

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE ESTÍMULOS INMUNOLÓGICOS REPETIDOS
EN FORMA DE UN CALENDARIO VACUNAL EN PACIENTES ADULTOS
INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN
ESTADIOS TEMPRANOS DE LA INFECCIÓN (CON TRATAMIENTO
ANTIRRETROVIRAL Y TRAS SU SUSPENSIÓN)**

Tesis presentada por

Pedro Castro Rebollo

Para optar al grado de Doctor en Medicina

Directores de la tesis: Doctor Felipe García Alcaide y Doctora Montserrat Plana Prades

Tutor: Doctor Josep Maria Gatell Artigas

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

2006

El Doctor FELIPE GARCÍA ALCAIDE, profesor asociado de la Facultat de Medicina de la Universidad de Barcelona, Médico Consultor del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínic de Barcelona, la Doctora MONTSERRAT PLANA PRADES, investigadora asociada del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínic de Barcelona, y el Doctor JOSEP MARIA GATELL ARTIGAS, profesor titular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona, Jefe de Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínic de Barcelona:

CERTIFICAMOS que la memoria titulada **“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE ESTÍMULOS INMUNOLÓGICOS REPETIDOS EN FORMA DE UN CALENDARIO VACUNAL EN PACIENTES ADULTOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN ESTADIOS TEMPRANOS DE LA INFECCIÓN (CON TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL Y TRAS SU SUSPENSIÓN)”** presentada por Pedro Castro Rebollo, se ha realizado bajo nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones necesarias para ser defendida delante del Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dr. Felipe García Alcalde (co-director)

Dra. Montserrat Plana Prades (co-directora)

Dr. Josep Maria Gatell Artigas (tutor)

A Maite, por todo y más

A Pau, pel futur que ens espera

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haber creído siempre en mí y haberme permitido llegar hasta aquí.

A todos los pacientes que han hecho posible este trabajo, confiando en que algún día conseguiremos por fin “curarlos”.

A Felipe García, alma y motor de esta tesis, y de tantos otros proyectos, además de buen consejero y ejemplo a seguir en la vida.

A Montse Plana, bona amiga, l'autèntica responsable de la part experimental d'aquesta tesi i del meu interès pel laboratori.

A Josep Maria Gatell, per tutelar aquesta tesi i per fer-me sentir “algú” al Servei de Malalties Infeccioses de l'Hospital Clínic.

A José Maria Nicolás, por confiar en mí, y dejarme compaginar la elaboración de esta tesis con mi trabajo asistencial. Gracias Nico, espero aprender mucho de ti.

A Anna Colomé, per escoltar.-me i ajudar-me quan ho necessito.

A todo el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínic, incluyendo médicos, enfermería, auxiliares y administrativas (gràcies sobretot Maria Antonia, Àlex y José Luís), tanto en la sala de hospitalización, como en Hospital de Día y en Consultas Externas.

A los compañeros de la Unidad de Investigación del SIDA, sobre todo Mireia, Sonsoles, Harold, Nuria, Cristina, Laura y Teresa, por su desinteresada colaboración para que comprendiese mejor la inmunopatología de la infección por el VIH.

A Anna López, la meva “cicerone” i fidel amiga al laboratori.

También a las “chicas del laboratorio” María José, Ana, Maite, Carmen, Cristina, Txell, Esther y Laia. Sin ellas, este trabajo no hubiese sido posible.

Al personal del Centro de Vacunaciones del Hospital Clínic, por su colaboración en la administración del programa vacunal de los pacientes.

A Bea de Felipe, Álex Vallejo y todo el equipo del Dr. Manuel Leal del Hospital Virgen del Rocío, por enseñarme a determinar los *TRECs*, y por los buenos ratos pasados en Sevilla.

Al personal del Servicio de Microbiología del Hospital Clínic, adjuntos y técnicos, sobre todo a los doctores Pumarola y Costa, por la ayuda prestada de forma desinteresada en la realización e interpretación de los resultados de las serologías.

A todo el personal del Área de Vigilancia Intensiva del Hospital Clínic, que me ha “mimado” para que esta tesis pudiese salir adelante.

A todos mis compañeros del Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínic, adjuntos y residentes, enfermería, auxiliares y administrativas, que me han ayudado a formarme como médico y persona, y espero que continúen haciéndolo. Mención especial merecen mis compañeros de promoción David, Edu y Gisela, mis “R” mayores Víctor, Gloria, Gabriel, Maite y Nico, y los doctores Bové, Grau, Coca y López Soto.

A Joan Bladé pels seus savis consells.

Al Hospital Clínic en general, por permitirme llevar a cabo este proyecto, sobre todo con el Premio Fin de Residencia.

A mi familia y amigos, fundamentalmente a mi hermana Marisa, por aguantar mis “ausencias” porque estaba ocupado con guardias o “haciendo la tesis”. Espero que sepan perdonarme.

Y a todos aquellos que de una u otra forma ha colaborado en mi tránsito por la vida hasta la fecha, permitiéndome disfrutar de ella con su compañía.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADVP	Adicto a drogas por vía parenteral
ALAT	Alaninoaminotransferasa
AMPLISPOT	Técnica para amplificar los resultados del ELISPOT
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASAT	Aspartato aminotransferasa
AUC	“Area under the curve” (área bajo la curva, neta)
AZT	Zidovudina
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
CAF	“Cellular antiHIV factor” (factor celular antiVIH)
CCID₅₀	“culture infectious dose 50” (dosis 50 infecciosa en cultivo celular)
CD	Células dendríticas
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention” (centro de vigilancia epidemiológica de los Estados Unidos de Norteamérica)
Ci	Curio (unidad de radiactividad)
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CMV	Citomegalovirus
col.	Colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
CTL	“Cytotoxic T lymphocyte” (linfocito T citotóxico o respuesta citotóxica)
CV	Carga viral (plasmática si no se indica lo contrario)
Da	Dalton (unidad de peso molecular); kDa : kilodalton
DHHS	“Department of Health and Human Services” (departamento de salud de los Estados Unidos de Norteamérica)
DT	Desviación típica
EDTA	Ácido tetraacético de etilendiamina
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay” (análisis de inmunoabsorción vinculado a enzimas)
ELISPOT	“Enzyme-linked immunospot”
ETR	Emigrantes tímicos recientes
EVI	Episodio de viremia intermitente
FDA	“Food and Drug Administration” (Agencia norteamericana del medicamento)

GD	Grupo detectable con $CV \geq 200$ copias/mL
GD₂₀	Grupo detectable con $CV \geq 20$ copias/mL
GGT	Gammaglutamiltranspeptidasa
GI	Grupo indetectable con $CV < 200$ copias/mL
GI₂₀	Grupo indetectable con $CV < 20$ copias/mL
GM-CSF	“Granulocyte and monocyte colony-stimulating factor” (factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas)
GP	Grupo placebo
GV	Grupo vacunado
HBcAg	Antígeno del core del virus hepatitis B
HBsAg	Antígeno de superficie del virus hepatitis B
HLA	“Human lymphocyte antigen” (antígenos de histocompatibilidad)
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IL-7R	Receptor de la IL-7
IP	Inhibidor de la proteasa
ITIAN	Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de los nucleótidos/nucleósidos
ITINAN	Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de los nucleótidos
LTNP	“Long-term non-progressors” (no progresores a largo plazo)
MALT	“Mucosa-associated lymphoid tissue” (tejido linfoide asociado a mucosas)
MHC	“Major histocompatibility complex” (complejo mayor de histocompatibilidad)
mL	Mililitro
mm³	Milímetro cúbico
NCCLS	“National Committee for Clinical Laboratory Standards”
NK	“Natural killer” (células asesinas innatas)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PHA	“Phytohemagglutinin” (fitohemaglutinina)
PWM	“Pokeweed mitogen” (mitógeno pokeweed)
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Riesgo relativo
RT-PCR	“Reverse transcriptase polymerase chain reaction” (reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa)
SFC	“Spots forming cells” (células formadoras de <i>spots</i>)
SI	“Stimulation index” (índice de estimulación)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIV	“Simian immunodeficiency virus” (virus de la inmunodeficiencia de los simios)
STI	“Structured treatment interruption” (interrupción estructurada de tratamiento)
TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TC	Tomografía computerizada
T_{CM}	Células T memoria centrales
TCR	“T-cell receptor” (receptor-es de las células T)
Td	Tétanos-difteria (vacuna)
TRECs	“T-cell receptor excision circles” (círculos de escisión del receptor de células T)
T_{EM}	Células T memoria efectoras
UI	Unidades Internacionales
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPBN	Viremia persistente de bajo nivel
VVZ	Virus varicela zoster

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1. INMUNOPATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO I (VIH-1)	3
1.1. Introducción	3
1.2. Ciclo biológico del VIH	3
1.3. Patogenia	4
1.3.1. Infección aguda	5
1.3.2. Infección crónica	7
1.3.2.1. Efecto citopático directo	7
1.3.2.2. Estado de activación crónica	7
1.3.2.3. Mecanismos inmunitarios	8
1.3.2.4. Apoptosis	9
1.3.2.5. Bloqueo de la regeneración linfocitaria	9
1.3.2.6. Fenómenos de redistribución	9
1.4. Respuesta inmune contra el VIH	9
1.4.1. Respuesta humoral	10
1.4.2. Respuesta celular	10
1.4.3. Factores solubles	11
1.4.4. Cronología de la respuesta inmune	12
1.5. Respuestas al tratamiento antirretroviral	13
1.5.1. Efectos sobre la carga viral	13
1.5.2. Efectos sobre los linfocitos. Repoblación celular	14
1.5.3. Efecto sobre las respuestas inmunes celulares contra el VIH	15
1.6. Terapias inmunomediadas en el tratamiento de la infección por VIH	16

1.6.1. Fundamentos	16
1.6.2. Vacunas terapéuticas	18
1.6.3. Citocinas	18
1.6.4. Inmunoterapia pasiva	20
1.6.5. Inmunomoduladores	20
1.6.6. Interrupciones estructuradas del tratamiento (STI)	22
1.7. Interrupciones del TARGA	23
1.7.1. Estrategias de interrupción	23
1.7.2. Consecuencia de las interrupciones	24
2. VACUNACIÓN EN EL PACIENTE ADULTO CON INFECCIÓN POR EL VIH	27
2.1. Introducción	27
2.2. Definiciones	27
2.3. Clasificación de las vacunas	27
2.4. Vacunación del adulto	30
2.4.1. Causas de vacunación del adulto	30
2.4.2. Vacunas recomendadas a adultos	32
2.4.2.1. Vacuna de la hepatitis A	32
2.4.2.2. Vacuna de la hepatitis B	34
2.4.2.3. Vacuna de la gripe	36
2.4.2.4. Vacuna de la varicela	38
2.4.2.5. Vacuna de sarampión-rubéola-parotiditis	39
2.4.2.6. Vacuna de neumococo	40
2.4.2.7. Vacuna de difteria y tétanos	42
2.4.2.8. Otras vacunas recomendadas	43
2.5. Contraindicaciones generales de las vacunas	45
2.6. Bases inmunológicas de las vacunaciones	45

2.6.1. Inducción de respuestas vacunales	46
2.6.2. Respuesta celular a la administración de vacunas	46
2.6.3. Medición de respuestas vacunales	48
2.7. Vacunación en el adulto infectado por el VIH	49
2.7.1. Generalidades de la vacunación en el paciente infectado por el VIH	49
2.7.2. Alteración de la respuesta vacunal en el paciente infectado por el VIH	50
2.7.3. Potenciales riesgos de la vacunación derivados de la inmunosupresión	52
2.7.4. Potenciales riesgos de la vacunación sobre la propia infección por el VIH	53
2.7.5. Efectos potencialmente beneficiosos de la vacunación sobre la propia infección por el VIH	54
2.7.6. Vacunas específicas en el paciente infectado por el VIH	56
2.7.6.1. Hepatitis A	57
2.7.6.2. Hepatitis B	58
2.7.6.3. Gripe	61
2.7.6.4. Varicela	64
2.7.6.5. Triple vírica (sarampión-rubéola-parotiditis)	66
2.7.6.6. Neumococo	68
2.7.6.7. Tétanos-difteria	70
2.7.6.8. Otras	71
3. EPISODIOS DE VIREMIA INTERMITENTE EN EL PACIENTE CON INFECCIÓN POR VIH BAJO TARGA	75
3.1. Introducción	75
3.2. Reservorio viral	75
3.3. Supresión de la replicación viral con el TARGA	76
3.4. Definiciones	77
3.4.1. “ <i>Blip</i> ” o episodio de viremia intermitente	77

3.4.2. Fracaso	81
3.4.3. Viremia persistente de bajo nivel	81
3.5. Fisiopatología de los episodios de viremia intermitente	82
3.5.1. Falsos EVI o “ <i>pseudoblips</i> ”	82
3.5.1.1. Introducción	82
3.5.1.2. Fluctuación biológica aleatoria y variación estadística del método	83
3.5.1.3. Artefactos del procesamiento de muestras	84
3.5.2. EVI “reales”	84
3.5.2.1. Activación de células infectadas en reposo	84
3.5.2.2. Disminución de la inhibición de la replicación	85
3.6. Factores asociados a los episodios de viremia intermitente	86
3.6.1. Parámetros demográficos	86
3.6.2. Recuento de linfocitos T CD4 ⁺ y diferentes subpoblaciones celulares	86
3.6.3. Carga viral	87
3.6.4. Estadio de la infección por el VIH: primoinfección vs infección crónica	87
3.6.5. Tipo de tratamiento antirretroviral	88
3.6.6. Adherencia	89
3.6.7. Otros	89
3.7. Características de los EVI	90
3.7.1. Frecuencia	90
3.7.2. Duración	91
3.7.3. Amplitud	91
3.8. Consecuencia de los EVI	92
3.8.1. Sobre el sistema inmune	92
3.8.2. Sobre la evolución viral	93
3.8.3. Sobre el fracaso virológico	94

3.8.4. Sobre la evolución tras la suspensión del tratamiento	95
3.9. Viremia persistente de bajo nivel	95
4. PAPEL DEL TIMO EN LA INFECCIÓN POR EL VIH	99
4.1. Introducción	99
4.2. Estudio funcional del timo	101
4.2.1. TC del timo	102
4.2.2. Estudio del inmunofenotipo	102
4.2.3. Determinación de <i>TRECs</i>	103
4.2.4. Otros	105
4.3. Infección por el VIH y timo	105
4.3.1. Influencia de la infección tímica por el VIH sobre la depleción linfocitaria	106
4.3.2. Influencia del timo en la repoblación celular en la infección por el VIH	107
4.3.3. Influencia del timo en las respuestas discordantes al TARGA	108
4.3.4. Relación entre EVI y timo	109
4.3.5. Papel del timo en las interrupciones del TARGA	109
4.3.6. Terapéuticas en la infección por el VIH con potenciación de la función tímica	110
4.3.6.1. IL-2	110
4.3.6.2. Hormona del crecimiento	111
4.3.6.3. IL-7	111
5. PAPEL DE LA INTERLEUCINA 7 EN LA INFECCIÓN POR EL VIH	113
5.1. Introducción	113
5.2. Fisiología de la IL-7	113
5.2.1. Estructura y origen	113
5.2.2. Funciones	114
5.2.3. Regulación	116

5.3. Receptor de la IL-7	116
5.4. Papel de la IL-7 en la infección por el VIH	117
5.4.1. IL-7 y homeostasis linfocitaria en la infección por el VIH	117
5.4.2. IL-7 y replicación viral	119
5.4.3. Papel del receptor de la IL-7 en la infección por el VIH	119
5.5. Potencial terapéutico de la IL-7 en la infección por el VIH	120
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	123
1. FUNDAMENTO DEL ESTUDIO	125
2. HIPÓTESIS	133
3. OBJETIVOS	135
3.1. Principal	135
3.2. Secundarios	136
4. INTERÉS Y ACTUALIDAD DEL TEMA DE LA TESIS	139
PACIENTES Y MÉTODOS	143
1. INTRODUCCIÓN	145
2. PACIENTES	149
2.1. Criterios de elegibilidad	149
2.1.1. Criterios de inclusión	149
2.1.2. Criterios de exclusión	150
2.1.3. Justificación del perfil de los pacientes incluidos	150
2.2. Tamaño muestral	151
2.3. Inclusión y randomización	151
3. MÉTODOS	153
3.1. Consideraciones éticas	153
3.2. Esquema general del estudio	154

3.3. Grupos	156
3.4. TARGA	156
3.5. Vacunas	157
3.5.1. Calendario vacunal	157
3.5.2. Justificación de las vacunas utilizadas	159
3.6. Placebo	159
3.7. Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas	159
3.7.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica	160
3.7.2. Obtención de plasma	161
3.7.3. Obtención de suero	161
3.8. Estudio de la replicación viral	162
3.9. Estudio de la aparición de resistencias	162
3.10. Estudio de las subpoblaciones celulares linfocitarias T	163
3.11. Estudio de la respuesta proliferativa T (CD4⁺)	166
3.12. Estudio de las respuestas CD8⁺ específicas anti-VIH	168
3.13. TC mediastínica para medición del volumen tímico	170
3.14. Determinación de subpoblaciones de células T <i>naïve</i> en proliferación	172
3.15. Determinación de células portadoras de <i>TRECs</i>	174
3.16. Determinación de concentraciones séricas de IL-7	178
3.17. Determinación del receptor de la IL-7 (IL-7R)	181
3.18. Estudio de la respuesta humoral a antígenos vacunales	182
3.18.1. Virus hepatitis A	184
3.18.2. Virus hepatitis B	184
3.18.3. Varicela	185
3.18.4. Parotiditis	185
3.18.5. Rubéola	186
3.18.6. Sarampión	187

3.18.7. Neumococo	187
3.18.8. Tétanos	189
3.18.9. Difteria	189
3.19. Estudio de la respuesta celular a antígenos vacunales	190
3.19.1. Medición de respuesta celular mediante ELISPOT	191
3.19.2. Medición de respuesta celular mediante AMPLISPOT	195
3.19.3. Problemas de la interpretación de la respuesta celular	195
3.20. Tipaje HLA de alta resolución	197
3.21. Análisis estadístico	198
RESULTADOS	201
1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE UN CALENDARIO VACUNAL SOBRE LA CARGA VIRAL Y EL SISTEMA INMUNITARIO EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH CON TARGA DURANTE EL TRATAMIENTO Y TRAS SU INTERRUPCIÓN	203
1.1. Generalidades del estudio	203
1.2. Características basales de los pacientes	204
1.2.1. Características demográficas y epidemiológicas	204
1.2.2. Características generales relacionadas con la infección por el VIH	204
1.2.3. Características virológicas	208
1.2.4. Características inmunológicas	208
1.2.4.1. Subpoblaciones linfocitarias	208
1.2.4.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	209
1.2.4.3. Respuestas linfoproliferativas	210
1.2.4.4. Respuestas celulares CD8 ⁺ específicas frente al VIH	210
1.2.5. Función tímica	211
1.2.6. Sistema IL-7/IL-7R	213
1.2.7. Historia de exposición antigénica	214

