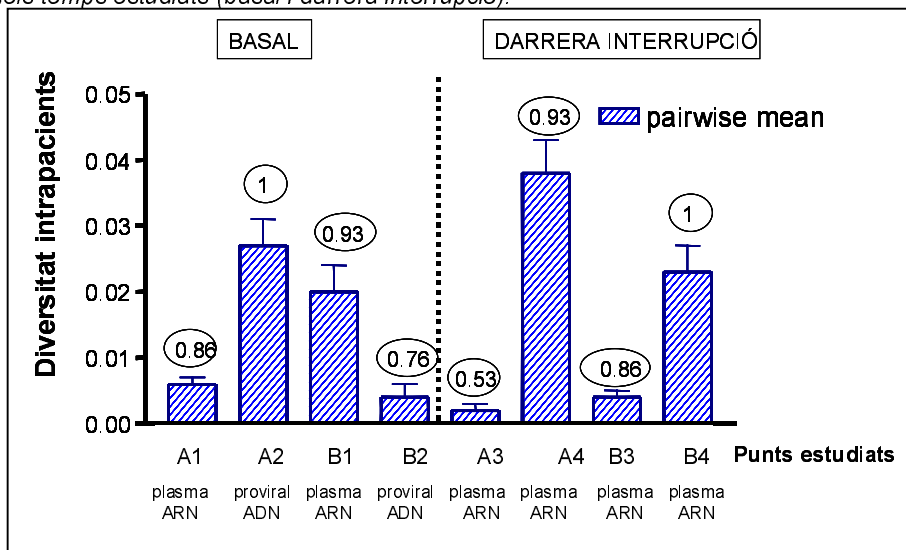
dels virus dels dos pacients. A més a més, les seqüències dels virus dels dos pacients no havien divergit molt durant els 10 anys de la progressió de la infecció. Algunes de les seqüències d'ARN (virus del plasma) amplificades en l'últim punt del pacient A (mostra A4) estaven molt relacionades a nivell genètic amb seqüències d'ADN proviral del moment basal del mateix pacient (mostra A2). A la figura 34 està assenyalat el possible clon causant de la infecció del pacient B que va ser transmès del pacient A, ja que agrupa en el mateix cluster que les seqüències d'ADN proviral del pacient B. El percentatge de representativitat del possible clon infeccios d'ADN proviral del pacient A va ser d'un 14%.

La diversitat intrapacient està definida com la mitja de les distàncies nucleotídiques entre parells de seqüències, calculades mesurant les distàncies entre totes les seqüències de cada pacient a un únic punt en el temps (figura 35). No es van observar diferències significatives en la diversitat intrapacient entre el moment basal (diversitat mitja, 0.014) i la darrera interrupció (diversitat mitja, 0.017) en els dos pacients ($p= 0.875$ [Wilcoxon rank sum test]). Es va observar una tendència a una major diversitat intrapacients al final de la darrera interrupció. Aquesta heterogeneïtat es va observar principalment en la regió C3 i V4 del gen *env* (figura 32).

Figura 34. Relació filogenètica de la regió C2V4 de les seqüències del gen env.

Les lletres al costat de cada cluster de seqüències identifiquen el pacient. Pacients C i D procedeixen de pacients infectats pel VIH seguits amb TARGA supressiu durant 3 anys per després estar inclosos en un protocol de IET durant 3 anys més (seqüències consensus del gen env al moment basal, previ qualsevol tractament; seqüències consensus del gen env C1 i D1; C2 i D2; C3 i D3 provenen de la primera, segona i tercera interrupció dels mateixos pacients, respectivament. Les seqüències de diferents clons de referència del VIH-1 es van agafar del GeneBank (U21, NM17, K034, U63). Les seqüències del pacient A de la mostra A1 estan respresentades per cercles vermells plens, A2 per cercles vermells buits, A3 i A4 per cercles plens de blau fosc i blau clar, respectivament. Seqüències del pacient B de la mostra B1 estan respresentades per quadrats vermells plens, B2 per quadrats vermells buits, B3 i B4 per quadrats plens de blau fosc i blau clar, respectivament. Les ratlles verticals únicament són per fer l'arbre més entenedor a nivell visual. S'ha reflexat únicament el bootstrap superior al 70%.

Figura 35. El gràfic de barres representa la diversitat intrapacients en cadascun dels temps estudiats (basal i darrera interrupció).



L'error estàndard està indicat. Per tal de mesurar l'heterogeneïtat de la distribució es va calcular l'Entropia de Shannon normalitzada (números encerclats).

L'entropia de Shannon és una mesura de la proporció de seqüències idèntiques en una distribució mutant. Els possibles valors de l'entropia de Shannon (S_n) estan en el rang de 0 (quan tots els genomes són idèntics) a 1 (quan tots els genomes són diferents uns dels altres). Els resultats de l'entropia normalitzada van ser 0.8568 per la mostra A1; 1 per la mostra A2; 0.5331 per la mostra A3; 0.9298 per la mostra A4 i 0.9298 per la mostra B1; 0.7632 per la mostra B2; 0.8597 per la mostra B3; 1 per la mostra B4 (Figure 35), no trobant-se diferències significatives.

La divergència nucleotídica es pot definir com la distància d'una seqüència a la seqüència fundadora. La mitja de les distàncies nucleotídiques es van referir a la mostra A1. Aquests valors de divergència van ser 0.48 i 0.502 per la mostra A3 i A4, respectivament; 0.47, 0.48 i 0.44 per les mostres B1, B3 i B4, respectivament. No es van detectar diferències significatives entre els dos pacients ($p = 0.375$ [test de Wilcoxon]). El mateix paràmetre es va calcular utilitzant com a seqüència fundadora la seqüència

del possible clon de la mostra A1 causant de la infecció al pacient B. Els valors de divergència van ser 0.3 i 0.502 per les mostres A3 i A4, respectivament; 0.022, 0.4 i 0.6 per les mostres B1, B3 i B4, respectivament. Tampoc es van detectar diferències estadísticament significatives ($p= 0.375$ [test de Wilcoxon]).

Els resultats de diversitat viral en cadascun dels punts estudiats dels dos pacients són els esperables pel fet de tractar-se de pacients amb una infecció crònica pel VIH-1. A la figura 33 s'observa una major variabilitat en el plasma quan ho comparem amb l'ADN proviral. Aquest fet no es dona en el pacient A, podent ser la causa que la mostra de plasma i cèl.lules analitzades no van ser de la mateixa data. A l'analitzar la diversitat en la darrera interrupció s'observa en els dos pacients un increment d'aquesta a mesura que avança el temps sense presència de tractament, com a conseqüència de l'increment de replicació.

Factors de l'hoste.

Es va estudiar el genotip d'alguns dels marcadors genètics més rellevants dels dos pacients (taula 8). Els dos individus van presentar la delecció $\Delta 32$ en heterozigosi del gen CCR5 i van presentar el mateix genotip CCR2. El pacient A va presentar també un polimorfisme SDF-3'A, que consisteix en una mutació G→A a la posició 801 (comtant des del codó d'iniciació ATG) en la regió no codificadora 3' de la regió UTR que forma part del gen SDF-1. Respecta al genotip HLA, en cap dels dos pacients es va detectar homozigosi en l'HLA de classe I, el pacient A va presentar un genotip HLA AO1, A32, B1410, B15 i el del pacient B va ser A3101, A68, B4403, B51. De manera individual, els dos pacients presentaven al·lels descrits com a protectors (A32, B14, A68, B44, B51) (Carrington M, 2003).

Resposta Immunològica.

Per tal de determinar si la disminució espontània de la CV després de la interrupció del tractament estava associada amb una resposta immunològica cel.lular específica anti-VIH, es van mesurar tant la resposta

cel.lular T CD4 anti-VIH específica amb assaigs de limfoproliferació com la resposta T CD8 citotòxica anti-VIH amb l'ELISPOT.

Cap dels dos pacients presentava una resposta helper ni CTL basal (previ qualsevol tractament). Després de la segona interrupció del tractament, el pacient A va desenvolupar una resposta cel.lular T limfoproliferativa contra l'antigen p24 i una forta resposta CD8 contra els antigens Env, Pol, Gag i Nef del VIH-1 (Figura 17, pacient 72). Aquestes respostes es van mantenir durant el període d'interrupció del tractament, coincidint amb una disminució de la CV i un control d'aquesta durant una mitja de dos anys de seguiment sense reintroduir el tractament.

A la setmana 0, abans d'interrompre el tractament, el pacient B va presentar una baixa reactivitat CD8 contra el pèptid de restricció gag p24 B51 (NANPDCKTI). Aquesta resposta es va veure lleugerament incrementada durant la primera, segona i tercera interrupció. Durant la quarta i la cinquena interrupció, es va detectar un increment en la resposta cel.lular CD8 contra el mateix pèptid i contra el pèptid de restricció B44 de la regió RT del gen *pol* (EELRQHLLRW). En relació amb la resposta T CD4 específica contra el VIH-1, aquesta es va detectar debilment contra la proteïna p24 a la segona, quarta i cinquena interrupcions del tractament.

Taula 8. Característiques genotípiques dels hostes

	genotip HLA	genotip CCR5	genotip SDF-1	genotipCCR2
Pts A	A01, A32, B1401, B15	WT / Δ32	A / G	G / G
Pts B	A3101, A68, B4403, B51	WT / Δ32	G / G	G / G

RESULTATS OBJECTIU 3.

Amb l'objectiu de determinar el risc que poden representar les Interrupcions Estructurades del Tractament (IET), en pacients infectats pel VIH-1, en quant al desenvolupament de mutacions de resistència genotípica als antirretrovirals en el gen *pol*, es va estudiar un grup de 43 pacients amb infecció crònica pel VIH-1 descrits a material i mètodes.

Els punts estudiats van ser un total de 112 cicles, escollint la primera mostra de plasma amb càrrega vírica >1000 còpies/ml després de la interrupció del tractament. Per estudiar l'objectiu d'aquest treball és important escollir aquesta mostra i no la del pic del rebrot de càrrega vírica que es dona com a conseqüència de la interrupció del tractament, on tan sols observarem el virus amb major capacitat replicativa. Es va realitzar l'estudi de les mutacions de resistència genotípica a l'ADN proviral en aquells pacients on es van detectar mutacions de resistència en el plasma i es va disposar de mostra.

En aquest subestudi, a l'hora de valorar els resultats, els pacients es van agrupar segons el tractament antirretroviral durant el període de les IET:

- grup A (règim amb un ITIANN i dos ITIAN, n= 13).
- grup B (règim amb un IP i dos ITIAN, n= 22).

Grup A. Ningú dels pacients va presentar mutacions de resistència basals, prèvies al tractament. 3 dels 17 pacients van presentar mutacions de resistència al llarg de les IETs i que no havien estat prèviament detectades durant el període TARGA (taula 9):

- pacient 214HU (d4T+ddI+NVP+EFV+HU), va seleccionar de nou les mutacions: K103N i Y181C en els ITIANN i les mutacions L210W, T215Y en els ITIAN a la cinquena interrupció del tractament. També es va detectar en la primera interrupció formant part d'una població mixte, la mutació M184M/V que ja havia estat seleccionada abans de les IET, i la mutació V106V/A (figura 36a). L'estudi de l'ADN proviral no va ser possible per manca de mostra.