1.2.7.1. Hepatitis A	214
1.2.7.2. Hepatitis B	215
1.2.7.3. Gripe	216
1.2.7.4. Varicela	217
1.2.7.5. Parotiditis	218
1.2.7.6. Rubéola	219
1.2.7.7. Sarampión	219
1.2.7.8. Neumococo	220
1.2.7.9. Tétanos	221
1.2.7.10. Difteria	222
1.3. Cambios durante el periodo vacunal	223
1.3.1. Efectos sistémicos o locales asociados al calendario vacunal	223
1.3.2. Efectos del calendario vacunal sobre la carga viral	223
1.3.2.1. Generalidades	223
1.3.2.2. Cargas virales detectables con límite de detectabilidad de 200 copias/mL	224
1.3.2.3. Cargas virales detectables con límite de detectabilidad de 20 copias/mL	229
1.3.2.4. Cambios de tratamiento antirretroviral	235
1.3.3. Efectos del calendario vacunal sobre el sistema inmune	236
1.3.3.1. Subpoblaciones linfocitarias	236
1.3.3.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	246
1.3.3.3. Respuestas linfoproliferativas	247
1.3.3.4. Respuestas CD8 ⁺ específicas frente al VIH	252
1.3.4. Efectos del calendario vacunal sobre la función tímica	256
1.3.4.1. Copias de <i>TRECs</i>	256
1.3.4.2. Tejido tímico	256
1.3.4.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo <i>naïve</i>	257

1.3.5. Efectos del calendario vacunal sobre el sistema IL-7/IL-7R	259
1.3.5.1. Niveles séricos de IL-7	259
1.3.5.2. Expresión de IL-7R	259
1.3.6. Efectos del calendario vacunal sobre las respuestas a los antígenos vacunales	262
1.3.6.1. Respuesta a VHA	262
1.3.6.2. Respuesta a VHB	265
1.3.6.3. Respuesta a gripe	269
1.3.6.4. Respuesta a varicela	271
1.3.6.5. Respuesta a parotiditis	274
1.3.6.6. Respuesta a rubéola	277
1.3.6.7. Respuesta a sarampión	279
1.3.6.8. Respuesta a neumococo	282
1.3.6.9. Respuesta a tétanos	285
1.3.6.10. Respuesta a difteria	288
1.4. Cambios tras la interrupción del tratamiento	290
1.4.1. Generalidades	290
1.4.2. Cambios en la carga viral	290
1.4.2.1. Rebote viral	290
1.4.2.2. Mutaciones en el virus de rebote	293
1.4.3. Cambios en el sistema inmune	294
1.4.3.1. Subpoblaciones linfocitarias	294
1.4.3.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	308
1.4.3.3. Respuestas linfoproliferativas	309
1.4.3.4. Respuestas CD8 ⁺ específicas frente al VIH	314
1.4.4. Cambios en la función tímica	317
1.4.4.1. Copias de <i>TRECs</i>	317
1.4.4.2. Tejido tímico	320

1.4.4.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo <i>naïve</i>	320
1.4.5. Cambios en el sistema IL-7/IL-7R	320
1.4.5.1. Niveles séricos de IL-7	320
1.4.5.2. Expresión de IL-7R	320
1.4.6. Cambios en las respuestas a los antígenos vacunales	323
1.4.6.1. Respuesta a VHA	323
1.4.6.2. Respuesta a VHB	325
1.4.6.3. Respuesta a gripe	327
1.4.6.4. Respuesta a varicela	327
1.4.6.5. Respuesta a parotiditis	327
1.4.6.6. Respuesta a rubéola	329
1.4.6.7. Respuesta a sarampión	329
1.4.6.8. Respuesta a neumococo	331
1.4.6.9. Respuesta a tétanos	333
1.4.6.10. Respuesta a difteria	335
1.5. Resumen del Estudio (apartado 1)	336
1.5.1. Características basales	336
1.5.2. Cambios durante el periodo vacunal	337
1.5.3. Cambios tras la interrupción	338
2. SUBESTUDIO A: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE EPISODIOS DE CARGA VIRAL DETECTABLE SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE EL TARGA Y TRAS SU INTERRUPCIÓN	339
2.1. Introducción	339
2.2. Subestudio A1: Estudio de la influencia de episodios de carga viral detectable ≥ 200 copias/mL sobre el sistema inmunitario y la replicación viral durante el TARGA y tras su interrupción	339
2.2.1. Características epidemiológicas basales	339
2.2.2. Características virológicas basales y evolución de la replicación viral	341
2.2.3. Características del sistema inmune basales y evolución	346

2.2.3.1. Subpoblaciones linfocitarias	346
2.2.3.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	361
2.2.3.3. Respuestas linfoproliferativas	364
2.2.3.4. Respuestas CD8 ⁺ específicas frente al VIH	369
2.2.4. Cambios en la función tímica	373
2.2.4.1. Copias de <i>TRECs</i>	373
2.2.4.2. Tejido tímico	376
2.2.4.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo <i>naïve</i>	376
2.2.5. Cambios en el sistema IL-7/IL-7R	376
2.2.5.1. Niveles séricos de IL-7	376
2.2.5.2. Expresión de IL-7R	378
2.2.6. Influencia en las respuestas a los antígenos vacunales	379
2.2.6.1. Respuesta a VHA	379
2.2.6.2. Respuesta a VHB	382
2.2.6.3. Respuesta a gripe	385
2.2.6.4. Respuesta a varicela	387
2.2.6.5. Respuesta a parotiditis	390
2.2.6.6. Respuesta a rubéola	392
2.2.6.7. Respuesta a sarampión	394
2.2.6.8. Respuesta a neumococo	397
2.2.6.9. Respuesta a tétanos	399
2.2.6.10. Respuesta a difteria	402
2.3. Subestudio A2: Estudio de la influencia de episodios de carga viral detectable ≥ 20 copias/mL sobre el sistema inmunitario y la replicación viral durante el TARGA y tras su interrupción	404
2.3.1. Características generales basales	404
2.3.2. Características virológicas basales y evolución de la replicación viral	405
2.3.3. Características del sistema inmune basales y evolución	409

2.3.3.1. Subpoblaciones linfocitarias	409
2.3.3.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	422
2.3.3.3. Respuestas linfoproliferativas	424
2.3.3.4. Respuestas CD8 ⁺ específicas frente al VIH	429
2.3.4. Cambios en la función tímica	432
2.3.4.1. Copias de <i>TRECs</i>	432
2.3.4.2. Tejido tímico	434
2.3.4.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo <i>naïve</i>	434
2.3.5. Cambios en el sistema IL-7/IL-7R	434
2.3.5.1. Niveles séricos de IL-7	437
2.3.5.2. Expresión de IL-7R	437
2.3.6. Influencia en las respuestas a los antígenos vacunales	437
2.3.6.1. Respuesta a VHA	437
2.3.6.2. Respuesta a VHB	440
2.3.6.3. Respuesta a gripe	443
2.3.6.4. Respuesta a varicela	445
2.3.6.5. Respuesta a parotiditis	447
2.3.6.6. Respuesta a rubéola	450
2.3.6.7. Respuesta a sarampión	452
2.3.6.8. Respuesta a neumococo	454
2.3.6.9. Respuesta a tétanos	457
2.3.6.10. Respuesta a difteria	460
2.4. Resumen del Subestudio A (apartado 2)	462
2.4.1. Subestudio A1	462
2.4.2. Subestudio A2	463
3. SUBESTUDIO B: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TÍMICA Y EL SISTEMA IL-7/IL-7R TRAS LA INTERRUPCIÓN DE TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)	465

3.1. Introducción	465
3.2. Efecto de la interrupción terapéutica sobre la función tímica	465
3.2.1. Copias de <i>TRECs</i>	465
3.2.2. Tejido tímico	466
3.2.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo <i>naïve</i>	466
3.3. Efecto de la interrupción terapéutica sobre el sistema IL-7/IL-7R	470
3.3.1 Niveles séricos de IL-7	470
3.3.2. Expresión del IL-7R	472
3.4. Resumen del Subestudio B (apartado 3)	474
3.4.1. Efecto de la interrupción terapéutica sobre la función tímica	474
3.4.2. Efecto de la interrupción terapéutica sobre el sistema IL-7/IL-7R	474
4. SUBESTUDIO C: ESTUDIO DE LA RESPUESTA ADQUIRIDA A ANTÍGENOS VACUNALES TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)	475
4.1. Introducción	475
4.2. Respuesta a VHA	475
4.2.1. Respuesta humoral	475
4.2.2. Respuesta celular	476
4.3. Respuesta a VHB	479
4.3.1. Respuesta humoral	479
4.3.2. Respuesta celular	479
4.4. Respuesta a gripe	482
4.4.1. Respuesta celular	482
4.5. Respuesta a varicela	484
4.5.1. Respuesta humoral	484
4.5.2. Respuesta celular	484
4.6. Respuesta a parotiditis	487
4.6.1. Respuesta humoral	487

	Índice
4.6.2. Respuesta celular	487
4.7. Respuesta a rubéola	490
4.7.1. Respuesta humoral	490
4.8. Respuesta a sarampión	491
4.8.1. Respuesta humoral	491
4.8.2. Respuesta celular	491
4.9. Respuesta a neumococo	494
4.9.1. Respuesta humoral	494
4.9.2. Respuesta celular	494
4.10. Respuesta a tetanos	497
4.10.1. Respuesta humoral	497
4.10.2. Respuesta celular	497
4.11. Respuesta a difteria	500
4.11.1. Respuesta humoral	500
4.12. Resumen del Subestudio C (apartado 4)	501
DISCUSIÓN	503
1. INTRODUCCIÓN	505
1.1. Justificación del estudio	505
1.2. Ventajas y limitaciones del estudio	507
1.2.1. Ventajas	507
1.2.2. Limitaciones	509
2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE UN CALENDARIO VACUNAL SOBRE LA CARGA VIRAL Y EL SISTEMA INMUNITARIO EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH CON TARGA DURANTE EL TRATAMIENTO Y TRAS SU INTERRUPCIÓN	513
2.1. Características basales de los pacientes	513

2.2. Cambios durante el periodo vacunal	518
2.2.1. Efectos secundarios asociados al calendario vacunal	518
2.2.2. Efectos del calendario vacunal sobre la carga viral	519
2.2.3. Efectos del calendario vacunal sobre el sistema inmune	524
2.2.4. Efectos del calendario vacunal sobre la función tímica y el sistema IL-7/IL-7R	529
2.2.5. Efectos del calendario vacunal sobre las respuestas a los antígenos vacunales	530
2.3. Cambios tras la suspensión del tratamiento	536
2.3.1. Generalidades. Eventos clínicos	536
2.3.2. Cambios en la carga viral	536
2.3.3. Cambios en el sistema inmune	539
2.3.4. Cambios en la función tímica y el sistema IL-7/IL-7R	541
2.3.5. Cambio en las respuestas a los antígenos vacunales	543
3. SUBESTUDIO A: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE EPISODIOS DE CARGA VIRAL DETECTABLE SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE EL TARGA Y TRAS SU INTERRUPCIÓN	545
3.1. Introducción	545
3.2. Subestudio A1: Estudio de la influencia de episodios de carga viral detectable ≥ 200 copias/mL sobre el sistema inmunitario y el rebote de la carga viral durante el TARGA y tras su interrupción	547
3.2.1. Características basales	547
3.2.2. EVI y evolución virológica	548
3.2.3. EVI y sistema inmune	555
3.2.4. EVI, función tímica y sistema IL-7/IL-7R	560
3.2.5. EVI y respuesta a antígenos vacunales	562
3.3. Subestudio A2: Estudio de la influencia de episodios de carga viral detectable ≥ 20 copias/mL sobre el sistema inmunitario y el rebote de la carga viral durante el TARGA y tras su interrupción. Diferencias con los episodios \geq	563

200 copias.	
4. SUBESTUDIO B: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TÍMICA Y EL SISTEMA IL-7/IL-7R TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)	567
4.1. Introducción	567
4.2. Efecto de la interrupción terapéutica sobre la función tímica	567
4.3. Efecto de la interrupción sobre el sistema IL-7/IL-7R	571
5. SUBESTUDIO C: ESTUDIO DE LA RESPUESTA ADQUIRIDA A ANTÍGENOS VACUNALES TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)	575
CONCLUSIONES	579
BIBLIOGRAFÍA	585
ANEXOS	673

INTRODUCCIÓN

1. INMUNOPATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

1.1. INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un virus ARN perteneciente a la familia *Retroviridae*, subfamilia lentivirus, que fue aislado por primera vez en 1983. Este virus origina una destrucción progresiva del sistema inmunitario que tiene como expresión clínica final el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), descrito tres años antes (1).

La infección por este virus, tipos 1 y 2, es un problema creciente a escala mundial. Las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran un aumento en el número de casos, alcanzando su nivel más alto en la historia, no únicamente en los países en desarrollo sino también en el mundo industrializado. A finales del 2005 se estimaba que había 38 millones de adultos con infección por el VIH (1,9 millones de los cuales en Norteamérica y Europa Central-Occidental), 4,2 millones de nuevos infectados y 2,6 millones de muertes debidas al SIDA (2).

1.2. CICLO BIOLÓGICO DEL VIH

El primer paso del ciclo biológico del virus es la entrada en la célula, concretamente en los linfocitos T CD4⁺. Para facilitar esta entrada, el virus se adhiere con gran afinidad a unas lectinas existentes en la superficie de las células dendríticas, las DC-SIGN y L-SIGN (3), concentrándose en la superficie de estas células y haciendo que la transmisión sea más eficaz que la del virus soluble (4).

La entrada del VIH en los linfocitos T CD4⁺ se produce de forma secuencial mediante la interacción con dos receptores. En primer lugar se produce la interacción de la proteína de superficie viral gp120 con la molécula de CD4, común y específica para todas las variantes del VIH (5). Tras dicha unión, la gp120 experimenta un cambio conformacional que le permite la unión a los correceptores CCR5 y/o CXCR4 (6), de la familia de los receptores de quimiocinas

(7). En función del receptor al que se unan en esta última interacción se definen tres variantes del virus, la R5, la X4 y la R5X4. Seguidamente se produce la fusión de la membrana viral con la celular, con la internalización de la cápside viral y su desensamblaje parcial en el citoplasma celular.

A continuación tiene lugar la retrotranscripción del ARN genómico viral (dos hebras de ARN monocatenario) en ADN bicatenario proviral (lineal no integrado). Posteriormente el ADN proviral se une a una serie de factores celulares y virales, formando el complejo de preintegración, y entra en el núcleo. Aquí se produce la integración del ADN lineal en el genoma del huésped (8;9). Existen además formas circulares de ADN en el núcleo que son productos colaterales del proceso de integración.

Desde esta situación las posibles evoluciones del virus son dos: permanecer latente o experimentar una replicación masiva. La iniciación de la transcripción depende de factores celulares, destacando el papel de la familia de factores de transcripción Rel/NF- κ B (10). Dichos factores no existen en forma activa en los linfocitos T CD4⁺ en reposo celular y se inducen únicamente en el curso de los procesos de activación inmunológica, por lo que la replicación del VIH depende absolutamente de la activación de los linfocitos infectados (11).

Cuando se transcriba dará lugar a un ARN mensajero (ARNm) del que se obtendrán las proteínas virales, que posteriormente se ensamblarán y formarán partículas virales maduras que saldrán de la célula (12).

La población latente dará lugar a un reservorio de la infección en los linfocitos T CD4⁺, siendo inaccesible a la respuesta inmunitaria al no expresar productos virales en su membrana.

Este ciclo se resume en la **Figura I.1.1**.

1.3. PATOGENIA

Recientes descubrimientos apoyan un modelo de patogenia en dos fases secuenciales que incluyen mecanismos patogénicos muy diferentes (13): la fase de infección aguda y la crónica.

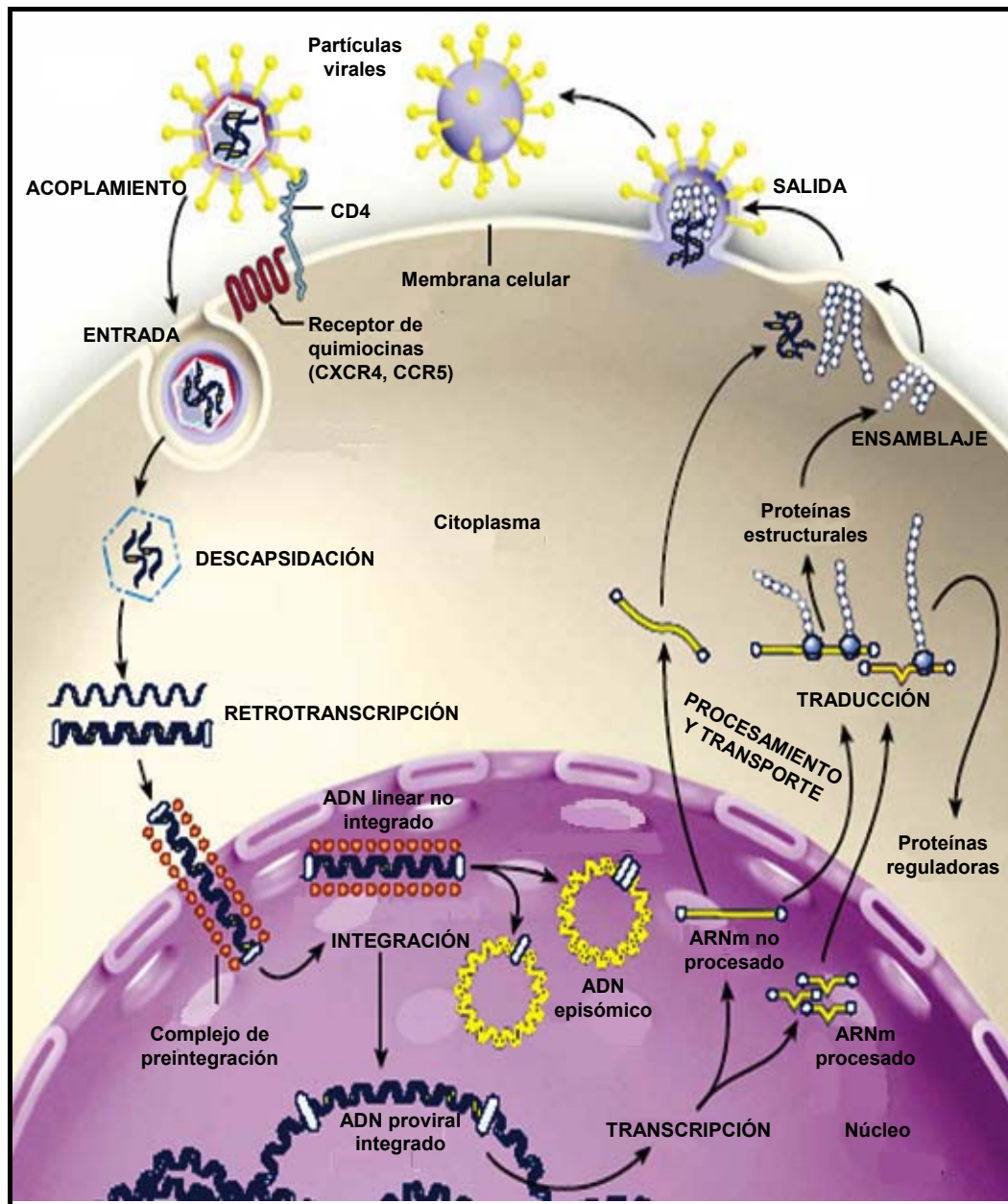


Figura 1.1.1. Ciclo biológico del VIH. Modificado de la referencia (14).