- pacient 168 (3TC+d4T+EFV), va seleccionar les mutacions: K101E/D, V108I i Y181C per els ITIANN i la mutació M184V pel 3TC a l'única interrupció detectan-se també en l'ADN proviral (figura 36b).
- pacient 201 (3TC+d4T+EFV) va seleccionar la mutació K103N pels ITIANN i la M184V pel 3TC. L'estudi de l'ADN proviral no va ser possible per manca de mostra.

Tot i que aquests pacients no estaven tractats amb IPs, en dos pacients es van detectar polimorfismes. En el moment basal en la regió del gen *pol* que codifica per la proteasa, L63P, que es va mantenir sense que es detectès l'aparició de nous polimorfismes al llarg dels cicles de les IET.

Taula 9. Pacients del grup A amb mutacions de resistència genotípiques. Resposta CV: els pacients van o no controlar la CV durant el període d'interrupció del tractament

Pacient	Setmana estudi	mostra	Càrrega vírica	Tractament	Mutacions TI	Mutacions PR	Responedors CV
214HU	0	plasma	5		WT	WT	
	-80	plasma	3	3TC+AZT d4T+ddI+NVP+EFV+HU	M184V	M46L	
	STOP1	plasma	3.46		V106V/A, M184V	WT	no
	STOP2	plasma	3.7		WT	WT	no
	STOP3	plasma	3.36		WT	WT	no
168DC	STOP4	plasma	3.3		WT	WT	no
	STOP5	plasma	3.8		K103N, Y181C, T215Y	WT	no
	0	plasma	3.93		WT	WT	
	-20	plasma	ND	no	WT	WT	
	-20	proviral	ND		WT	WT	
201	STOP1	plasma	2.9	3TC+d4T+EFV	K101E/D, V108I, Y181C, M184V	WT	si
	STOP1	proviral	ND		M184V	WT	si
201	0	plasma	2.9		WT	L63P	
	-20	plasma	4.2	no	WT	L63P	
	STOP1	plasma	5.04	3TC+d4T+EFV	K103N, M184V	L63P	si

Figures 36. Dinàmica de la CV i presència de mutacions de resistència en els diferents punts estudiats en plasma (ARN) i ADN proviral. El recuadre puntejat senyala els períodes de les IET on no hi ha tractament. Els punts estudiats estan marcat amb un cercle vermell. Les característiques d'aquests punts es detallen a la taula 9.