1.3.1. Infección aguda

La primera fase, de semanas de duración, se caracteriza por una pérdida rápida y masiva de linfocitos T CD4⁺ memoria mediada directamente por el VIH. Dicha pérdida tiene lugar principalmente en el tejido linfóide asociado a mucosas (MALT, del inglés *mucosal-associated lymphoid tissue*). Dicho tejido contiene la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ del organismo, una gran parte de los cuales tienen dos características que los hacen especialmente sensibles a la

infección: expresan CCR5 en su superficie y tienen un fenotipo memoria activado (**Figura I.1.2**) (15-22). El VIH produce durante 2-3 semanas una gran depleción de estas células. En el caso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV, del inglés *Simian Immunodeficiency Virus*), hasta el 60% de los linfocitos T CD4⁺ memoria de la lámina propia intestinal contienen ARN del SIV en el pico de infección (día 10), habiendo sido eliminados la mayoría de estos linfocitos antes del día 14 (21).

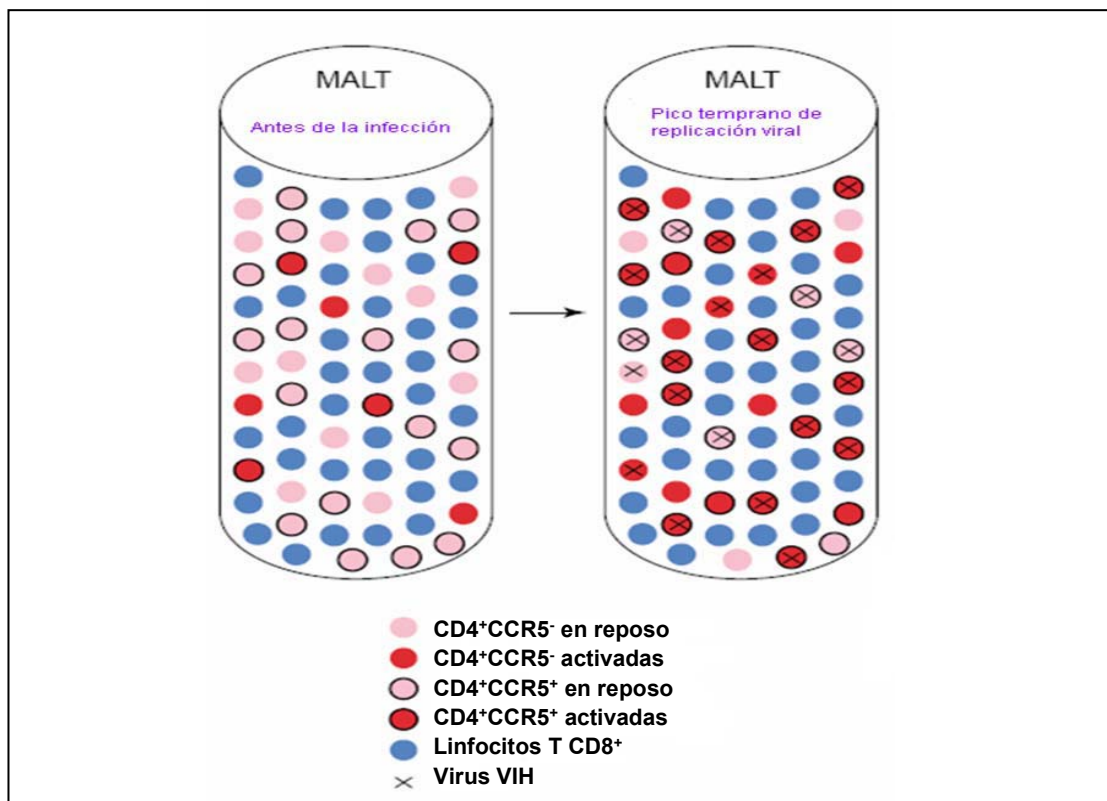


Figura I.1.2. Modelo de infección aguda en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Modificado de la referencia (13).

Se desconoce todavía qué determina el cese de esta fase, habiéndose postulado el consumo de las células diana disponibles y/o la generación de las respuestas inmunes específicas frente al VIH. Se ha planteado recientemente la hipótesis de que esta depleción masiva condiciona una grave lesión del sistema inmune y posiblemente afecte a la correcta función de barrera de las mucosas, lo que condicionaría múltiples infecciones subclínicas que podrían explicar el estado de activación crónica del sistema inmune (13). Según esta misma

hipótesis, este estado de activación del sistema inmune sería el causante de la evolución de la infección a SIDA.

1.3.2. Infección crónica

Esta fase, de años de duración, se caracteriza por un descenso muy lento de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica (que suponen sólo un 1% de los linfocitos totales). Esta pérdida, el evento más característico de la infección por el VIH (23), es consecuencia de una serie de acontecimientos que se describen a continuación. La importancia de cada uno de ellos no se conoce con exactitud.

1.3.2.1. Efecto citopático directo

Este efecto citopático sería secundario a la replicación viral en los linfocitos T CD4⁺, estimándose que diariamente unos 10⁸ linfocitos T CD4⁺ serían destruidos por este efecto. El virus tiene una alta tasa de replicación en pacientes sin tratamiento (24;25), con una vida media viral en el rango de minutos a pocas horas (26;27). Aunque menos del 1% de los linfocitos T CD4⁺ infectados presenta el VIH replicando activamente en su interior, es esta población de linfocitos activados la responsable de la producción de viriones observada en el paciente infectado. Estos viriones infectarán a su vez nuevos linfocitos activados, especialmente aquellos que se están dividiendo para regenerar la pérdida linfocitaria producida en la primar fase, o los linfocitos T CD4⁺ específicos del VIH que se activan al reconocer los antígenos virales, lo que les hace más susceptibles a la infección viral (28).

1.3.2.2. Estado de activación crónica

Considerado por muchos autores como el mayor determinante de la depleción de linfocitos T CD4⁺ y un fuerte predictor de la progresión de la enfermedad (23;29-31). Las causas de esta activación inmune generalizada son complejas e incluyen la activación de las células T por antígenos tanto específicos (el propio VIH y los agentes oportunistas) como una activación colateral por antígenos no específicos. Esta activación de linfocitos T CD4⁺ tiene

distintas consecuencias: i. Proporciona nuevas dianas para la replicación del VIH; ii. El recambio aumentado de las células T provoca un consumo crónico de células *naïve* y memoria en reposo, con una expansión relativa de los linfocitos T CD4⁺ memoria efectores de vida media corta (30;32); iii. Provoca alteraciones en el control del ciclo celular, aumentando la propensión a caer en una apoptosis inducida por activación (33;34). Por tanto, una consecuencia de esta activación, fisiológica por otro lado, es un aumento de la muerte celular.

Esta activación crónica afectaría tanto a los linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺. La afectación predominante de los primeros no sería únicamente por ser las dianas directas del VIH, sino por ser también más sensibles a los efectos perjudiciales de la activación inmune y ser además regenerados menos eficientemente. Los linfocitos T CD8⁺ disminuirán sólo en fases muy tardías de la infección.

1.3.2.3. *Mecanismos inmunitarios*

Las células infectadas se transforman en diana para los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos al expresar en su superficie los péptidos virales en sus moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I (35). Es este el mecanismo por el cual se produce un control parcial de la infección y la caída de la carga viral (plasmática) del VIH (CV, copias de ARN plasmático de VIH) en la primoinfección, de manera inversamente relacionada con la respuesta citotóxica (CTL) (36); y también el probablemente mayor responsable de las diferencias en la evolución de la infección por el VIH en relación al HLA (antígenos de histocompatibilidad, del inglés *Human lymphocyte antigen*) de los pacientes (37). Los linfocitos T CD8⁺ inducen la muerte de los linfocitos T CD4⁺ infectados a través de su lisis mediante perforinas y granzimas (38). Por otro lado, se ha demostrado además que en la infección por el VIH existen defectos funcionales en la respuesta CTL que condicionan la respuesta antiviral, como una reducción de la cantidad de perforinas (39).

Cabe decir, sin embargo, que el control sobre la replicación viral que ejercen los linfocitos T CD8⁺ no sólo radica en la inducción de la muerte celular, sino también a través de la

producción de citocinas [como el Interferón (IFN)- γ] y quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES) que inhiben la replicación viral (35).

1.3.2.4. *Apoptosis*

El VIH puede inducir apoptosis tanto en linfocitos infectados como no infectados a través de diversos mecanismos como la activación (comentada anteriormente), el efecto tóxico de diferentes proteínas virales o la síntesis de citocinas (40).

1.3.2.5. *Bloqueo de la regeneración linfocitaria*

Los linfocitos no sólo se destruyen más sino que se regeneran peor, tanto a nivel central tímico como a nivel periférico. Desde el punto de vista central, el VIH es capaz de infectar el timo y alterar su función, disminuyendo la producción de nuevos linfocitos y contribuyendo por tanto a la disminución global, al no poder compensar la pérdida linfocitaria (41-47) (ver **apartado 4** de la **Introducción**). Por otro lado, se ha demostrado que la infección por el VIH produce un bloqueo de la activación y proliferación linfocitaria a nivel periférico, produciéndose con el TARGA un aumento en la cinética de división de los linfocitos T CD4⁺ (23).

1.3.2.6. *Fenómenos de redistribución*

El acúmulo de viriones que recubren las células dendríticas produce una estimulación y “atrapamiento” de linfocitos T CD4⁺ a su alrededor en los órganos linfoides, sobre todo los ganglios linfáticos, contribuyendo a la linfopenia aunque sin disminuir el número total de linfocitos (23;48). Este “secuestro” se soluciona de forma precoz tras iniciar el TARGA y es uno de los responsables del incremento inicial de linfocitos T CD4⁺ que se observa con el tratamiento (49).

1.4. RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VIH

Frente a la infección por el VIH el sistema inmunitario desarrolla una serie de respuestas inmunes de muy diversa índole y con diferentes efectos sobre el ciclo biológico del virus.

1.4.1. Respuesta humoral

La infección por el VIH induce una respuesta intensa de anticuerpos frente a prácticamente todas las proteínas reguladoras y estructurales del VIH (40). Algunos de estos anticuerpos tiene capacidad neutralizante (50;51), pero su producción es muy escasa y rápidamente se observa un escape viral a los mismos (52). Dicho escape se debe a diversas causas. Por un lado, las partes más expuestas e inmunógenas del virus son altamente variables, evadiéndose por mutaciones genéticas. Por otro lado, las partes menos variables y que podrían presentar menos mutaciones son menos inmunógenas, debido a que conformacionalmente están más ocultas y profundas, con difícil acceso de los anticuerpos, y además están altamente glicosiladas. Por ello, aunque los anticuerpos ayuden al control de la infección, su papel es limitado (53).

1.4.2. Respuesta celular

Existen respuestas celulares contra el virus por parte de los linfocitos T CD4⁺ colaboradores, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) y las células *Natural Killer* (NK), siendo las dos primeras, específicas, las más importantes (35;54-56).

Aunque existe controversia al respecto de que estas respuestas sean capaces de responder a los antígenos virales y jueguen algún papel en el control de la infección (38;57-63), diferentes evidencias apoyan su importancia. Datos directos acerca del papel que juega la respuesta CTL en el control de la replicación vírica se han obtenido tanto en el modelo de infección en macacos desprovistos de linfocitos T CD8⁺ (55;64) como en el modelo del ratón inmunodeficiente (65). Determinados pacientes conocidos como no progresores a largo plazo (LTNP del inglés *Long-term non-progressor*) pueden controlar la replicación viral gracias a potentes respuestas CTL. Además, esta respuesta CTL es especialmente intensa en todos los

pacientes durante la primoinfección, y se ha relacionado su intensidad con el control de la replicación viral durante esta fase (66). También parece fundamental el papel de los linfocitos T CD4⁺ específicos frente al VIH, que podrían afectar la progresión de la infección al potenciar la proliferación de respuestas CTL (67), además de tener su propia actividad antiviral (68). Sin embargo, un trabajo reciente prospectivo no ha encontrado correlación entre las respuestas específicas anti-VIH CD4⁺ y la evolución de la infección, sugiriendo que son más una respuesta secundaria a la viremia que un mecanismo defensivo de control (69;70).

Sin embargo, a pesar de presentar un gran número de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos contra una gran variedad de epitopos del VIH, la mayoría de pacientes no tratados experimentan una alta replicación viral y pérdida de linfocitos T CD4⁺. Los mecanismos que explican este fracaso son varios, entre los que estaría el escape viral con variantes incapaces de ser reconocidas por el repertorio linfocitario T previamente establecido (71) y, sobre todo, la desregulación y destrucción de los linfocitos T CD4⁺ mediada por el virus. Esta disfunción de la respuesta “*helper*” provoca a su vez la alteración de la respuesta CTL en forma de defectos en la producción de perforinas y granzimas, así como desviaciones en los tipos predominantes de células citotóxicas presentes (39).

Por último, las células NK, como parte de la inmunidad innata, juegan un papel importante en las infecciones virales, por vías citolíticas y no citolíticas. En el caso del VIH, se ha demostrado además que también participan en el control de la infección mediante la producción de CC-quimiocinas, citotoxicidad mediada por anticuerpos y regulando la maduración de las células dendríticas. Sin embargo, la infección induce también defectos fenotípicos y funcionales en las NK que, junto con la infra-regulación de la expresión de las moléculas MHC I, dificulta su correcta función (72).

1.4.3. Factores solubles

Numerosos factores solubles son activos frente a la infección por el VIH como las proteínas del complemento, los interferones y sobre todo, las quimiocinas, defensinas y citocinas liberadas por los linfocitos T CD8⁺ activados y que comparten a menudo los

correceptores celulares del VIH por los que competirían. Cabe destacar sobre todo el papel de las CC y CXC quimiocinas como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β y SDF-1/CSCL12 (73). Otro factor soluble con actividad anti-VIH es el denominado CAF (del inglés *cellular antiHIV factor*), un factor (o factores) producidos por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos activados que se halla en los sobrenadantes de los cultivos de células T CD8⁺ y que suprime la replicación del VIH en cultivo. Como posibles candidatos de este CAF se han propuesto diferentes proteínas, sobre todo las α -defensinas (74;75).

1.4.4. Cronología de la respuesta inmune

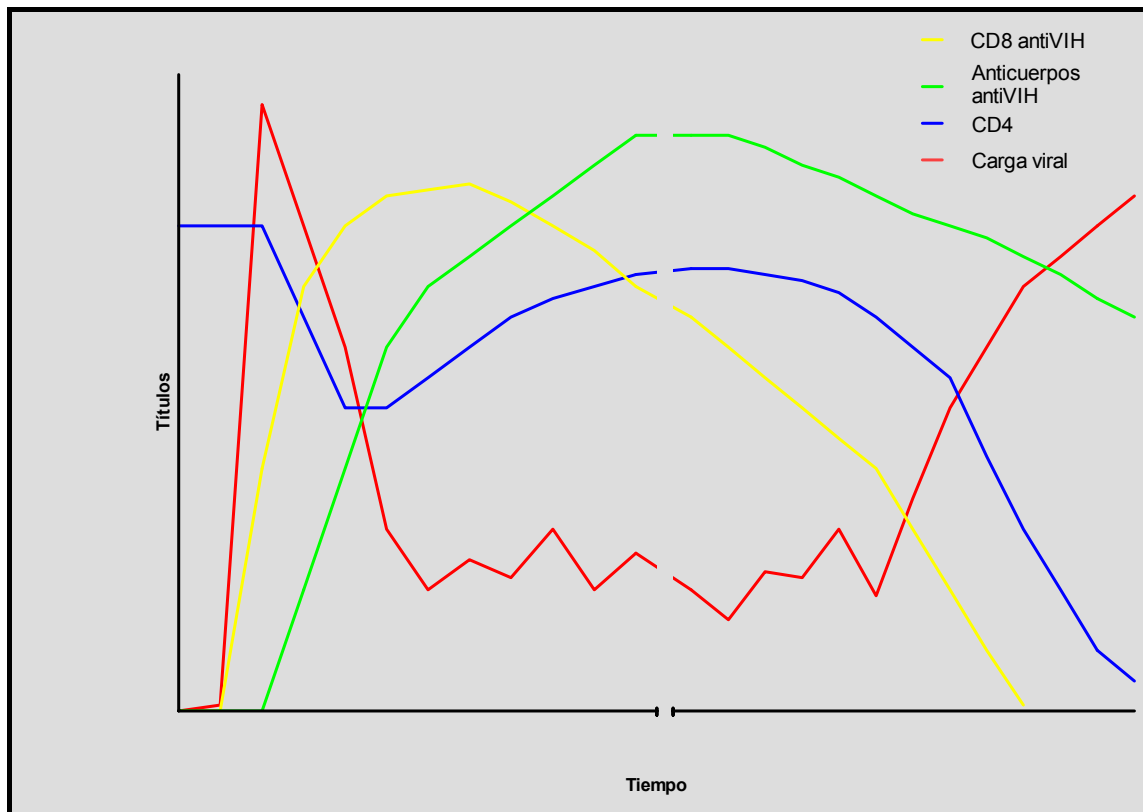


Figura 1.1.3. Evolución de los parámetros inmunológicos y virológicos en la infección por el VIH

Desde el contacto inicial con el VIH existe un periodo ventana de 4-12 semanas durante el cual no es posible detectar anticuerpos específicos frente al VIH, a pesar de existir niveles de viremia muy elevados, pero sí linfocitos T CD8⁺ con actividad citotóxica anti-VIH, respuesta que es más precoz. Se produce entonces un equilibrio entre el sistema inmunitario y el virus que

dará lugar a una CV basal de equilibrio (o *set point* viral). Posteriormente, si la respuesta inmune es incapaz de erradicar el virus, se establece la fase de infección crónica persistente, donde se mantienen durante años las repuestas humorales y celulares intensas anti-VIH, que reflejan el estímulo antigénico persistente y la capacidad de control parcial de la infección. Con el tiempo, la destrucción de linfocitos T CD4⁺ aumenta y aparecen variantes virales más agresivas, una replicación viral acelerada y una inmunosupresión profunda, apareciendo las infecciones oportunistas, coincidiendo con un deterioro de las respuestas humoral y celular frente al VIH (40) (**Figura I.1.3.**).

1.5. RESPUESTAS AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Hoy en día el tratamiento de la infección por el VIH consiste en una combinación de tratamientos antirretrovirales que conforman determinadas pautas de lo que se denomina el tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA). La instauración del TARGA tiene consecuencias a nivel tanto del virus, como de las poblaciones linfocitarias y las propias respuestas inmunes contra el VIH.

1.5.1. Efectos sobre la carga viral

El TARGA produce un descenso en la CV plasmática que, según modelos matemáticos, se produce en dos fases (27).

En una primera fase, los niveles de ARN plasmático disminuyen rápidamente (de forma exponencial durante las dos primeras semanas de tratamiento) y los linfocitos T CD4⁺ infectados con virus con replicación activa mueren (24;25).

En la segunda fase, el ritmo de descenso en la CV es menor, reflejando la presencia de linfocitos T CD4⁺ de vida media larga infectados, en reposo, y que contienen virus con capacidad replicativa tanto en forma integrada como no integrada, así como de virus libre asociado a las células dendríticas foliculares en el tejido linfático (27;76-82).

El descenso del ADN (integrado y no) y del ARNm se ha documentado que también ocurre en dos fases. Una primera con un descenso importante de ambos (1,25-1.46 log₁₀)

durante los primeros 500 días de tratamiento. Y una segunda fase durante los siguientes 200 días o más de TARGA en el que se llega a una meseta en sus niveles, persistiendo detectables (14;83).

1.5.2. Efectos sobre los linfocitos. Repoblación celular

Con el TARGA se produce un incremento del número absoluto de linfocitos T CD4⁺ circulantes y una reconstitución inmunológica, al menos parcial (82). Los mecanismos que rigen esta reconstitución tras el TARGA no están todavía totalmente aclarados, aunque se piensa que no deberían diferir en exceso de otras situaciones de depleción linfocitaria T adquirida como son el trasplante de médula ósea y las citopenias post-quimioterapia.

Dicha repoblación, básicamente la de los linfocitos T CD4⁺, es muy heterogénea entre los diferentes pacientes, pero se admite que se produce de forma bifásica. Una fase inicial, de semanas o meses, asociada a una redistribución desde los ganglios linfáticos y a una expansión periférica de las células memoria (49;82). Y una fase posterior, tras 6-12 meses de tratamiento, de incremento en las células CD4⁺ *naïve* (aquellos linfocitos T CD4⁺ que no han tenido contacto con su determinante antigénico) creadas *de novo* (84). Numerosos estudios demuestran que mientras que las fases tempranas de la reconstitución inmune son probablemente timo-independientes, en la segunda fase la reconstitución es dependiente del timo (85-88).

El origen de los linfocitos T CD4⁺ en la repoblación linfocitaria reviste gran importancia. La redistribución o proliferación de las células preexistentes sólo aumenta el número de células de los clones que han sobrevivido, es decir, que el sistema inmune mejora cuantitativamente pero no cualitativamente, y sólo protegerá contra aquellos agentes que todavía se reconocían antes de la recuperación. Por el contrario, la producción de nuevas células llevaría a recobrar al menos parte del repertorio de especificidades (en forma de variedad en los receptores de células T (TCR)), algunas perdidas durante la infección. Además, teóricamente, la producción de células *de novo* permitirá una mayor respuesta a neoantígenos de forma efectiva y reponer el compartimiento de células T hasta niveles normales (89-91).

Sin embargo, la contribución relativa a la homeostasis celular T de la disfunción tímica, la disminución de la pérdida acelerada por apoptosis asociada a la activación linfocitaria, y la expansión periférica T dependiente de citocinas está pobremente definida (29;30).

1.5.3. Efecto sobre las respuestas inmunes celulares contra el VIH

Aunque algunos autores han observado un mantenimiento o incluso un aumento de las respuestas celulares específicas antivirales de los linfocitos T CD8⁺ al iniciar el TARGA (56;92-96), estas respuestas usualmente descienden en respuesta al tratamiento (36;61;92-94;97-103).

Por lo que respecta a las respuestas específicas anti-VIH de los linfocitos T CD4⁺, iniciar de forma precoz el TARGA (durante la fase aguda de la infección) puede preservarlas (56;66;94), mientras que si el tratamiento se inicia durante la infección crónica, raramente se observan estas respuestas (82;100;104-106), incluso aunque la inmunidad celular T contra los patógenos oportunistas esté restaurada consistentemente en estos pacientes.

Estas observaciones llevan a la teoría de que la inmunidad VIH específica disminuye o desaparece durante el TARGA porque las células específicas no se estimulan de forma óptima con niveles apropiados de antígeno, lo cual se apoya con la recuperación de parte de estas respuestas, al menos de forma transitoria, cuando el sistema inmune se reexpone a los antígenos del VIH durante las interrupciones del TARGA (66;107-111). Por otro lado, otros estudios han demostrado la existencia de una correlación negativa entre la viremia de equilibrio que se logra con el TARGA y la respuesta inmune, lo que sugeriría que la respuesta inmune determina el *set point* viral. De hecho se ha observado que la relación entre el TARGA, la replicación viral y la respuesta inmune es compleja y no lineal, presentando una relación positiva cuando los niveles de viremia son bajos y negativa cuando éstos son altos (112). Este modelo es el que explica el control parcial de la replicación viral de virus resistentes. Inicialmente la función inmunológica T mejora como consecuencia de una reducción de la replicación viral mediada por TARGA. Debido a un eventual fracaso del control completo replicativo por el TARGA, aparece una replicación de bajo nivel de las variantes resistentes del virus, aportando el estímulo antigénico necesario para generar un mayor número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos. El control

parcial de la replicación por el TARGA y/o la emergencia de un VIH menos virulento previenen la rápida depleción de las células CD4⁺ VIH-específicas. De este modo, un nuevo estado de equilibrio se consigue en el que el virus salvaje se controla por el TARGA y el resistente lo hace de forma parcial gracias a la combinación de una respuesta inmune efectiva, una menor capacidad replicativa y una presión farmacológica continua parcialmente efectiva.

1.6. TERAPIAS INMUNOMEDIADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIH

1.6.1. Fundamentos

En contra de las primeras expectativas cuando el tratamiento antirretroviral se introdujo, actualmente se sabe que el aumento de linfocitos T CD4⁺ inducido por el TARGA permite sólo una recuperación inmunológica parcial, en la que se restablece en parte la respuesta inmune contra infecciones oportunistas, pero sin lograr una mejoría de la respuesta específica contra el propio virus (14;105;113;114). Consecuencia directa de ello es que el tratamiento, por sí mismo, es incapaz de erradicar la infección. Por eso, cuando se suspende, el virus reaparece en sangre periférica, siendo necesario mantenerlo de por vida, con los consecuentes costes tanto en forma de efectos secundarios como económicos (115), lo que a su vez puede restar eficacia a largo plazo debido a problemas de adherencia a la medicación. Ante esta situación se considera necesario buscar nuevas estrategias terapéuticas (116).

Las dos posibilidades que se están investigando actualmente son la simplificación de los tratamientos (117) y la combinación del TARGA con una inmunoterapia capaz de restaurar y/o potenciar las respuestas inmunológicas específicas frente al VIH (116;118). Estas últimas deberían permitir retirar el tratamiento antirretroviral de manera definitiva o, al menos, durante períodos variables de tiempo (119).

Se han ensayado distintos tipos de terapias inmunomediadas, que básicamente intentan actuar por tres mecanismos diferentes. Por un lado, están aquellas que intentan inducir las respuestas que disfuncionan en la infección por el VIH, como las vacunas terapéuticas o las interrupciones estructuradas de tratamiento (STI). Otros métodos intentan aportar al organismo

aquellos componentes en los que puede ser deficiente debido a la infección por el VIH, como las citocinas o las técnicas de inmunoterapia pasiva. Por último, basándose en los datos que indican que existe una infección selectiva de las células CD4⁺ activadas específicas anti-VIH en los individuos infectados, y que la activación continua del sistema inmunológico es un factor predictor de mala evolución, se ha propuesto la utilización de inmunomoduladores. Las diferentes estrategias utilizadas se resumen en la **Tabla I.1.1**.

Tabla 1. Estrategias de inmunoterapia utilizadas en el tratamiento contra el VIH. IL: Interleucina. Modificado de la referencia (120)

ESTRATEGIA	REFERENCIA
Vacunas terapéuticas	
Virus inactivado completo	(121)
Canarypox	(122)
Vacunas de ADN	(123;124)
Vacunas de adenovirus recombinantes	(125)
Vacunas de células dendríticas	(126;127)
Citocinas	
IL-2	(128;129)
Dosis bajas de IL-2	(130)
Factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF)	(131)
Factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF)	(132)
Interferón (IFN) α	(133)
IL-10	(134)
IL-12	(135)
IL-15	(136)
IL-16	(137)
IL-7	Apartado 5 de la Introducción
Inmunoterapia pasiva	
Infusión de linfocitos	(138)
Infusión de plasma	(139-142)
Infusión de anticuerpos monoclonales	(143-146)
Interrupciones estructuradas de tratamiento (STI)	
Primoinfección	(147)
Infección crónica	(110;119)
Inmunomoduladores	
Hidroxiurea	(148;149)
Corticoides	(150)
Ciclosporina A	(151)
Ácido micofenólico	(152;153)
Talidomida	(154)

1.6.2. Vacunas terapéuticas

En general, la capacidad de las vacunas utilizadas para aumentar la respuesta específica CD8⁺ anti-VIH ha sido muy limitada, sin un claro impacto en la CV (155-159). Una de las más estudiadas ha sido el Remune, una vacuna de un virus completo inactivado en la que se ha retirado la proteína de la envuelta. Los resultados mostraron que era capaz de inducir respuestas CD4⁺ específicas a gag a veces muy potentes, pero sin capacidad de control inmunológico de la replicación viral (160-162).

Los estudios que mejor demuestran la capacidad de una vacuna terapéutica de incrementar la inmunidad específica de forma eficaz para el control de la replicación viral han sido los que han utilizado vacunas basadas en células dendríticas (CD) como adyuvante celular. Inicialmente en modelos animales consiguieron disminuciones significativas y sostenidas de la CV, con aumento de las respuestas humoral y celular anti-VIH (163-165). Recientemente dos trabajos en humanos han mostrado resultados esperanzadores, también con control parcial de la CV y aumento de las respuestas específicas (126;127).

Otra estrategia vacunal es la que utiliza vectores virales recombinantes vivos que transportan información genética del VIH. Ejemplos son los vectores canarypox (ALVAC), o virus vaccinia-Ankara modificado (122;166), con resultados en general pobres excepto en algún caso (124;167).

1.6.3. Citocinas

Aunque se han realizado numerosos trabajos y ensayos clínicos utilizando diversas citocinas, los mejores candidatos a ser utilizados en clínica humana son la Interleucina (IL)-2, IL-12, IL-15, la hormona de crecimiento y el factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF).

La infusión de IL-2 mediante diferentes estrategias, dosis y vías de administración se asocia a un incremento claro en la cifra de linfocitos CD4⁺ (129;168), siendo el fármaco utilizado como inmunoterapia que más se ha estudiado y más ha avanzado en su desarrollo

clínico. Sin embargo, tras varios años de investigación, no está claro todavía si este incremento afecta de forma positiva a la progresión clínica de la enfermedad.

Aparte del aumento en la cifra total de linfocitos CD4⁺, se han atribuido a la IL-2, aunque de forma discutible, otras tres propiedades. Por un lado, la capacidad de restaurar el repertorio celular T, aunque en general los análisis de los TCR han demostrado que los defectos en el repertorio no se corrigen por la administración de IL-2 (169). En segundo lugar, la capacidad de restaurar la disfuncionalidad de la respuesta celular CD4⁺, aunque en varios ensayos clínicos piloto no se ha demostrado dicha utilidad (128;170;171). Por último, la capacidad de estimular las células infectadas latentes y consecuentemente aumentar el aclaramiento del reservorio del VIH, aunque diferentes estudios han mostrado resultados controvertidos al respecto (172;173).

La IL-12 y la IL-15 han demostrado provocar un aumento de la respuesta CD8⁺ citotóxica específica anti-VIH *in vitro*, en la actividad lítica por parte de las células NK y en las respuestas proliferativas CD4⁺ específicas anti-VIH (174-177).

El uso de hormona de crecimiento en humanos se ha visto asociado a un aumento en la masa tímica (ver **apartado 4.4.4.2** de la **Introducción**), en el número de células T CD4⁺ *naïve*, en la respuesta CD4⁺ y CD8⁺ específica contra el VIH y una inducción en la diferenciación de las células T a células efectoras memoria funcionales (178;179).

Por último, se ha intentado utilizar el GM-CSF junto a interrupciones del tratamiento observándose una ligera mejoría en el control virológico y una menor caída de linfocitos T CD4⁺ tras la interrupción definitiva del tratamiento. Sin embargo, se asocia a alta toxicidad local y sistémica (180).

La IL-7 es actualmente una de las inmunoterapias más prometedoras dado su papel central en la homeostasis celular T. El fundamento de su uso se basa en un doble objetivo. Por un lado, aumentar la producción linfocitaria T a través de la estimulación de la timopoyesis y de la expansión periférica. Por otro lado, como activadora de linfocitos T CD4⁺ infectados latentes, ayudando al aclaramiento del reservorio viral (181) (ver **apartado 5** de la **Introducción**).

1.6.4. Inmunoterapia pasiva

Se han investigado dos tipos de inmunoterapia pasiva en pacientes infectados por el VIH. El primer tipo se ha basado en la infusión de células, tanto CD4⁺ como CD8⁺, y el segundo en la infusión de plasma o anticuerpos neutralizantes.

En el primer caso, se han realizado diversos estudios consistentes en la infusión de células CD8⁺ citotóxicas específicas frente al VIH, con resultados hasta ahora poco prometedores y muy experimentales (139-142;182;183).

Por lo que respecta a la infusión pasiva de plasma y anticuerpos neutralizantes, es una idea que nació ya durante la primera mitad de la década de los noventa del siglo pasado, con estudios en los que se infundía plasma de pacientes infectados por el VIH que estaban asintomáticos a pacientes avanzados con SIDA, observándose una negativización de la antigenemia p24 (y posteriormente de la CV) y un aumento de la actividad neutralizante del suero de los pacientes receptores, y sin efectos adversos (146;184). Se originó la hipótesis que los pacientes asintomáticos contenían en su suero altos títulos de actividad neutralizante del virus que desaparecía a medida que la infección progresaba (185), y diferentes ensayos clínicos confirmaron que era una terapia segura y clínicamente útil para “frenar” la progresión de la enfermedad (143;144). Sin embargo la aparición de los agentes antirretrovirales hizo desaparecer el interés por esta terapéutica.

Recientemente, ha resurgido el interés de la inmunoterapia pasiva, pero con anticuerpos monoclonales específicos, basados en estudios en el modelo de macacos, que demuestran que la transferencia pasiva de anticuerpos previene la infección por inoculación del virus por vía oral, vaginal o endovenosa (186-188). Por ello se han iniciado ensayos de fase I en pacientes infectados para evaluar la farmacocinética y seguridad de dos anticuerpos monoclonales humanos (denominados 2F5 y 2G12), derivados hace ya años de dos pacientes no progresores, con capacidad de inhibir *in vitro* la infección tanto por cepas R5 como por cepas X4 (189).

1.6.5. Inmunomoduladores

Paralelamente a la disminución en el recuento de linfocitos T CD4⁺, la infección por el VIH se caracteriza por un intenso y sostenido estado de activación inmune manifestado por un elevado recambio de linfocitos T, B y células NK, así como por una elevada liberación de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-7 y TNF- α (116). Un elemento constante de este proceso lo constituye el elevado recuento de clones de linfocitos T CD8⁺ activados que expresan receptores de superficie HLADR⁺/CD38⁺, fenómeno considerado hoy día como fiel marcador de progresión de la enfermedad (190;191). Este proceso sostenido de activación puede conducir a un agotamiento del sistema inmune, al igual que, a un aumento en la infectividad celular, permitiendo su diseminación. Por ello se ha planteado la posibilidad de usar fármacos inmunomoduladores (corticoides, hidroxiurea, micofenolato mofetil, talidomida y ciclosporina A) como adyuvantes a la terapia antirretroviral.

Estudios animales con combinación de hidroxiurea e interrupción de tratamiento mostraron una mayor capacidad de control de la viremia (192). Estudios en humanos mostraron que el uso de este fármaco aumentó significativamente la proporción de pacientes que lograron controlar la replicación viral (149).

Diversos estudios han observado que los pacientes infectados por el VIH tratados con ácido micofenólico presentan una reducción en el compartimiento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en división activa (Ki67⁺), así como en la capacidad de aislar virus del total de la población de linfocitos T CD4⁺ y un descenso de la CV de equilibrio tras la interrupción del TARGA (152;153;193).

Ensayos con ciclosporina A han demostrado una restauración del recuento de linfocitos T CD4⁺, tanto en porcentaje como en números absolutos (194). A pesar de que la ciclosporina A interfiere en la síntesis de las proteínas virales gag, su principal efecto lo ejerce a través de la inhibición de la proliferación y diferenciación de células T. Se ha sugerido que su uso durante la primoinfección podría disminuir el número de linfocitos T CD4⁺ activos que permiten la masiva replicación viral, y prevenir el secuestro clonal de los linfocitos en el tejido linfático, donde se perpetúa la infección. Sin embargo se desconoce el beneficio clínico a largo plazo.

Existen sin embargo muchas dudas sobre la utilización de inmunomoduladores como terapia inmunomediada en la infección por el VIH. El conocimiento de los candidatos adecuados, el fármaco a utilizar, la duración y el momento óptimo para iniciar la terapia en el curso de la infección, son interrogantes que deben ser contestados a través de estudios clínicos que incluyan un mayor número de pacientes y con seguimiento prolongado. Además existen interrogantes sobre su seguridad a largo plazo, como la influencia en el desarrollo de enfermedades oportunistas o linfoproliferativas. Sin embargo, siguen siendo atractivas las estrategias farmacológicas que interfieran con el ciclo vital del VIH actuando en las células diana del virus, más que a través de la inhibición de enzimas virales, lo que ofrece la ventaja de evitar el desarrollo de mutaciones en el genoma viral frente a fármacos antivirales.

1.6.6. Interrupciones estructuradas del tratamiento (STI).

Conocidas como STI (del inglés *Structured Therapy Interruption*), fueron de las primeras estrategias de interrupción, consistentes en varios ciclos con TARGA y sin TARGA diseñados para aumentar la inmunidad VIH específica celular a través del concepto de “autovacunación”: el aumento en la exposición a un virus autólogo de forma repetida podría estimular las respuestas VIH-específicas y mejorar el control de la infección.

Aunque se han demostrado aumentos de las respuestas específicas celulares anti-VIH y que el tiempo de duplicación de la CV aumenta tras las interrupciones (119), generalmente la CV tras STI se correlaciona con la CV pretratamiento (111;195), y la magnitud de la respuesta CD8⁺ específica anti-VIH aumenta hasta una cantidad y calidad comparables a las que se tenían antes del TARGA, sugiriendo una restauración de la respuesta más que un aumento *de novo* (111). Por todo ello el STI ha fracasado como terapia inmunomediada y únicamente ha permitido controles efectivos de la replicación viral a corto-medio plazo en un 20% de los pacientes que la realizan. Se ha sugerido que la falta de eficacia del STI es debida a una respuesta CD4⁺ anti-VIH débil y transitoria (195).

1.7. INTERRUPCIONES DEL TARGA

1.7.1. Estrategias de interrupción

A parte de la utilización del STI como inmunoterapia, desde que existe la disponibilidad del TARGA y con el aumento de los conocimientos de los riesgos de progresión de la infección y la imposibilidad de la erradicación del reservorio del VIH, se han elaborado diferentes estrategias de suspensión programada del TARGA con la intención de reducir el tiempo acumulado de tratamiento para disminuir sus repercusiones en diferentes ámbitos: efectos secundarios, costes económico, etc (196-198). Las metodologías de suspensión y los contextos en los que se han utilizado son diversos.