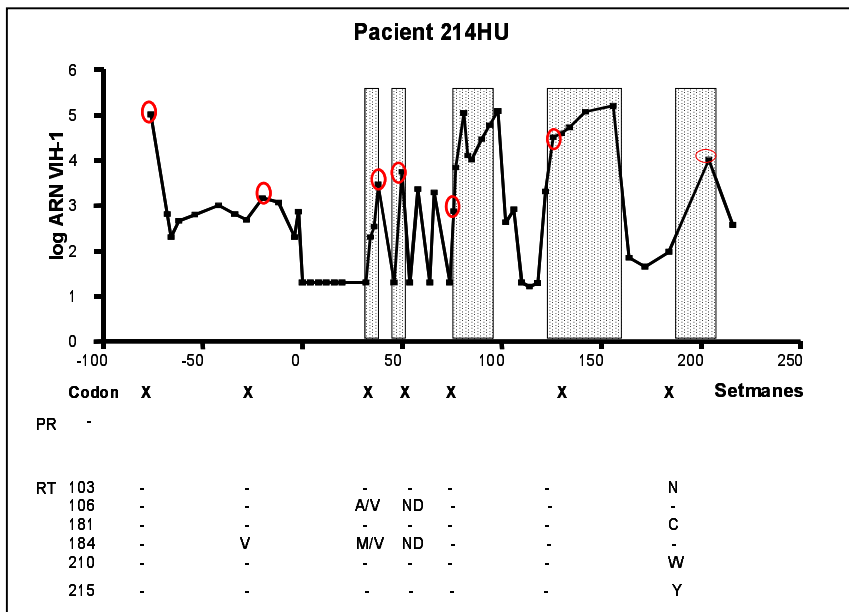


Figura 36a

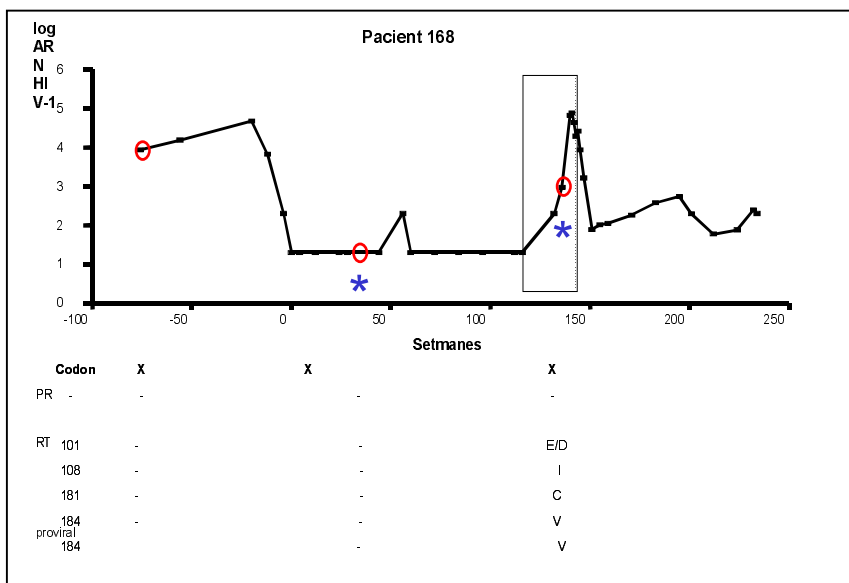


Figura 36b

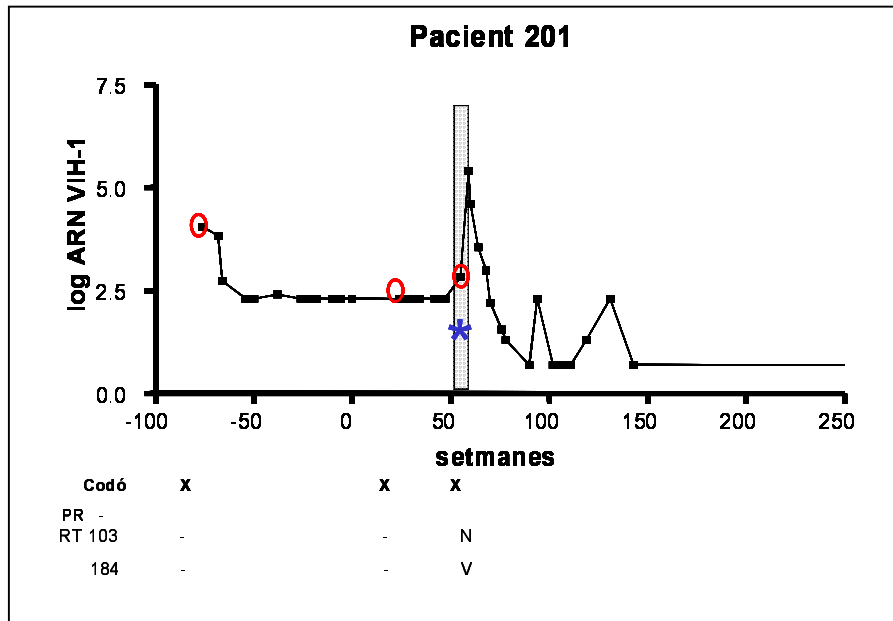


Figura 36c

Grup B. No es van detectar mutacions de resistència associades als IP en ningú dels pacients durant les IET. 8 pacients van presentar polimorfismes en la regió de la proteasa: L63P, A71V, L10I, K20R i M36I durant el període d'IET, polimorfismes que ja existien basalment, previ al tractament.

7 pacients (190AR, 246HU, 241HU, 224AR, 248AR, 191HU i 199HU) van presentar la mutació M184V en la RT previament a les IET i en 4 dels 7 pacients (190AR, 246HU, 241HU, 224AR) es va continuar detectant aquesta mutació durant els cicles de les IET:

- pacient 190AR: es manté la quasiespècie viral que té mutació M184V en cadascuna de les 5 IET a la que està sotmès (figura 37a). Aquest pacient també va presentar la mutació V179D en la cinquena interrupció, mutació que s'associa amb pacients que es tracten amb ITIANN, i que ja havia estat seleccionada previament a les IET.

- pacient 246HU: es manté la mutació M184V, en la primera i segona IET, i es torna a seleccionar a la cinquena interrupció, i no es detecta en l'ADN proviral d'aquesta cinquena interrupció (figura 37b). La no detecció de les mutacions en l'ADN proviral pot ser degut a la manca de sensibilitat de la tècnica o al fet de que únicament s'està estudiant un dels possibles reservoris del virus.
- pacient 241HU: la quasiespècie amb la mutació M184V no es torna a seleccionar fins a la quarta interrupció, detectant una població mixte M184M/V, que ja es detectava en l'ADN proviral de la tercera interrupció. A nivell de l'ADN proviral també es va detectar la mutació M41L a la segona interrupció (figura 37c).
- pacient 224AR: es va seleccionar la quasiespècie viral amb la mutació M184V, es va detectar a la primera i tercera interrupció i no es va poder obtenir resultats del genotipat de la mostra corresponent a la cinquena interrupció (figura 37 d).

Aquesta detecció intermitent de la mutació M184V al llarg de les interrupcions del tractament pot ser deguda a la mostra de plasma escollida per dur a terme l'estudi. La primera CV detectable després de la interrupció del tractament moltes vegades coincideix amb el pic de la CV. Sabem que la quasiespècie majoritària en el pic de la cv és la que té major capacitat replicativa i precisament la mutació M184V es caracteritza per reduir la capacitat replicativa dels virus. Aquest fet conjuntament amb la metodologia emprada, basada en la seqüenciació de la població majoritària, podria explicar, la detecció intermitent d'aquesta mutació.

En els tres pacients restants (248AR, 191HU, 199HU) no es va tornar a detectar la quasiespècie viral amb la mutació M184V que havia estat seleccionada previament abans d'iniciar les IET. No es va detectar la presència d'aquesta mutació a l'estudiar l'ADN proviral d'aquells pacients en que es va poder determinar, 248AR i 191HU. En un dels pacients, 248AR, es va detectar en la mostra d'ADN proviral la mutació M179I, polimorfisme associat als ITIANN (figura 37 e, f, g).

Les diferències trovades en relació a la presència prèvia de la mutació M184V entre el dos grups (Grup A: 1/17; Grup B: 7/26), són una conseqüència dels diferents protocols de tractament en el que van estar sotmesos aquests pacients previament a les IETs.