En pacientes multitratados y en fracaso terapéutico con virus multiresistentes se planteó la hipótesis que una suspensión del TARGA provocaría la reaparición del virus salvaje por tener éste una mayor capacidad replicativa o *fitness* viral, desplazando a las cuasiespecies multiresistentes. En ese momento y ante un virus salvaje, la reintroducción del TARGA podría volver a ser efectiva y mejorar el control de la replicación viral y la respuesta inmune. Sin embargo se ha demostrado que esta estrategia se acompaña de un deterioro inmunológico que, al darse en pacientes con infección avanzada, aumenta mucho el riesgo de eventos oportunistas (199).

Otro ámbito muy diferente es el de las interrupciones en pacientes que han respondido de forma satisfactoria al TARGA. En este contexto, últimamente se ha introducido el concepto de la interrupción “guiada” o “en pulsos”, en la que estos pacientes podrían suspender el TARGA y reiniciarlo sólo cuando tuvieran indicación de hacerlo basándose en el recuento de linfocitos T CD4⁺ y/o CV según las guías actuales. Los candidatos potenciales serían aquellos que iniciaron el TARGA basándose en las guías más agresivas y aquellos que hayan experimentado una reconstitución inmune sustancial tras el TARGA. Sin embargo los resultados preliminares derivados de ensayos importantes en los que se valoran estas estrategias y que han sido presentados de forma reciente demuestran que la metodología utilizada hasta ahora no ha sido eficaz. Así, en el estudio más grande en el que se explora la interrupción guiada por recuento linfocitario T CD4⁺, el SMART, se randomizaron un total de 5472

pacientes con TARGA y más de 350 linfocitos T CD4⁺/mm³ a seguir con el mismo tratamiento de forma convencional o a seguir una estrategia conservadora de fármacos guiada por el recuento de linfocitos T CD4⁺, en la que el TARGA se suspendía hasta que los linfocitos T CD4⁺ cayeran por debajo de 250 células/mm³, momento en el que se reiniciaba el TARGA hasta que el recuento volviese a ser superior a 350 células/mm³, volviendo entonces a suspenderse. El reclutamiento en el estudio tuvo que detenerse al observarse que la rama conservadora de fármacos guiada por linfocitos T CD4⁺ tenía un mayor riesgo de progresión de la enfermedad o muerte y eventos graves asociados a SIDA (200). Resultados similares se observaron en otro estudio con menor número de pacientes en el África sub-sahariana y con idénticos valores de recuento linfocitario T CD4⁺ para el inicio y la suspensión de tratamiento, el Trivacan (201). Otro estudio en el que el nivel de linfocitos T CD4⁺ necesario para reiniciar el TARGA fue superior (350 linfocitos T CD4⁺/mm³) mostró también mayores manifestaciones relacionadas con la infección por el VIH pero de tipo más leve (202). A la espera de nuevos resultados, lo que parece claro es que las estrategias de suspensión de TARGA guiadas por linfocitos T CD4⁺ no deberían mantenerse hasta niveles tan bajos de linfocitos T CD4⁺ (250 células/mm³) por los riesgos que entraña y se deberán explorar estrategias con dinteles superiores.

1.7.2. Consecuencia de las interrupciones

Los diferentes estudios realizados han permitido también conocer qué ocurre tras la interrupción del TARGA desde el punto de vista del virus y del paciente y su sistema inmunitario.

Ineludiblemente, tras la suspensión del TARGA se produce una elevación de la CV. Los pacientes con infección crónica por el VIH y CV indetectables por debajo de 50 copias/mL tienen un tiempo medio de 10 días para obtener 500 copias copias/mL tras la suspensión del TARGA, pudiendo observar CV detectables ya al tercer día de suspensión (113;203). Esto conlleva que las estrategias de interrupción puedan tener una serie de consecuencias negativas secundarias a esta elevación, como son el riesgo de que el TARGA fracase posteriormente en la resupresión de la replicación viral, la posibilidad del relleno de los reservorios celulares, o el

presentar un síndrome de primoinfección (204). Además, es muy importante el riesgo de desarrollo de resistencias, ya que al parar el tratamiento pueden coincidir niveles sub-óptimos de los fármacos con cierta replicación viral. Los estudios hasta la fecha coinciden que el riesgo más importante se da en aquellos pacientes que toman fármacos de vida media larga y con barrera genética baja, como pueden ser los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa o la lamivudina (197;205-210).

Por lo que respecta a los linfocitos T CD4⁺, vuelven a descender. Se ha descrito que este nuevo descenso ocurre en dos fases. Un descenso rápido inicial, de un mes según algunos autores (211) y de hasta 4 según otros (212), con una segunda fase de descenso más lento. Se ha correlacionado la velocidad del descenso de forma negativa con la CV plasmática basal (211;213), el recuento de linfocitos T CD4⁺ nadir (el menor recuento de linfocitos T CD4⁺ que hubiese experimentado el paciente) (211;212) y positiva con el recuento de linfocitos T CD4⁺ en el momento de la interrupción (211-213), los linfocitos T CD4⁺ ganados durante el TARGA (212;213) y la edad (213). Este descenso condiciona, de forma progresiva y sobre todo a partir de niveles bajos, riesgo de desarrollar infecciones oportunistas y eventos asociados a SIDA que pueden ser incluso letales (200). De ahí la importancia que cualquier interrupción sea estrechamente monitorizada. Existe además un riesgo, hoy por hoy más teórico que real, de que en la pérdida global de linfocitos T CD4⁺ se pierdan clones linfocitarios que se hubiesen retenido o recuperado y que después no se volviesen a recuperar con TARGA, lo que podría condicionar el sistema inmunitario del paciente de por vida.

2. VACUNACIÓN EN EL PACIENTE ADULTO CON INFECCIÓN POR EL VIH

2.1. INTRODUCCIÓN

Las personas infectadas por el VIH constituyen un grupo especial desde el punto de vista de las vacunaciones. Por un lado, aunque se encuentren en buena situación inmunológica, se consideran pacientes inmunodeprimidos. Y dado que su compromiso inmunológico incrementa su riesgo a padecer enfermedades infecciosas, deben recibir una adecuada cobertura vacunal. Sin embargo, hay que considerar que las personas infectadas por el VIH tienen algunas características especiales que condicionan su respuesta a las vacunas y que se deberán tener en cuenta a la hora de indicar su administración o no.

2.2. DEFINICIONES

Por **vacunación** o, más correctamente, **inmunización activa**, entendemos la inducción deliberada de inmunidad adaptativa frente a un germen patógeno mediante la administración de una vacuna. Dicho procedimiento tiene por objeto la inducción de una respuesta inmunitaria específica similar a la inducida por la exposición natural al agente infeccioso, pero sin que el individuo vacunado presente signos o síntomas de la enfermedad (214).

El término **vacuna** se refiere a una preparación de organismos vivos (usualmente atenuados), de organismos inactivados, o de sus constituyentes antigénicos que han sido formulados para estimular la inmunidad específica (215).

El término **toxoides** se refiere a una preparación modificada de una toxina bacteriana de forma que no es tóxica pero retiene sus propiedades antigénicas y puede evocar respuestas neutralizantes contra la toxina nativa (215).

2.3. CLASIFICACIÓN DE LAS VACUNAS

Las vacunas se pueden clasificar de diferentes formas (216):

A. Según el tipo de antígeno.

1. Vacunas de microorganismos vivos: También llamadas atenuadas, están formadas por mutantes avirulentas del microorganismo causante de la enfermedad. La vacuna intenta reproducir la infección de una forma controlada y obtener una inmunidad similar a la producida por la enfermedad o la infección natural. Suelen producir una inmunidad mayor a la producida por microorganismos muertos. Ejemplos de estas vacunas son la triple vírica (sarampión-rubéola-parotiditis), varicela, viruela, fiebre amarilla, poliomelitis oral, cólera oral o la de la tuberculosis [Bacillus Calmette-Guerin (BCG)].

2. Vacunas de microorganismos muertos: También se denominan inactivadas y pueden ser:

a. *Vacunas de microorganismos totales*: Se administra un preparado que contiene el germen muerto, pero entero. Se utiliza cuando no se conoce con exactitud cuál es el antígeno que da la respuesta protectora o cuando su purificación no es la adecuada. Ejemplos son la antigua vacuna celular completa de la tos ferina o la de la gripe.

b. *Vacunas de antígeno purificado*: Solamente se utilizan los antígenos que intervienen en la respuesta inmunitaria. Ejemplos son la vacuna de la hepatitis B, que contiene el antígeno de superficie del virus.

c. *Vacunas de anatoxinas*: Algunas bacterias producen sustancias tóxicas de tipo proteico. Estas proteínas, tratadas de forma adecuada, pierden su poder tóxico pero continúan teniendo capacidad de producir una respuesta inmune. Se denominan entonces anatoxinas o toxoides. Ejemplos son las vacunas del tétanos y difteria.

B. Según la composición.

1. Vacunas monovalentes: Son las que contienen solamente un antígeno. Ejemplos son la vacuna del sarampión, hepatitis B, hepatitis A o varicela.

2. Vacunas polivalentes: Cuando un microorganismo puede presentar diferentes tipos antigénicos y los anticuerpos producidos contra un tipo antigénico no son activos frente a los

otros, es necesario que la vacuna tenga en su composición todos estos diferentes antígenos para que induzca una respuesta protectora adecuada. Ejemplo es la vacuna del neumococo, para 23 serotipos.

3. Vacunas combinadas: En este caso la vacuna contiene también más de un antígeno, pero éstos pertenecen a diferentes microorganismos. De esta manera, en un solo acto vacunal (un solo pinchazo) se puede vacunar al individuo contra diferentes enfermedades. Ejemplos son la vacuna triple vírica, que incluye sarampión-rubéola-parotiditis o la de tétanos-difteria (Td).

C. Clasificación sanitaria.

1. Vacunas sistemáticas:

Figura I.2.1. Calendario de vacunación sistemática actual en Cataluña (216)

Vacuna Edad	DTPa ¹ (Difteria, Tétanos, Pertussis acelular)	Poliomielitis	Haemophilus influenzae b	Meningocócica C conjugada	Hepatitis B	Triple vírica (Sarampión, Rubéola, Parotiditis)	Td ² (Tétanos, Difteria)
2 meses	X	X	X	X	X		
4 meses	X	X	X	X	X		
6 meses	X	X	X	X	X		
15 meses						X	
18 meses	X	X	X				
4 años						X	
4-6 años	X						
12 años					X ³		
14-16 años							X

¹ Se administrará DTP acelular en todas las dosis hasta los 6 años

² A partir de los 7 años se administra la Td en lugar de la DTPa

³ Hasta el curso 2013-2014 se continuará aplicando la vacunación antihepatítica

Son las que están indicadas para toda la población, a partir de la edad infantil, y se aplican de acuerdo con los calendarios de vacunación decididos en cada país o región competente. Actualmente, las vacunas sistemáticas y el calendario para aplicarlas en Cataluña están establecidos como se recoge en la **Figura I.2.1**.

2. Vacunas no sistemáticas: Son las que están indicadas sólo para determinados grupos o en situaciones especiales. No están incluidas en los calendarios de vacunaciones y se aplican tanto a niños como adultos. Diversas situaciones pueden hacer recomendable la aplicación selectiva de determinadas vacunaciones como la profesión, determinadas situaciones clínicas, viajes a determinadas zonas, situaciones epidémicas o determinados estilos de vida que comportan un riesgo determinado.

La clasificación sanitaria la establecen las autoridades sanitarias de acuerdo con la situación epidemiológica de cada zona y la disponibilidad de las vacunas, y se modifica en el tiempo según los cambios en la epidemiología, las variaciones en las vacunas y la posibilidad de administrarlas.

2.4. VACUNACIÓN DEL ADULTO

2.4.1. Causas de vacunación del adulto

Aunque la vacunación es una intervención de importancia especial en la infancia, ha de cubrir, como instrumento de promoción de la salud, la totalidad de la vida y ha de ser una práctica de rutina en la atención sanitaria del adulto. Se consideran incluidos en las recomendaciones para adultos los individuos de más de 16 años, edad en la que finalizan las recomendaciones de vacunación del calendario infantil.

La población adulta puede requerir vacunarse por diferentes motivos:

- Vacunas no sistemáticas por circunstancias determinadas epidemiológicas, laborales...
- Vacunas sistemáticas que no se administraran en su momento. Las políticas poblacionales de vacunación son muy recientes, lo que significa que en el momento actual

existen algunas cohortes de población adulta, las anteriores a las vacunadas, que no se beneficiaron de esta medida de control. Además, en muchos casos, se les dificultó entrar en contacto, a la edad en que era habitual, con el agente infeccioso y desarrollar la enfermedad y la inmunidad consecuente (Figura I.2.2.).

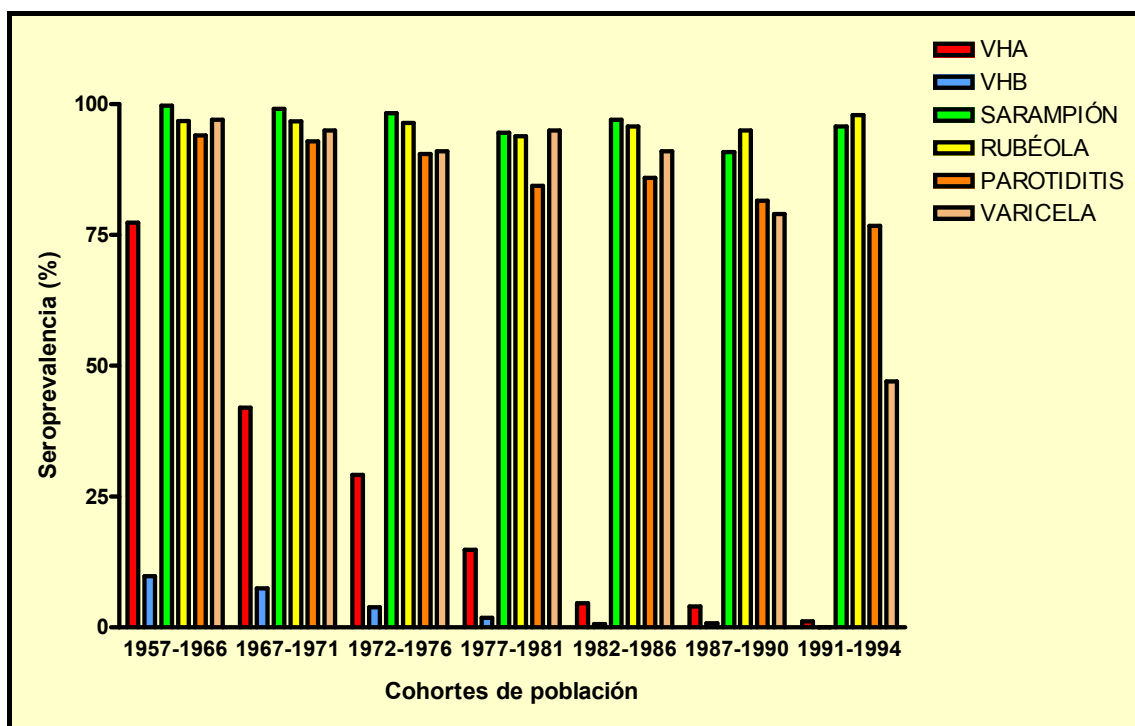


Figura I.2.2. Prevalencia de serologías frente a diferentes agentes en función de la fecha de nacimiento en España. VHA: Virus hepatitis A, VHB: Virus hepatitis B (Fuente: Ministerio de Sanidad y Consumo (217))

- Vacunas sistemáticas que requieran dosis de recuerdo. Algunas vacunaciones administradas en la infancia, no inducen inmunidad duradera para toda la vida, por lo que si los programas no se refuerzan con dosis posteriores al cabo de los años, las personas vacunadas se vuelven de nuevo susceptibles y por lo tanto con riesgo de enfermar. Son la antitetánica y la antidiftérica.

- Vacunas sistemáticas por edad avanzada. Las personas mayores de 65 años deben ser inmunizadas de forma rutinaria con vacunas no incluidas en el calendario sistemático como la antigripal y la antineumocócica.

2.4.2. Vacunas recomendadas a adultos

Dentro de las vacunaciones recomendadas a adultos en España y Cataluña (216;217) encontramos (**Figura I.2.3.**):

Vacuna ▼	Grupo de edad ▶	19-49 años	50-64 años	≥ 65 años
Tétanos-difteria		1 dosis de recuerdo cada 10 años		
Sarampión-rubéola-parotiditis		1 ó 2 dosis	1 dosis	
Varicela		2 dosis (0, 4-8 semanas) *	2 dosis (0, 4-8 semanas)	
Gripe		1 dosis anual	*	1 dosis anual
Neumococo		1-2 dosis		1 dosis
Hepatitis A		2 dosis (0, 6-12 meses, ó 0, 6-18 meses)		
Hepatitis B		3 dosis (0, 1-2, 4-6 meses)		
Meningococo*		1 ó más dosis		

Para todas las personas en ese grupo que no tienen evidencia de inmunidad al antígeno (no vacunación o infección previa)
 Sólo recomendada si existe algún factor de riesgo (ocupacional, médico, estilo de vida, ..)
 * En los Estados Unidos
 - . - . - Las vacunas bajo la línea son para poblaciones seleccionadas

Figura I.2.3. Calendario vacunal recomendado del adulto. Modificado de las referencias (216-219). Para más información, ver texto.

2.4.2.1. Vacuna de la hepatitis A

La infección por el virus de la hepatitis A (VHA) es más frecuente en las regiones con peor sanidad e higiene, de forma que en los países desarrollados como el nuestro los aumentos en los niveles socioeconómicos han llevado a una menor incidencia de la infección entre la población joven y, por tanto, una menor prevalencia de anticuerpos protectores en la población adulta (220). Como consecuencia de este cambio, los adultos expuestos tienen un aumento del riesgo de infección por VHA, causando un aumento paradójico en la morbilidad y mortalidad. En España la incidencia ha descendido desde una tasa de 4,6 por 100.000 habitantes (1813 casos) en 1997 a 1,8 por 100.000 habitantes (699 casos) en el 2003, si bien hay que tener en cuenta la infranotificación de esta enfermedad y el gran porcentaje de infecciones asintomáticas (217) (**Figura I.2.2.**).

Existen diferentes vacunas comercializadas en España, que contienen VHA inactivado con formaldehído y adsorbidos en aluminio. Todas son altamente inmunogénicas, desarrollando anticuerpos en el 94-100% de los casos un mes después de la primera dosis (221), y en el 100% después de la segunda dosis. Diversos estudios han demostrado persistencia de los anticuerpos ant-VHA tras más de 10 años después de recibir la última dosis.