Taula 10. Pacients del grup B amb mutacions de resistència genotípiques. Resposta CV: els pacients van o no controlar la CV durant el període d'interrupció del tractament

Pacient	Setmana d'estudi	mostra	Càrrega vírica	Tractament	Mutacions TI	Mutacions PR	Resposta CV
190AR	0	plasma	4.6		V179D	L63L/P	
	-80	plasma	3.3	AZT+ddl+IDV D4T+ddl+NFV	V179V/D,M184V	WT	
	STOP1	plasma	4.2		M184MV	WT	NO
	STOP2	plasma	3.3		M184MV	L63L/P	NO
	STOP3	plasma	3.5		M184MV	L63L/P	NO
246HU	0	plasma	4.4		V118V/I,M184M/V	L63L/P	NO
	-80	plasma	5.2		V179D,M184MV		NO
	0	plasma	4	3TC+d4T	WT	K20R/M36I	
	STOP1	plasma	ND	D4T+ddl+IDV+HU	M184V	K20R/M36I	SI
	STOP2	plasma	4.04		M184V	K20R/M36I	SI
241HU	0	plasma	2.87		WT	K20R/M36I	SI
	-80	plasma	3.3		WT	K20R/M36I	SI
	STOP1	plasma	2.9		M184V	K20R/M36I	SI
	STOP2	proviral	5.05		WT	WT	
	STOP3	plasma	3.4	3TC+d4T	WT	WT	
224AR	0	plasma	5	D4T+ddl+NFV+HU	M184MV	ND	
	-80	plasma	4.96		WT	WT	SI
	STOP1	plasma	4.88		WT	WT	SI
	STOP2	proviral	3.88		M41L	WT	SI
	STOP3	Plasma	4.48		WT	WT	SI
248AR	0	plasma	3.88		M184V	WT	SI
	-80	plasma	4.48		WT	WT	SI
	STOP1	plasma	4.86	3TC+AZT ; 3TC+d4T	WT	WT	SI
	STOP2	plasma	3.4	3TC+d4T+ddl+IDV	M184V	WT	
	STOP3	plasma	3.24		M184V	WT	SI
191HU	0	plasma	4.25		ND	WT	SI
	-80	plasma	3.05		M184V	WT	SI
	STOP1	plasma	3.18		WT	WT	SI
	STOP2	plasma	3.62		ND	WT	SI
	STOP3	plasma	4.17	3TC+d4T ; AZT+ddl+IDV AZT+3TC+HDV(AZT+3TC+ABC)	WT	L63P	
199HU	0	plasma	2.95		M184V	ND	
	-80	plasma	2.96		WT	L63P	SI
	STOP1	plasma	3.95		WT	L63P	SI
	STOP2	plasma	3.77		WT	L63P	SI
	STOP3	Proviral	3.94		179I	WT	SI
191HU	0	Plasma	3.94		WT	L63P	SI
	-80	Plasma	3.37		WT	L63P	SI
	STOP1	proviral	4.3	3TC+d4T+IDV+NFV+RTV d4T+ddl+NFV	WT	WT	SI
	STOP2	plasma	ND		M184V	WT	
	STOP3	plasma	2.88		WT	WT	SI
199HU	0	plasma	3.69		WT	WT	SI
	-80	plasma	4.15		WT	WT	SI
	STOP1	plasma	3.35		WT	WT	SI
	STOP2	proviral	3.7		WT	WT	SI
	STOP3	plasma	4.24		WT	WT	SI
199HU	0	plasma	3.16	3TC+AZT	WT	L63P	SI
	-80	plasma	3.16	d4T+ddl+IDV+NFV+HU	M184V	ND	
	STOP1	plasma	4.9		WT	L63P	SI
199HU	0	plasma	4.64		WT	L63P	SI
	STOP2	plasma	3.38		WT	L63P	SI

Taula 10. Continuació

Pacient	Setmana d'estudi	mostra	Càrrega vírica	Tractament	Mutacions TI	Mutacions PR	Resposta CV
4 STI	0	Plasma	37		WT	WT	
	0	Proviral	37		WT	WT	
	-80	Plasma	3.12	3TC+d4T+RTV 3TC+d4T+NfV	WT	ND	
	STOP1	Plasma	31		M184M/V	WT	SI
	STOP1	Plasma	42		WT	WT	SI
	STOP2	Plasma	36		M184V	WT	SI
	STOP2	Plasma	44		WT	WT	SI
	STOP3	Plasma	29		ND	WT	SI
	STOP3	Plasma	48		WT	WT	SI
211 STI	0	Plasma	36		WT	WT	
	0	Proviral	36		WT	WT	
	-80	Plasma	3.28	3TC+d4T+RTV 3TC+d4T+RTV	WT	ND	
	STOP1	Plasma	36		ND	WT	SI
	STOP1	Plasma	48		WT	WT	SI
	STOP2	Plasma	36		M184V	WT	SI
	STOP2	Plasma	47		WT	WT	SI
	STOP3	Plasma	47		M184V	WT	SI
	STOP3	Plasma	43		WT	WT	SI

Figures 37. Dinàmica de la CV i presència de mutacions de resistència en els diferents punts estudiats en plasma (ARN) i ADN proviral. El recuadre puntejat senyala els períodes de les IET on no hi ha tractament. Els punts estudiats estan marcats amb un cercle vermell. Les característiques d'aquests punts es detallen a la taula 10.

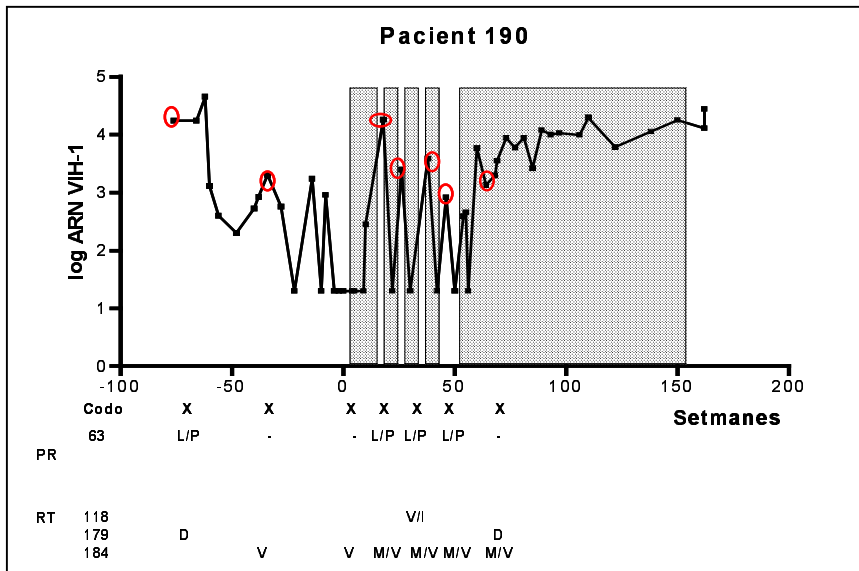


Figura 37a.