Actualmente debe recomendarse como profilaxis pre-exposición a las personas que tienen un aumento de riesgo para hepatitis A o en las que la infección ocasiona graves consecuencias:

- Viajeros que se desplazan a zonas de alta o moderada endemicidad de hepatitis A.
- Personas que padecen procesos hepáticos crónicos o hepatitis B o C (aunque no tienen un mayor riesgo de infección, tienen un mayor riesgo de hepatitis A fulminante).
- Pacientes hemofílicos que reciben hemoderivados y pacientes candidatos a trasplante de órganos.
- Familiares o cuidadores que tengan contacto directo con pacientes con hepatitis A.
- Personas infectadas con el VIH (en Cataluña y Estados Unidos sólo si tienen indicación por otro motivo).
- Personas con estilos de vida que conllevan un mayor riesgo de infección: varones homosexuales que tengan contactos sexuales múltiples, y usuarios de drogas por vía parenteral.
- Personas con mayor riesgo ocupacional: trabajadores en contacto con aguas residuales no depuradas.
- Recomendaciones en situaciones especiales: manipuladores de alimentos, personal que trabaja en guarderías infantiles (0-3 años), y personal médico y paramédico de hospitales e instituciones asistenciales.
- En algunos países como Estados Unidos se incluye todo aquel individuo que quiera vacunarse.

Se recomienda la realización de marcadores previos de infección en aquellas personas que tienen una alta probabilidad de no tener inmunidad y siempre que se disponga del tiempo suficiente para realizar el estudio, sobre todo en los nacidos a partir del 1966. En los más

jóvenes es preferible la vacunación directa. La excelente respuesta a la vacunación no hace necesario el examen de anticuerpos postvacunales de forma rutinaria.

2.4.2.2. Vacuna de la hepatitis B

En España, la incidencia de infección por el virus de la hepatitis B (VHB) en el año 2003 fue de 1,9 por 100.000 habitantes (783 casos).

Existen diferentes vacunas inactivadas comercializadas preparadas con el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) obtenido por técnicas de recombinación genética que inducen producción de anticuerpos anti-HBsAg indicativos de inmunidad. La pauta básica de vacunación es de tres dosis administradas según el esquema de meses 0-1-6 o cualquier otro que respete el intervalo mínimo de un mes entre la primera y la segunda dosis de vacuna y un mínimo de 2 meses entre la segunda y la tercera dosis. En determinadas situaciones en las que sea necesario una inmunización rápida se puede emplear la pauta rápida 0-1-2. Dado que en esta pauta los títulos finales pueden ser más bajos, se recomienda una cuarta dosis a los 6-12 meses de la primera.

Cuando se ha interrumpido la vacunación, motivando un intervalo más largo del recomendado, sea cual sea el intervalo máximo, no es necesario volver a comenzar la serie de vacunación ni realizar examen serológico postvacunal.

La inmunogenicidad es muy elevada, induciendo anticuerpos protectores en más del 90% de los adultos sanos (títulos ≥ 10 mUI/mL de anti-HBsAg por ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay* o análisis de inmunoabsorción vinculado a enzimas) un mes después de finalizar la serie) (222). Los anticuerpos inducidos declinan gradualmente con el tiempo y hasta el 60% de las personas que respondieron inicialmente a la vacunación pueden perder los anticuerpos detectables a los 12 años (222). Sin embargo, la inmunidad no se pierde aunque los anticuerpos bajen o desaparezcan, dada la persistencia de memoria inmunológica (223). Por este motivo no están recomendadas dosis de recuerdo en personas inmunocompetentes.

En función de la respuesta inmunológica que tiene una persona tras la administración de la vacuna de hepatitis, se habla de respondedor (tras una o dos series completas de vacuna de VHB ha desarrollado una seroconversión postvacunal con títulos protectores; si tras una serie completa no consigue estos niveles, se administrará otra serie completa y se volverán a pedir anticuerpos antiHBsAg después de 1-2 meses); o no respondedor. En este último caso, y si no tiene el HBsAg, tiene que ser considerado susceptible a la infección y debe recibir el consejo para extremar las precauciones para prevenirla, e informado de la necesidad de administrarse inmunoglobulina antihepatitis B de forma profiláctica ante cada exposición. No se consideran necesarias dosis de recuerdo. Se están utilizando vacunas recombinantes que contienen proteína pre-S que induce la proliferación de anticuerpos en personas no respondedoras.

En la actualidad la vacunación frente al VHB en el programa de inmunización infantil se aplica en todas las Comunidades Autónomas en el recién nacido. La vacunación selectiva, en adultos, está indicada en los siguientes grupos de riesgo:

- Personas que por su ocupación (profesionales sanitarios y estudiantes de ciencias de la salud) están expuestas frecuentemente a sangre o productos sanguíneos o fluidos corporales que pueden contener virus.
- Profesionales potencialmente expuestos a material contaminado (policía, bomberos, población de Instituciones Penitenciarias y personal que trabaja en contacto con ella,)
- Personas deficientes mentales que están acogidas en instituciones y personal que trabaja en contacto con ellas.
- Convivientes y contactos sexuales de personas con infección aguda o crónica por el VHB.
- Hemofílicos y otros receptores habituales de transfusiones de sangres u otros hemoderivados.
- Pacientes sometidos a prediálisis y hemodiálisis (que requerirán doble dosis).
- Pacientes en programas de trasplantes.
- Personas infectadas por el VIH.

- Personas con hepatopatía crónica en las cuales la infección puede presentar un curso desfavorable.

- Personas que se practican punciones cutáneas frecuentes, no controladas, como los adictos a drogas por vía parenteral (ADVP).

- Población que cambia frecuentemente de pareja (homo y heterosexuales). Según las autoridades estadounidenses [los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) del departamento de salud americano (DHHS)], serían aquellas que han tenido más de una pareja sexual en los 6 meses previos o que han tenido enfermedades de transmisión sexual recientemente.

- Viajeros desde zonas de baja incidencia a regiones hiperendémicas.

- Pacientes en programa de trasplante.

- Situaciones de profilaxis post-exposición.

La determinación de marcadores prevacunales específicos frente al VHB no está indicada de forma rutinaria en niños y adolescentes, pero puede considerarse en el caso de adultos que pertenezcan a determinados grupos de riesgo con alta tasa de infección por VHB [prevalencia superior al 20% de anticuerpos frente al antígeno del core del VHB (HBcAg)].

La determinación rutinaria de marcadores postvacunales no está recomendada, pero deben realizarse en pacientes en hemodiálisis, infección por el VIH, personas con riesgo ocupacional (contacto con sangre), pacientes inmunocomprometidos con riesgo de exposición al VHB, contactos sexuales habituales o contactos familiares con personas con HBsAg positivo. En Cataluña también está indicado si se espera una mala respuesta por la edad (>30 años).

2.4.2.3. *Vacuna de la gripe*

Todas las personas, independientemente del estado de salud, tienen riesgo de desarrollar una gripe grave, neumonía, hospitalización y muerte debido a gripe. Se estima que 1 de cada 10 personas de media visitan a un médico por causa de la gripe durante los periodos de epidemia (224). Aunque el riesgo concreto varía cada año, una persona será probablemente infectada por un virus gripal cada 3-4 años aproximadamente (224).

En España la gripe ocasiona alrededor de 3000 defunciones anuales. La OMS ha establecido una Red de Vigilancia para establecer con carácter anual recomendaciones para la composición de la vacuna antigripal. Posteriormente un grupo de expertos de la Unión Europea adopta una decisión sobre las cepas de virus de gripe recomendados para la producción de la vacuna en la siguiente campaña de vacunación, teniendo en cuenta la situación epidemiológica de la gripe en la Unión. Y finalmente, la Agencia Española del Medicamento emite una circular con las recomendaciones de la vacuna de la gripe para la siguiente temporada.

Existen diferentes vacunas comercializadas, que se fabrican a partir de virus cultivados en huevos embrionados de gallina que posteriormente son inactivados. La vacuna de la gripe contiene tres cepas (dos tipo A y una tipo B) que representan los virus que más probablemente circulen en el invierno siguiente.

Si se da una buena coincidencia antigénica entre las cepas de la vacuna y las circulantes, la vacuna muestra una eficacia frente a la enfermedad confirmada por laboratorio de aproximadamente un 70-90% en adultos sanos.

Las recomendaciones actuales de utilización de estas vacunas incluyen los siguientes grupos de riesgo:

A. Grupos con alto riesgo de padecer complicaciones gripales:

1. Personas de 65 o más años de edad. En algunas Comunidades Autónomas se ha ampliado la edad de vacunación a los 60 años.

2. Ingresados en residencias de ancianos o en otros centros que prestan asistencia a enfermos crónicos de cualquier edad.

3. Adultos con enfermedades crónicas cardiovasculares o pulmonares.

4. Adultos que hayan precisado seguimiento médico periódico u hospitalización en el año precedente, por enfermedades metabólicas crónicas (incluyendo diabetes mellitus), insuficiencia renal, hemoblobinopatías o inmunosupresión (incluyendo la originada por fármacos).

B. Grupos que pueden transmitir la gripe a personas con alto riesgo de complicaciones gripales:

1. Personas que proporcionen cuidados domiciliarios a pacientes de alto riesgo.
2. Convivientes en el hogar de personas de alto riesgo.
3. Personal que en su trabajo atienden a personas de alto riesgo o que prestan servicios comunitarios esenciales.

C. Otros grupos en los que se recomienda la vacunación:

1. Estudiantes y otras personas en centros institucionales que comparten dormitorios comunes.

2. Personas infectadas por el VIH.

3. Personas de alto riesgo, antes de un viaje al extranjero.

4. Población general: La vacuna antigripal no está indicada para toda la población, pero se puede administrar a toda persona que desee minimizar el riesgo de enfermedad.

5. Embarazo: Se recomienda la vacunación antigripal en las embarazadas que se pueden encontrar en el segundo o tercer trimestre del embarazo durante la temporada gripal (en Cataluña y Estados Unidos (216;219)).

6. En Estados Unidos también está indicada en cualquier condición que compromete la función respiratoria o el manejo de las secreciones respiratorias o que puede aumentar el riesgo de aspiración (deterioro cognitivo, daño medular, epilepsia, trastornos neuromusculares).

7. En los pacientes con asplenia no hay datos de que la gripe sea más grave, pero como es un factor de riesgo para infecciones bacterianas secundarias, se recomienda.

2.4.2.4. *Vacuna de la varicela*

La varicela es una infección exantemática que resulta más grave con la edad y en estados de inmunosupresión. Se producen complicaciones en un 5% de la población general,

con una mortalidad de 2/100.000, y un 32% de los inmunocomprometidos (con una mortalidad del 7-20% en éstos). En el año 2003 se notificaron 177.603 casos (tasa de incidencia de 448,4 casos por 100.000 habitantes).

En España existen dos vacunas comercializadas de varicela, ambas obtenidas a partir de virus atenuado conseguido a partir de cultivos en células diploides humanas MRC5 de la cepa Oka del virus varicela zoster (VVZ). La eficacia frente a cualquier forma de varicela en adultos con dos dosis es del 76%-100% desde los 22 meses a los 9 años.

Hasta los 13 años se administra una sola dosis de vacuna, pero en mayores de trece años y en inmunodeprimidos en los que esté indicada la vacunación se aplicarán dos dosis separadas por 6-8 semanas.

Las recomendaciones de la vacunación para adultos en nuestro medio son:

- Personal sanitario susceptible, para reducir el riesgo de transmisión del virus a los pacientes de alto riesgo.
- Post-exposición en personas susceptibles, administrada los tres días siguientes.
- Pacientes afectos de leucemia linfoblástica aguda o con tumores sólidos malignos que cumplan unos determinados criterios de recuento hematológico.
- Pacientes con enfermedades crónicas sin afectación inmunitaria.
- Enfermos que esperan un transplante de órgano sólido hasta 4 semanas antes del inicio de tratamiento inmunosupresor.
- Mujeres en edad fértil susceptibles de contraer la enfermedad.
- Personas susceptibles en contacto con inmunodeprimidos o con individuos que tengan posible riesgo de complicaciones graves si padecen varicela, incluyendo familiares, cuidadores, personal de escuelas de 0-3 años y educación infantil, primaria y secundaria.

2.4.2.5. *Vacuna de sarampión-rubéola-parotiditis*

Las tres enfermedades han experimentado un descenso en su incidencia gracias a la consolidación de los programas de vacunación, con una incidencia anual en el 2003 de 0,59, 0,29 y 4,1 casos por 100.000 habitantes para sarampión, rubéola y parotiditis respectivamente.

En España, la vacuna más ampliamente utilizada es la vacuna combinada de sarampión, rubéola y parotiditis que contiene virus vivos atenuados aprotógenos. Induce anticuerpos protectores detectables en el 96-98% de los vacunados, con una inmunidad tan sólida como la inducida por la infección natural, tanto celular como humoral. No hay evidencia del incremento del riesgo de reacciones adversas por vacunar a personas que ya son inmunes a algunas de estas enfermedades. La vacunación suprime la inmunidad celular, durando esta supresión aproximadamente 4 semanas (225).

Actualmente la vacunación está recomendada para los adultos no vacunados o sin historia documentada previa de enfermedad y que no tengan contraindicación médica (con carácter general, se puede delimitar la recomendación a las cohortes nacidas con posterioridad a 1971 en base a los resultados de la Encuesta Nacional de Seroprevalencia realizada en 1996) **(Figura I.2.2.)**.

Debido al riesgo teórico sobre el desarrollo del feto, no debe administrarse en mujeres embarazadas y deberá evitarse el embarazo en las 4 semanas posteriores a la vacunación.

2.4.2.6. Vacuna de neumococo

En España las infecciones invasoras por *S. pneumoniae* sufrieron un incremento a partir del año 1995, afectando más a los mayores de 64 años, seguidos de los de 45 a 64 años (217).

Actualmente se encuentran autorizadas y comercializadas en España dos tipos de vacunas: vacunas de polisacáridos y vacunas conjugadas, pero para adultos sólo se utilizan las vacunas de polisacáridos. Son vacunas inactivadas constituidas por antígenos polisacáridos capsulares purificados de los neumococos serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10 A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F, y 33F (nomenclatura danesa) ó 1, 2, 3, 4, 5, 26, 51, 8, 9, 68, 34, 43, 12, 14, 54, 17, 56, 19, 57, 20, 22, 23, y 70 (nomenclatura americana) (23 valencias) que cubren del 85 al 90% de los serotipos de neumococo causantes de enfermedad invasora en los países desarrollados. La estabilidad en la producción de anticuerpos así como el título alcanzado es diferente para cada uno de los serotipos.

La eficacia de la vacuna de neumococo es muy difícil de establecer, pues en el fondo es una combinación de 23 vacunas. La literatura al respecto es controvertida, con estudios que demuestran protección y otros que no (226-229), atribuyendo las diferencias a disparidades en el diseño y en el poder de los ensayos. Se han reconocido además limitaciones de las vacunas clásicas frente a neumococo como que algunos serotipos incluidos son poco inmunógenos, que los niveles de anticuerpos específicos declinan sustancialmente después de 5-10 años y que la respuesta inmunológica producida es independiente de células T, por lo que no inducen memoria inmunológica.

Recientemente la OMS ha publicado un documento sobre las vacunas de neumococo que recoge que la vacuna no induce memoria inmunológica y que no es eficaz para inducir inmunidad de mucosas, objetivándose en estudios observacionales una eficacia entre el 55-60% frente a enfermedad invasora en adultos (230).

La duración de la protección tras la inmunización con las vacunas de polisacáridos se estima en 5 años, o más, en personas sanas. Sin embargo, la duración puede ser menor en grupos de alto riesgo para enfermedad neumocócica.

En España se recomienda la vacunación en (Circular de la Agencia Española del Medicamento del Ministerio de Sanidad y Consumo (nº7/2001)):

- Personas mayores de 2 años inmunocompetentes con riesgo de enfermedad neumocócica o sus complicaciones debido a enfermedades crónicas (cardiovasculares, respiratorias, diabetes mellitus, cirrosis y otras hepatopatías, alcoholismo, fístulas cerebroespinales).
- Personas mayores de 2 años inmunocomprometidas con riesgo de enfermedad neumocócica o sus complicaciones (asplenia anatómica o funcional, enfermedad de Hodgkin, linfoma, mieloma múltiple, insuficiencia renal, síndrome nefrótico, anemia falciforme, o en circunstancias específicas como trasplante de órganos asociados con inmunosupresión).
- Personas con infección por VIH sintomática o asintomática.
- Personas con implante coclear o que van a recibir uno.
- Personas ancianas que viven en instituciones cerradas.

- Algunas comunidades Autónomas (como Cataluña) incluyen la vacunación sistemática a la población ≥ 60 años de edad (216).

- En determinadas condiciones (pacientes que han de ser esplenectomizados, pacientes con cáncer que han de iniciar quimioterapia o tratamiento inmunosupresor, y pacientes que han de ser transplantados) la vacuna ha de ser aplicada como mínimo dos semanas antes del procedimiento.

La revacunación no se recomienda de forma rutinaria. Sólo se administrará una dosis en personas vacunadas hace más de 5 años y en las siguientes circunstancias:

- Personas mayores de 65 años que recibieron por alguna indicación especial la primera dosis antes de los 65 años.

- Personas con alto riesgo de infección neumocócica grave (asplenia, fallo renal crónico, síndrome nefrótico u otras condiciones asociadas con inmunosupresión).

2.4.2.7. Vacuna de difteria y tétanos:

En España se han notificado a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica una media anual de 25 casos de tétanos en los últimos años, que ocurren fundamentalmente en adultos mayores no vacunados, aunque es muy probable que haya una infranotificación. Por otro lado, en 1986 se notificaron los dos últimos casos de difteria en España.

La vacuna antitetánica es un potente inmunógeno. La vacunación durante la edad infantil origina una respuesta protectora en prácticamente todos los vacunados. En adultos la respuesta es menos intensa que en niños, pero la administración de la vacuna de acuerdo con las pautas recomendadas produce en la gran mayoría de los casos un nivel de protección adecuado.

En la actualidad se administra la vacuna como dosis de refuerzo cada 10 años después de los 14 años de edad en forma de tétanos y difteria de adultos (Td). La vacuna Td es una vacuna inactivada preparada con los toxoides (anatoxinas) diftérico y tetánico adsorbidos sobre partículas de hidróxido de aluminio. La vacuna Td para adultos presenta una dosis de anatoxina diftérica inferior a la dosis utilizada para niños.

La pauta de primovacunación consiste en la administración de 3 dosis, con un intervalo de 1-2 meses entre las dos primeras dosis (mínimo 4 semanas) y de 6 a 12 meses entre la segunda y la tercera. En el caso de adultos que tengan una primovacunación incompleta, en general no es necesario reiniciar la pauta de vacunación y sólo será necesario completar el número de dosis pendientes, independientemente del tiempo transcurrido desde la última dosis, hasta completar las tres dosis recomendadas.

Las recomendaciones en adultos incluyen todos los adultos, con la primovacunación en no vacunados, completar la primovacunación los que no la hubiesen finalizado y administrar las dosis de recuerdo en los que realizaron una primovacunación completa.

2.4.2.8. Otras vacunas recomendadas

- **Fiebre tifoidea:** Existe una vacuna inactivada parenteral (preparada a partir del polisacárido Vi purificado de *Salmonella typhi*) y una oral viva atenuada (a partir de una mutante avirulenta de *Salmonella Typha*, cepa Ty21a. Se han de vacunar las personas que viajen a países o zonas endémicas con elevada incidencia de fiebre tifoidea, sobre todo si desarrollan actividades de riesgo. Y también el personal de laboratorio en contacto frecuente con cepas de *S. typhi*.

- **Fiebre amarilla:** Es una vacuna atenuada obtenida a partir de la cepa apatógena 17D, cultivada en huevos de gallina embrionados. Indicada en población residente en zonas endémicas o epidémicas, viajeros a estas zonas y personal de laboratorio expuesto al virus.

- **Tos ferina:** La infección tiene una baja incidencia en España (1,3 casos por 100.000 habitantes en el 2003). Actualmente en España se recomienda el uso de esta vacuna en adultos exclusivamente en el personal sanitario que atiende a niños prematuros y a recién nacidos que precisen hospitalización, para evitar la transmisión de la infección a niños en los que la enfermedad puede dar lugar a complicaciones más graves.

- **Antipoliomielítica:** Existe una forma vacunal oral trivalente tipo Sabin, atenuada, preparada a partir de cepas apatógenas de los poliovirus 1, 2 y 3, y una vacuna inactivada preparada a partir de cultivos de los mismos poliovirus, con potencia aumentada en relación con la vacuna tipo Salk clásica. Está indicada en la vacunación sistemática.

- **Haemophilus influenzae tipo b:** Es una vacuna inactivada constituida por el polisacárido capsular purificado del Haemophilus influenzae tipo b, poliribosil-ribitol-fosfato, conjugado con una proteína portadora (diferente según el producto comercial). Sus indicaciones son la vacunación selectiva en mayores de 5 años sólo en casos de enfermedades o situaciones que se asocien a un incremento del riesgo de sufrir una infección por esta bacteria (asplenia anatómica o funcional, déficit de inmunoglobulina IgG₂, pacientes sometidos a transplante...). En estos pacientes hay que administrar dos dosis separadas por un intervalo de un mes.

- **Antimeningocócica:** Ya sea la A+C o la conjugada C, son vacunas inactivadas a partir de antígenos capsulares de *Neisseria meningitidis*. Sus indicaciones serán situaciones clínicas de riesgo (personas con déficit de properdina o de los componentes terminales del complemento; pacientes con asplenia anatómica o funcional), viajeros que vayan a regiones con enfermedad epidémica o hiperendémica, y contactos de casos esporádicos.

- **Antirrábica:** Es una vacuna inactivada obtenida a partir de cepas de virus rábico cultivado en células diploides humanas, indicada en profesionales potencialmente expuestos (trabajadores de Zoológicos,...) y en viajeros a zonas enzoóticas, especialmente fuera de las rutas turísticas, así como en situaciones postexposición. En personas inmunodeprimidas puede realizarse una determinación del nivel de anticuerpos neutralizantes 2-4 semanas después de la vacunación; si el título es inferior a 0,5 UI/ml está justificado administrar una dosis de refuerzo.

- **Anticolérica:** Existe una presentación inactivada [suspensión de *Vibrio cholerae* inactivado y la subunidad B (WC-BS)] y una atenuada (microorganismos vivos de la cepa

apatógena CVD 103-HgR), ambas por vía oral. Está indicada en la prevención del cólera en grupos o zonas de riesgo.

2.5. CONTRAINDICACIONES GENERALES DE LAS VACUNAS

Una vacuna está contraindicada cuando el riesgo de reacciones adversas que se puedan producir con su administración sea superior al riesgo inherente de padecer la enfermedad.

Con las vacunas actuales, altamente purificadas y controladas de forma estricta, el número de reacciones adversas es muy reducido. Por otro lado, hay supuestas contraindicaciones basadas en consideraciones teóricas, que en muchos casos no se han confirmado. En consecuencia, el número de contraindicaciones verdaderas es, en la práctica, muy limitado. Las contraindicaciones más importantes que hay que señalar son:

1. Enfermedades en fase aguda. Las vacunas están contraindicadas en el curso de enfermedades graves o de gravedad media en fase aguda, febriles o no febriles. Por el contrario, los procesos respiratorios o digestivos benignos, afebriles o con ligera febrícula, no constituyen una contraindicación.

2. Hipersensibilidad a los componentes de la vacuna. Las vacunas contienen diversas sustancias que potencialmente pueden actuar como alérgenos: el mismo antígeno vacunal, elementos utilizados en su preparación (medios de cultivo, etc), antibióticos, conservantes y excipientes. Todos constan en la composición de cada vacuna. La hipersensibilidad de tipo anafiláctico a cualquiera de los componentes de la vacuna contraindica su aplicación. Los antecedentes generales de alergia, las alergias de contacto y las reacciones locales o generales leves que no son de tipo anafiláctico no constituyen contraindicaciones a la vacunación.

3. Alteraciones inmunitarias. Como se comenta ampliamente con posterioridad, estados de inmunosupresión grave pueden condicionar que el paciente desarrolle el cuadro infeccioso que se pretende prevenir, inducido por la misma vacuna cuando ésta sea de microorganismos vivos, aunque sean atenuadas.

2.6. BASES INMUNOLÓGICAS DE LAS VACUNACIONES

2.6.1. Inducción de respuestas vacunales

Las vacunas ejercen su efecto aumentando los títulos de anticuerpos antígeno-específicos pero también estimulando una serie de cambios celulares en las poblaciones linfocitarias T y B (231).

De hecho, para que una vacuna alcance una inmunogenicidad y eficacia óptimas debe reunir 4 requisitos inmunológicos fundamentales (232) que son la activación de las células presentadoras del antígeno, la generación de un gran compartimiento de linfocitos T y B memoria, la capacidad de superar el polimorfismo genético del MHC en la población y de la variación antigénica del agente, y la capacidad de que el antígeno vacunal persista en la superficie de las células dendríticas foliculares de los órganos linfoides secundarios para facilitar la formación continuada de células plasmáticas productoras de anticuerpos. Así será capaz de inducir una respuesta inmunitaria de larga duración que incluya anticuerpos neutralizantes, respuestas de linfocitos citotóxicos y linfocitos cooperadores. Es probable que de las vacunas actualmente comercializadas, sólo las vivas atenuadas cumplan todas estas características.

2.6.2. Respuesta celular a la administración de vacunas

La expresión de diversos receptores y ligandos en la superficie de los linfocitos cambia como resultado de la exposición antigénica del sistema inmune. La diferenciación de subtipos de linfocitos antígeno-específicos está marcada por cambios en las glicoproteínas de la superficie celular. El CD45 (antígeno común de leucocitos) se expresa en las diferentes isoformas en la superficie de los linfocitos T y B. El CD45RA (peso molecular de 200.000 a 220.000 Da) y CD45RO (peso molecular 180.000 Da) son las isoformas CD45 mejor caracterizadas expresadas en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (233;234). Los linfocitos que expresan CD45RA son células T *naïve* que, cuando se activan en presencia de su antígeno específico, natural o vacunal, cambian a expresar la molécula más pequeña CD45RO como fenotipo memoria (235-237). CD45RARO se ha identificado como el fenotipo de células en la

transición, debido a la precoz expresión de la isoforma CD45RO y el relativo retraso en la pérdida del CD45RA de la superficie durante la estimulación (238;239).

La vacunación o la misma exposición al agente infeccioso vivo produce entonces cambios en la expresión de las isoformas CD45, de forma que los pacientes vacunados muestran mayor proporción de linfocitos T CD4⁺CD45RO⁺ y descenso de los CD4⁺CD45RA⁺ tras sólo 6 días de estimulación *ex vivo* con antígenos de influenza (231).

En su activación, las células T memoria producen una variedad de citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, e IFN- γ), mientras que las células T *naïve* producen principalmente IL-2 (238;240-244). La IL-2 producida por cualquiera de las subpoblaciones celulares T estimula la proliferación de células T antígeno específicas.

Recientemente se ha descrito que existen 2 tipos de células de memoria: las centrales (T_{CM}) y las efectoras (T_{EM}) (245). Las T_{CM} constituyen las células de reserva de los órganos linfoides y son productoras de grandes cantidades de IL-2; se dividen rápidamente y se diferencian en T_{EM}. Las T_{EM} se encuentran en los tejidos periféricos, y tienen funciones efectoras inmediatas como la producción de las citocinas antimicrobianas IFN- γ y TNF- α . La vacuna ideal debería ser capaz de estimular ambos tipos de células memoria (**Figura I.2.4**).

Serán estas células memoria CD45RO⁺ (tanto CD4⁺ como CD8⁺) las que se multiplicarán con gran eficacia para combatir su antígeno específico. Posteriormente, cuando la exposición antigénica desaparece, existe una contracción de ese grupo celular, muriendo aquellas células T_{EM} y persistiendo algunas células T_{CM} específicas, capaces de multiplicarse y diferenciarse en T_{EM} a mayor rapidez si una segunda exposición antigénica se produce.

Ante la ausencia de estímulos antigénicos posteriores, la respuesta memoria CD4⁺ y CD8⁺ específica, así como la respuesta B, puede mantenerse durante años (246-248). Recientes estudios demuestran que esta capacidad estaría mediada por citocinas y que la exposición antigénica de otras células T “alimentaría” la supervivencia de linfocitos memoria para otros antígenos diferentes (249).

Cabe decir sin embargo que la respuesta celular a la vacunación dependerá de la naturaleza del antígeno, la vía de administración, la dosis y los adyuvantes de la vacuna. Así, y

en lo que respecta a la naturaleza antigénica, existen antígenos T-independientes, como los polisacáridos capsulares, que no necesitan el estímulo de la célula Th2 para producir anticuerpos; y los T-dependientes, como las vacunas de gripe y tétanos, que sí lo necesitan (250), y que son capaces de generar memoria inmunológica.

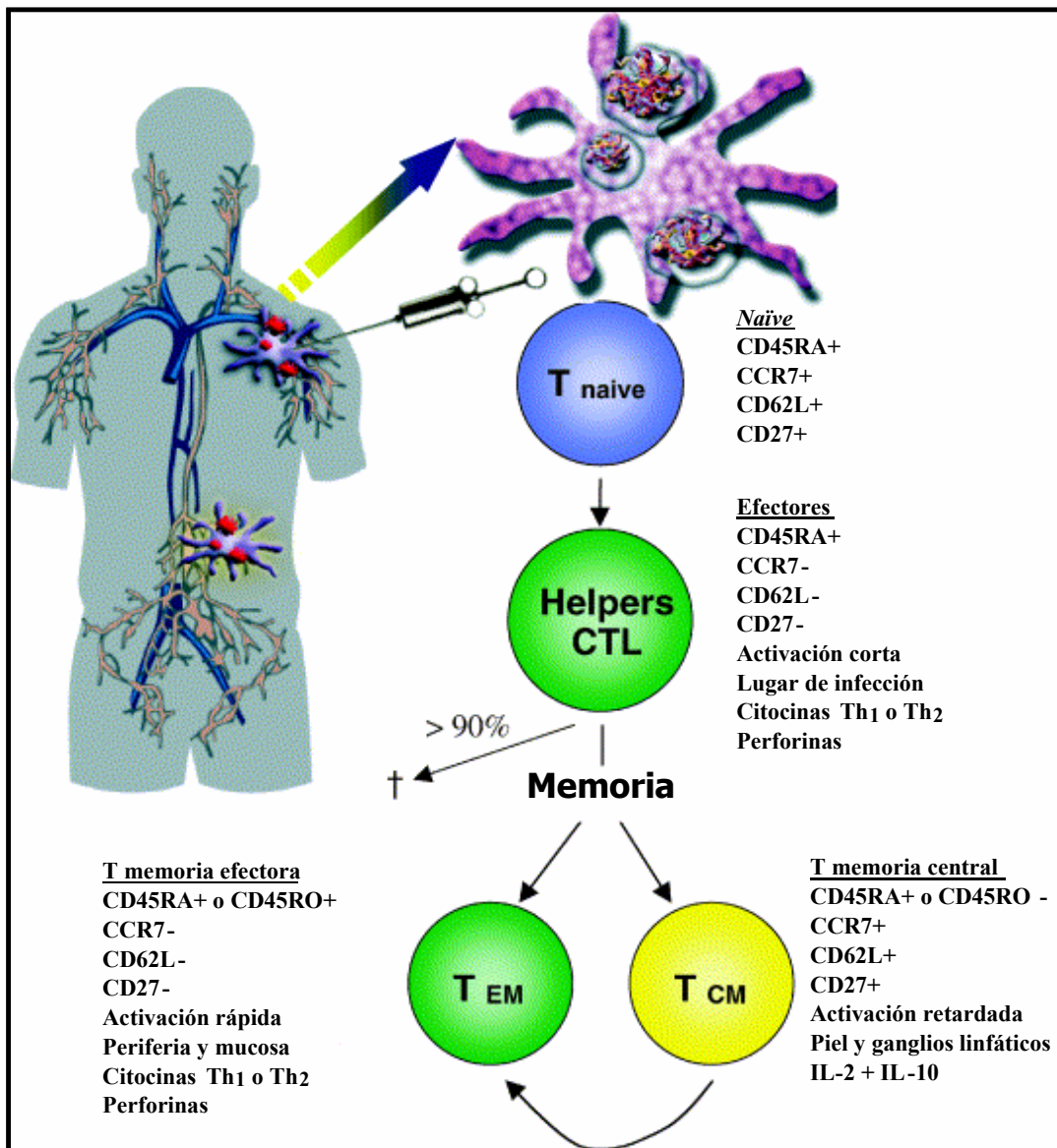


Figura I.2.4. Inducción de células T memoria tras la vacunación. Adaptada de la referencia (245).

2.6.3. Medición de respuestas vacunales

Actualmente se pueden valorar las respuestas tanto humorales como celulares a los antígenos vacunales.

El análisis de la respuesta humoral es el que se realiza de forma rutinaria para conocer el nivel de protección de un individuo frente a un antígeno infeccioso determinado. Para ello se determinan los niveles de anticuerpos específicos en el suero del paciente *in vitro* mediante, fundamentalmente, técnicas de ELISA.

La inmunidad celular es técnicamente más difícil de medir, debido sobre todo a que las células T no producen un agente específico de unión al antígeno contra el que reaccionan que se pueda detectar. Lo que se suele intentar medir es entonces la presencia de las propias células T que han respondido a un antígeno específico a través de su posterior proliferación *in vitro* al volver a exponerlas al mismo antígeno (ensayos de proliferación antígenos específicos), que permite detectar básicamente células CD4⁺ específicas, o bien la detección de las citocinas que se producen al activarse cuando se enfrentan al antígeno específico [por ELISPOT (del inglés *Enzyme-linked immunospot*), AMPLISPOT (técnica para amplificar los resultados del ELISPOT), detección intracelular de citocinas u otros] (251).

Por último, la respuesta celular frente a agentes infecciosos también se puede valorar mediante pruebas cutáneas con extractos del agente patógeno como en la prueba de la tuberculina.

2.7. VACUNACIÓN EN EL ADULTO INFECTADO POR EL VIH

2.7.1. Generalidades de la vacunación en el paciente infectado por el VIH

El paciente inmunocomprometido en general y el paciente infectado por el VIH en particular, aunque se encuentren en buena situación inmunológica, puede presentar determinadas infecciones con mayor frecuencia y/o gravedad, pudiendo además presentar una peor respuesta que las personas sanas al tratamiento antibiótico debido a la “falta de colaboración” de su sistema inmunitario (215). Por otro lado, los mismos factores de riesgo que los llevaron a adquirir la infección por el VIH facilitan su exposición a otros patógenos como VHA y VHB, que no sólo pueden producir una importante morbimortalidad, sino que pueden potenciar la toxicidad de los antirretrovirales (252).

Ello hace que sea una población en las que las vacunaciones podrían jugar un papel esencial en la prevención de dichas infecciones. Sin embargo, la vacunación del paciente VIH plantea, fundamentalmente, tres grandes cuestiones a considerar: responden peor a las vacunas, por la inmunosupresión podrían presentar efectos secundarios y, por último, se ha planteado que la vacunación podría alterar el curso de la propia infección por el VIH.

2.7.2. Alteración de la respuesta vacunal en el paciente infectado por el VIH

La respuesta vacunal de los pacientes infectados por el VIH se encuentra comprometida (253) tanto por alteración en la función celular B (254), como la T (255-257). Se ha hipotetizado además que, dado que el VIH infecta preferentemente las células T activadas, la activación de células T específicas del antígeno vacunal mediante la inmunización facilita su infección selectiva por el VIH y por tanto altera más la respuesta vacunal (254).

En general las respuestas a nuevos antígenos se afectan más que las de antígenos de recuerdo, que permanecen relativamente preservadas en las primeras fases de la infección (254;258;259). Ello parece debido a que, para la elaboración de una respuesta de recuerdo o secundaria, se requiere un número bajo de células T colaboradoras y a que la activación de las células B memoria en las respuestas de recuerdo puede ser más eficiente que la de las células *naïve* en caso de respuestas primarias (254).

La respuesta celular y humoral a los antígenos vacunales se ha descrito estar inversamente relacionada con el número de linfocitos T CD4⁺ del paciente, de forma que, mientras que los seroconvertidores recientes muestran respuestas potentes a las vacunas, comparables a las de pacientes seronegativos (260;261), las respuestas empeoran con el estadio de la infección por el VIH y el nadir de linfocitos T CD4⁺ (262-266). Éstas respuestas pueden mejorar con la recuperación inmune inducida por el TARGA, tanto a nivel humoral como celular (82;267-269).

Esta peor respuesta vacunal tendría una serie de consecuencias prácticas en la vacunación del paciente con infección por el VIH:

- Vacunar lo antes posible: Para aumentar así las posibilidades de respuesta inmunológica correcta. Incluso hay autores que sugieren que si la identificación ha sido tardía y el recuento de linfocitos CD4⁺ es inferior a 200 células/mm³, el paciente debería tratarse con TARGA y retrasar la administración de la vacuna hasta que el sistema inmune se haya restablecido (218), pues se ha visto que el TARGA permite mejorar la respuesta a dichas vacunas al mejorar la inmunidad humoral B y celular T.

- Revisar los títulos de anticuerpos post-vacunación: Si los respondedores son minoría, deberían revisarse los títulos postvacunales para asegurar la inmunoprotección, sabiendo que aunque el paciente tenga una respuesta inmunológica favorable, esto no garantiza una efectividad apropiada de la vacuna.

- Revacunar con mayor frecuencia: Se ha descrito que la inmunidad vacunal no sólo es de menor magnitud sino también de menor duración, perdiéndose más rápidamente que en individuos sanos. Por ello hay autores que recomiendan que se debería revacunar activamente p.ej. cada 2-3 años para VHB y 2-5 años para neumococo (270).

Sin embargo hay que tener en consideración que los estudios sobre eficacia vacunal se realizan en base a parámetros de respuesta inmune medibles como puede ser la producción de un determinado anticuerpo o el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad retardada. La correlación entre estos parámetros y la eficacia clínica real se ha establecido en pacientes con una función inmune normal y se desconoce por tanto, en la mayoría de los casos, si los mismos parámetros pueden ser usados en pacientes con una inmunidad alterada. De hecho, hay pocos o ningún dato de la capacidad de la mayoría de las vacunas para realmente prevenir la infección o sus complicaciones en pacientes inmunodeprimidos, pues la incidencia de las infecciones prevenibles por vacunas es a menudo baja y, sobre todo, hay relativamente pocos pacientes con alteración de la inmunidad que hayan sido vacunados y estudiados.