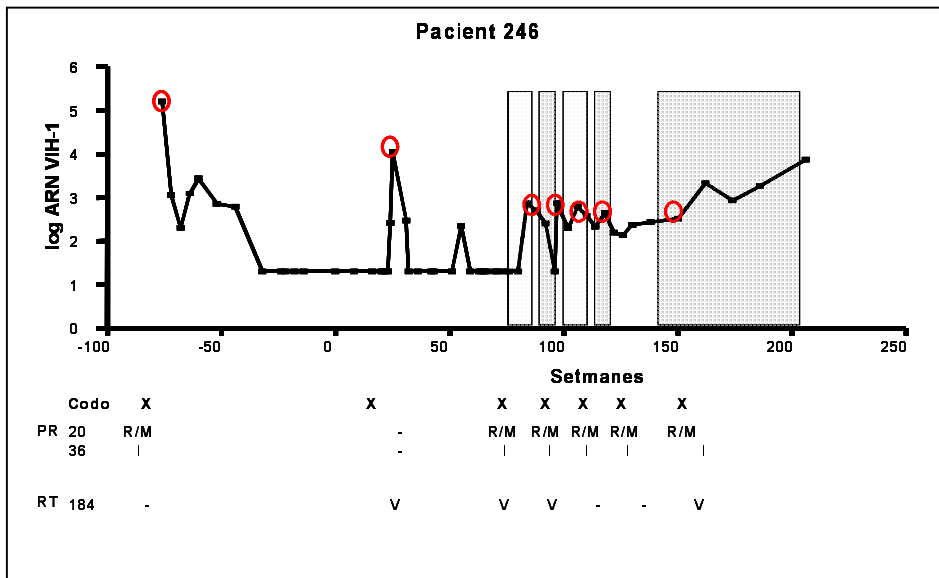


Figura 37b.

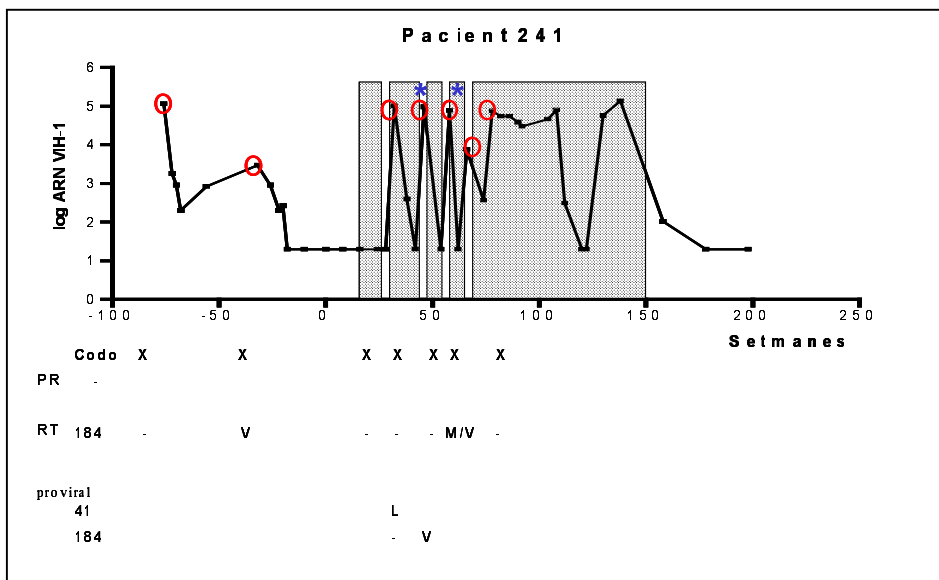


Figura 37c.

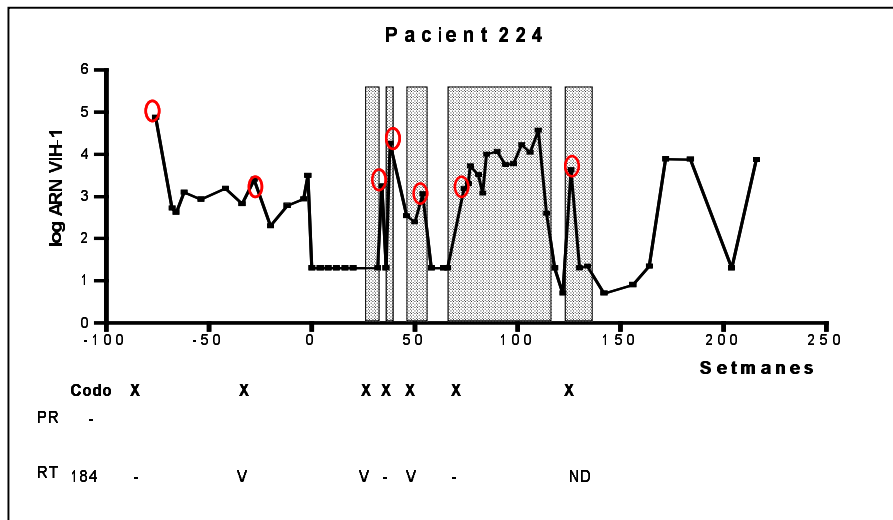


Figura 37d.

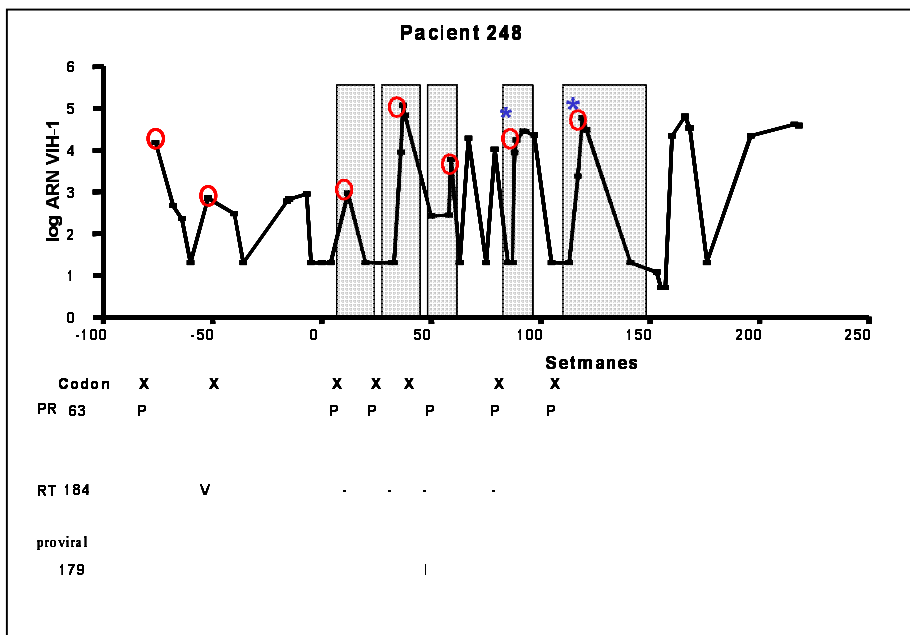


Figura 37e

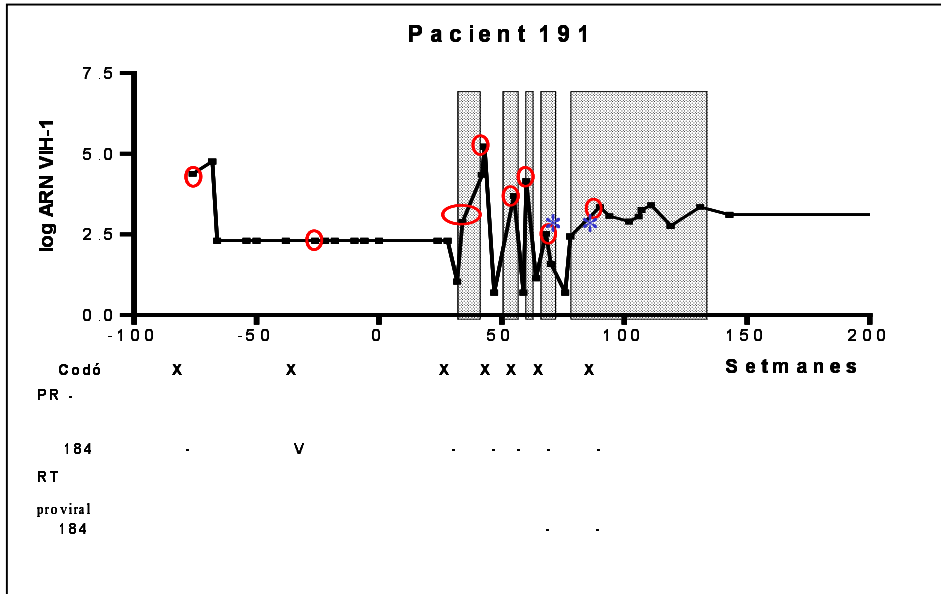


Figura 37f

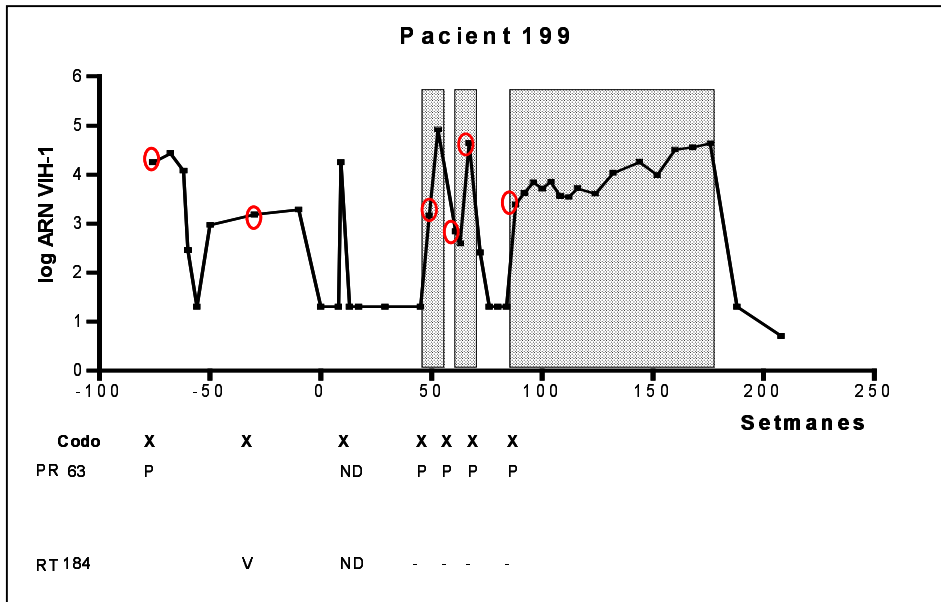


Figura 37g.

En dos dels 43 pacients (pacients 4 i 211), la mutació M184V es va seleccionar de novo durant les IET, en la primera i segona interrupció en el pacient 4 i en la segona i tercera interrupció en el pacient 211 (taula 10). Cap dels dos pacients presentava la mutació en l'ADN proviral de la mostra prèvia a l'inici de les IET. En les interrupcions que es tenien dues determinacions, no es van detectar mutacions en la determinació que es va fer en el pic, tot i haver-se detectat a l'inici del rebrot de la CV. S'ha de remarcar que els dos pacients tenien un baix valor de compliment i que tots els pacients prenen 3TC (figura 38 a, b).

Figures 38. Dinàmica de la CV i presència de mutacions de resistència en els diferents punts estudiats en plasma (ARN) i ADN proviral. Els punts situats a l'interior del recuadre puntejat són els períodes de les IET on no hi ha tractament. Els punts estudiats estan marcat amb un cercle vermell. Les característiques d'aquets punts es detallen a la taula 10. L'asterisc blau assenyalava la mostra on s'estudia l'ADN proviral

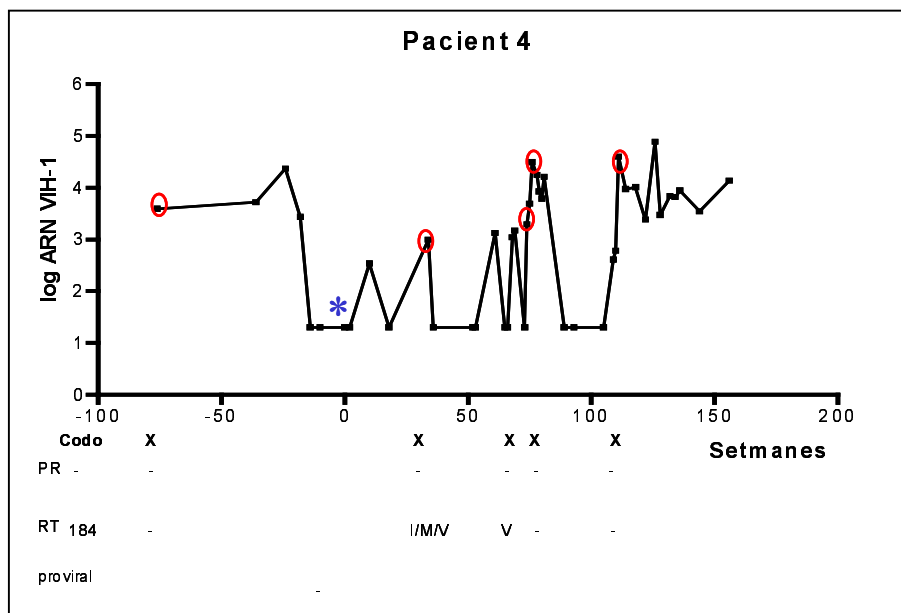
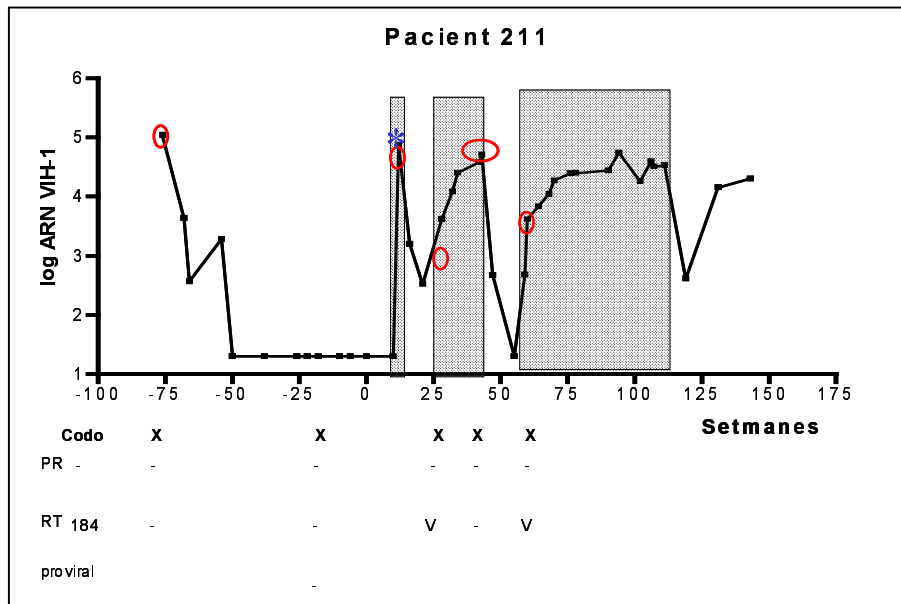


Figura 38^a

**Figura 38b**

- *El risc de desenvolupar mutacions de resistència.* El risc global de desenvolupar mutacions de resistència de nou durant les IET va ser del 12% (95% CI: 6-21). El risc de desenvolupar resistències per pacient va ser del 17.7% pel grup A i del 7.7% pel grup B. Al calcular el risc de desenvolupar resistències per cicle d'interrupció estructurada del tractament, el risc va ser significativament més important en el grup A 44% (95% CI: 21-69) que en el grup B 3% (95% CI: 0.4-11) (risc relatiu 13.2 (95% CI= 3-57, $p < 0.0001$).

Les mutacions de resistència no es van anar acumulant al llarg de les IET en cap dels grups, amb l'excepció del pacient 214HU del grup A (pacient 168) que va presentar una població mixta de virus per la mutació V106V/A a la primera interrupció, no va mantenir aquesta mutació al llarg de les IET, però sí que va incrementar el seu patró de mutacions de resistència a la cinquena interrupció (Taula 9).