Además, una respuesta inmune correcta no dependerá sólo de la cantidad de anticuerpos generados, sino también de variables cualitativas como su afinidad, avidéz y eficacia funcional (215). Y los pacientes con alteración de la inmunidad, incluidos los infectados por el VIH,

pueden tener cualitativamente respuestas de anticuerpos diferentes de los huéspedes normales. Si añadimos que una alteración de la inmunidad celular o de la inmunidad no específica como la activación del complemento puede llevar a la inmunidad mediada por anticuerpos a ser inefectiva, uno no debería asumir que un determinado nivel de anticuerpos tiene la misma eficacia protectora en pacientes con y sin alteración de la inmunidad (215).

2.7.3. Potenciales riesgos de la vacunación derivados de la inmunosupresión

En principio, debido a la inmunosupresión, se ha considerado que los pacientes infectados por el VIH podrían desarrollar el cuadro infeccioso que se pretende prevenir inducido por la misma vacuna. Para ello se deberían dar dos circunstancias. Por un lado, que la vacuna sea de microorganismos vivos, sean virus o bacterias, que, a pesar de estar atenuados, si se encuentran con un sistema inmunitario lo suficientemente debilitado, podrían ser realmente patógenos. Y por otro lado, que el grado de inmunosupresión sea lo suficientemente importante como para ser “superado” por el germen atenuado.

De este hecho también se derivan una serie de consideraciones prácticas:

- Las vacunas inactivadas, recombinantes, subunidades, polisacáridos, conjugadas y toxoides pueden administrarse a todos los inmunodeprimidos.

- Existen algunas vacunas vivas atenuadas que se consideran beneficiosas si se administran en fases precoces (270). Como el grado de inmunodeficiencia varía con el tiempo en los pacientes, la inmunización temprana en la evolución de la infección podría encontrarse con un sistema inmunitario relativamente preservado y con una capacidad mejor de respuesta. Del mismo modo, se plantea que si la inmunodeficiencia se puede recuperar, p.ej con TARGA, se podría retrasar la inmunización para hacerlo con mayor seguridad.

- Debe hacerse un seguimiento cercano de los vacunados (algunas cepas vacunales pueden persistir mucho tiempo en pacientes inmunocomprometidos).

- Debe tenerse en cuenta el entorno del paciente y los riesgos de vacunar a sus convivientes con determinadas vacunas vivas como la de la poliomielitis o la varicela.

- En cualquier caso, debería evitarse usar vacunas vivas a no ser que existiesen datos disponibles que soporten su uso (218;219) y siempre y cuando el riesgo de infección natural fuese mayor que el riesgo de inmunización.

2.7.4. Potenciales riesgos de la vacunación sobre la propia infección por el VIH.

Se ha descrito en la literatura científica que las vacunaciones podrían producir aumentos transitorios de la CV y un descenso de la cifra de linfocitos T CD4⁺, con el consecuente deterioro inmunológico y el empeoramiento pronóstico. Sin embargo, existe controversia al respecto de este potencial efecto perjudicial que puede tener la vacunación sobre la infección por el VIH.

Se ha demostrado *in vitro* que la infección de los linfocitos T CD4⁺ por el VIH y la replicación viral son más eficientes cuando las células están activadas (271-273). Así, frente a un estímulo antigénico natural o vacunal existiría una activación y proliferación clonal de linfocitos T CD4⁺, sobre todo memoria CD45RO⁺ (274), tanto antígenos específicos como inespecíficos por la liberación de citocinas (275;276). Estos linfocitos podrían estar o bien quiescentemente infectados por el VIH, o bien convertirse en dianas para infectarse *de novo*, pudiendo por un lado potenciar la replicación viral (277) y por otro provocar la destrucción clonal linfocitaria.

A favor de estas hipótesis se ha visto que *in vivo*, cuando un paciente infectado por el VIH se vacuna frente al VHB, tiene un riesgo mayor de infección natural y hepatitis B crónica (278); o que determinados tratamientos contra infecciones comunes, como la isoniazida o el aciclovir, pueden enlentecer el curso de la infección por el VIH (279), supuestamente por disminución de la activación celular. Además se han observado efectos inmunomoduladores e inmunosupresores tras la administración de vacunas como la neumocócica (280), la de VHB (281) o la del sarampión (282). Pero los estudios que más han apoyado esta idea son los que muestran aumentos en la CV plasmática del VIH tras diferentes vacunaciones.

Diversos trabajos han hallado aumentos de la CV de hasta 586 veces tras una vacunación (283), habiendo demostrado consecuencias indeseables secundarias a dicho

aumento. Así se ha objetivado un aumento en el número de células infectadas tras la vacunación (284), y también aparición de resistencias al tratamiento antirretroviral (285). Este hecho es muy preocupante desde el punto de vista práctico, ya que si las vacunas recomendadas en los pacientes infectados por el VIH pudieran provocar el desarrollo de resistencias, esto podría comprometer el futuro del tratamiento de la infección por VIH en estos pacientes.

Se ha descrito que estas elevaciones de CV secundarias a la vacunación tendrían una cronología concordante a la hipótesis de la activación celular. Si las respuestas proliferativas óptimas a un antígeno vacunal como el de la gripe se detectan generalmente en los humanos sobre el 7^o-10^o día tras vacunación, en el paciente seropositivo, el aumento en la CV se esperaría 2 ó 3 días después (224). También se ha demostrado que esta elevación es más probable encontrarla en aquellos pacientes con mayor recuento de linfocitos T CD4⁺ y en aquellos con mayores respuestas proliferativas linfocitarias o formación de anticuerpos (250;284;286-293). Respecto a este último concepto, será por tanto más probable que se eleve la CV en aquel paciente que desarrolle una respuesta inmune a la vacuna y por tanto aquél que se puede beneficiar más de la vacunación.

Se han postulado explicaciones alternativas al aumento de la CV hallado tras las vacunaciones, como sería la propia variabilidad en la evolución del VIH, la sensibilidad de la técnica (294) o la falta de adherencia puntual al tratamiento antirretroviral (295).

Sin embargo, la controversia aparece sobre todo cuando otros muchos trabajos no encuentran cambios en las CV tras la vacunación (**Tabla I.2.1**). Posibles explicaciones de la discordancia en las observaciones incluyen, sobre todo, la falta de estratificación por CV, recuento de linfocitos T CD4⁺ o TARGA, y variaciones en los diseños de los estudios en cuanto a tamaño muestral (siendo generalmente pequeños) o períodos de observación, así como a la aparición de enfermedades agudas postvacunación, diferencias en los antígenos, ...

2.7.5. Efectos potencialmente beneficiosos de la vacunación sobre la propia infección por el VIH

Por otro lado, se ha descrito por otro lado que las vacunas en los pacientes infectados por el VIH podrían tener efectos beneficiosos sobre la propia infección, a parte de la prevención de la infección determinada. Se ha visto que la estimulación de leucocitos con virus de la gripe *in vitro* induce la generación de factores solubles que inhiben la infección de las células T por el VIH (296;297), postulándose que la exposición de las células del sistema inmunitario a determinados antígenos sería capaz de activar mecanismos de regulación paracrina contra antígenos no homólogos y por tanto ayudar al control de infecciones no relacionadas, como podría ser en este caso la infección por el VIH.

Tabla I.2.1. Principales estudios sobre la repercusión de la vacunación sobre la carga viral y/o el recuento de linfocitos T CD4⁺. Ref/fecha: Referencia/fecha de publicación; N: Número de vacunados; Días: Tiempo en días desde la vacunación al análisis de la CV; CV: Carga viral; P: Prospectivo; C: Controlado; Pl: Placebo; R: Retrospectivo

Vacuna	Ref/fecha	Diseño	N	Días	TARGA (%)	CV	CD4 ⁺
Tétanos	Stanley/96 (277)	P	13	7	No	↑	=
Tétanos	Dieye/01 (264)	P	21	7	No	=	=
Tétanos-neumococo	Katzenstein/96 (298)	P		42	No	=	↓
Gripe	O'Brien/95 (287)	P	20	7	No	↑	=
Gripe	Glesby/96 (290)	P; C; Pl	42	7	No	=	=
Gripe	Rosok/96 (284)	P	10	5	No	↑	=
Gripe	Fowke/97 (292)	P	34	14	94% mono-biterapia	=	=
Gripe	Tasker/98 (289)	P; C; Pl	47	7-14	No	↑	
Gripe	Tasker/99 (299)	P; C; Pl	102	30	25% biterapia	=	=
Gripe	Günthard/00 (275)	P	19	7	Sí	↑	
Gripe	Sullivan/00 (300)	R	8007	90	No	=	=
Gripe	Pinto/01 (296)	P	20	14	Sí (50%)	=	
Gripe	Gutiérrez/01 (301)	P	16	28	Sí	Indetectables = Detectables ↑	=
Gripe	Macías J/01 (295)	P; C	39	14	Sí	=	
Gripe	Kolber/02 (285)	P	34	14	Sí	↑	
Gripe	Skiest/02 (302)	R	47	50	Sí	=	=
Gripe	Zanetti/02 (303)	P	72	28	Sí (63%)	=	=
Gripe	Iorio/03 (304)	P	84	30	Sí	=	=
Gripe	Fuller/99 (305)	P	49	28	76% mono- biterapia	↑	
Gripe	Staprans/95 (276)	P	32	7	No	↑	
Neumococo	Amendola/02 (306)	P	57	10	Sí (60%)	=	=
Neumococo	Santos/02 (307)	P; C	40	14	No	=	=
Neumococo	Goetz/02 (308)	P; C; Pl	66	28	Sí	=	=
Neumococo	Janoff/99 (261)	P	14	7	No	=	=
Hepatitis A	Kemper/03 (309)	P; C; Pl	122	28	Sí	=	=
Hepatitis A	Wallace/04 (310)	P; C; Pl	90	28	Sí (80%)	=	=

Otro posible efecto beneficioso residiría en la potencial capacidad de aclaramiento del reservorio. A pesar de realizar un TARGA con capacidad de suprimir la replicación viral hasta la indetectabilidad, los pacientes infectados por el VIH presentan un reservorio de células infectadas en reposo que se renueva muy despacio y por tanto con un aclaramiento muy lento (79). Estas células en reposo se han demostrado capaces de activarse *in vitro* a través de la estimulación linfocitaria T por diferentes métodos, lo que sugiere que dicha activación también se puede conseguir *in vivo*. Se buscan estrategias para lograr esta estimulación y así, potencialmente, acelerar el aclaramiento del reservorio viral. Y una posibilidad residiría en la estimulación controlada con diferentes antígenos que activasen diferentes clones celulares, como ocurre con las diferentes vacunas.

2.7.6. Vacunas específicas en el paciente infectado por el VIH

Las recomendaciones vacunales para el paciente infectado por el VIH, con variaciones según el medio (país, comunidad autónoma), se recogen a continuación (**Tabla I.2.2.**).

Tabla I.2.2. Recomendaciones vacunales específicas para los adultos con infección por el VIH

Vacuna	Recomendación
Tétanos-difteria	Todos los pacientes, con un recuerdo cada 10 años
Gripe	Todos los pacientes, de forma anual
Neumococo	Todos los pacientes, con un recuerdo cada 5 años
Virus hepatitis A	Aquellos pacientes que la requieran por otro motivo (en alguna guía todos los pacientes)
Virus hepatitis B	Todos los pacientes (en alguna guía sólo aquellos pacientes que la requieran por otro motivo)
Sarampión-Rubéola-Parotiditis	Aquellos pacientes que la requieran por otro motivo y no estén gravemente inmunodeprimidos
Varicela	Aquellos pacientes que la requieran por otro motivo y no estén gravemente inmunodeprimidos
<i>Haemophilus influenzae</i>	En general no está recomendada en adultos. Considerar una dosis tras el diagnóstico de infección por el VIH
Fiebre tifoidea	Considerar la forma parenteral inactivada en aquellos pacientes que la requieran por otro motivo
Fiebre amarilla	En general contraindicada, considerar en pacientes sin inmunosupresión grave y de alto riesgo para la infección
Tos ferina	No recomendada actualmente en adultos
Antipoliomielítica	Considerar la forma parenteral inactivada en aquellos pacientes que la requieran por otro motivo
Meningocócica	Aquellos pacientes que la requieran por otro motivo
Rabia	Aquellos pacientes que la requieran por otro motivo
Viruela	En general contraindicada, considerar en pacientes sin inmunosupresión grave y de alto riesgo para la infección
Bacillus Calmette-Guerin	En general contraindicada
Anticolérica (oral)	En general contraindicada

2.7.6.1. *Hepatitis A*

- Generalidades de la infección natural en el paciente con infección por el VIH

La prevalencia de la infección por VHA en los pacientes con infección por el VIH es alta, oscilando entre el 40-70% incluso en los países ricos (311), así como la incidencia (un 5,8% de los pacientes infectados por el VIH se infectan por VHA cada año) (312).

La infección aguda por VHA puede ser más grave en los pacientes con infección por el VIH (313), con viremia a menudo prolongada y de títulos elevados (314), así como la elevación de transaminasas (312), incluso en aquellos pacientes con buenos recuentos de linfocitos T CD4⁺ (315). Ello supone que estos pacientes representen reservorios significativos para una transmisión mayor del VHA entre las poblaciones de riesgo para el VIH.

La gravedad es aún mayor cuando la infección asienta sobre una hepatitis crónica, hecho frecuente en el paciente infectado por el VIH y que puede predisponer a sufrir una hepatitis fulminante (312).

Además, casos clínicos sugieren que la hepatitis A puede inducir una replicación *in vivo* del VIH mayor y más prolongada (316).

- Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna

Aunque la vacuna se ha demostrado inmunogénica en pacientes con infección por el VIH, lo es menos que en sanos tanto en cantidad de anticuerpos como en porcentaje de pacientes que responden (309;310;317-319;319-321;321-323), con proporciones que oscilan entre el 48-94%.

Factores que influyen en la inmunogenicidad serán el recuento de linfocitos T CD4⁺ (309;310;319;320;323), el nadir de linfocitos T CD4⁺ (324) y, sobre todo, el número de dosis, aumentando la respuesta al administrar un segundo *booster*, es decir, con tres dosis (317;318;320).

- Efectos de la vacunación sobre la CV del VIH y el recuento de linfocitos T CD4⁺

Diferentes estudios no han hallado efectos de la vacunación anti-VHA sobre la CV, recuento de linfocitos T CD4⁺, progresión a SIDA o muerte (309;310;317-319;325;326).

- Recomendaciones

Aunque depende del medio, en general no hay recomendaciones específicas para estos pacientes, salvo que tengan indicación por otro motivo (216;219), cosa que suele ser frecuente por compartir algunos factores de riesgo (ADVP, varones homosexuales, viajeros a zonas endémicas, personas con hepatitis C crónica y personas con enfermedad hepática crónica). La vacuna recomendada y las pautas a seguir son las mismas que en la población adulta no infectada, con dos dosis con un intervalo de seis meses.

2.7.6.2. Hepatitis B

- Generalidades de la infección natural en el paciente con infección por el VIH

Aproximadamente el 6-15% de los pacientes infectados por el VIH están también coinfectados por el VHB en Estados Unidos, Europa y Australia, y el 64-84% presentan evidencia serológica de una exposición previa al VHB, constituyendo actualmente una comorbilidad importante (252;278;327;328). De hecho, aunque la coinfección por el virus de la hepatitis C (VHC) es más común que por el VHB, la insuficiencia hepática es más frecuente en pacientes con hepatitis B crónica (329). La incidencia de hepatitis B aguda en pacientes VIH positivos en Estados Unidos es de 12,2 casos por 1000 personas/año, 370 veces la media nacional; y el riesgo de progresión a hepatitis B crónica es del 7%, comparado con menos del 5% en adultos sanos (330;331).

La infección por VHB en pacientes con infección por el VIH evoluciona peor que en los pacientes sin VIH. Los coinfectados VHB-VIH presentan una mayor elevación de los niveles de ADN del VHB, una menor tasa de seroconversión del antígeno e del VHB, menores niveles de alaninato aminotransferasa (ALAT), disminución de los anticuerpos frente al HBsAg, reactivaciones de VHB latente, superinfecciones por el VHB y mayor riesgo de infección crónica persistente que los mono infectados por VHB (278;332-334).

De hecho, se ha demostrado que los pacientes con infección por el VIH tienen disminuciones significativas de la respuesta celular específica contra el VHB, tanto $CD4^+$ (335) como $CD8^+$ (331), con una potencial reconstitución tras TARGA (331).

Por otro lado, aunque se había reportado que el VHB no parecía tener un impacto significativo en la progresión de la infección por el VIH o en la tasa de pérdida de células T $CD4^+$ (336), otros autores han observado que los pacientes con infección por el VIH que tienen hepatitis B crónica tienen un riesgo 1,2 veces mayor de desarrollar SIDA y 2,3 veces más riesgo de tener una muerte relacionada con el SIDA que aquellos sin hepatitis B crónica (337).

- Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna

Los pacientes con infección por el VIH responden peor a la vacuna del VHB que los individuos sanos, tanto por un menor número de pacientes respondedores, como por una media de anticuerpos menor entre aquellos que responden (311;338-342;342-345), además de una pérdida más rápida de los anticuerpos en función del estatus inmunitario (311;339;346). Así, en los pacientes asintomáticos sin TARGA, la respuesta vacunal varía desde el 22 al 70% (311;343), mientras que sólo el 5-10% de los adultos sanos no producen niveles protectivos de anticuerpos frente al HBsAg siguiendo un esquema de 3 dosis.

Esta peor respuesta humoral se ha asociado al deterioro de la respuesta celular (347). La respuesta a la vacunación mejora en relación al recuento de linfocitos T $CD4^+$ nadir, la presencia de CV indetectable, el recuento de linfocitos T $CD4^+$ en el momento de la vacuna y el TARGA (340;341;348). Así, entre los pacientes con TARGA con más de 500 linfocitos T $CD4^+$ /mm³ la respuesta vacunal se acerca a las vista en adultos y adolescentes sanos, con series de hasta un 80% de respondedores (349), mientras que los que tienen < 500 linfocitos T $CD4^+$ /mm³ (incluso con TARGA) mantienen una pobre respuesta (29%). En la última situación de falta de respuesta a las 3 dosis estándar, en ausencia de un TARGA efectivo, la revacunación continúa teniendo pobres resultados (311). Cuando los linfocitos T $CD4^+$ están por encima de 350 células/mm³ doblar la dosis puede permitir aumentar las tasas de seroconversión (350).

Además, toda una serie de factores clínicos y sociológicos que generalmente suprimen la respuesta vacunal son altamente prevalentes en poblaciones de riesgo para la infección por el VIH. Estos factores incluyen el uso de alcohol, tabaco, adicción a drogas por vía parenteral, malnutrición e infección por el VHC (311;351).

- Efectos de la vacunación sobre la CV del VIH y el recuento de linfocitos T CD4⁺

Aunque reportadas de forma mucho poco frecuente, se han descrito elevaciones transitorias de la CV sin aparente significado clínico o inmunológico en la era pre-TARGA (330). En los últimos años, y con experimentación con nuevas vacunas anti-VHB [como la Gen Hevac (Sanofi Pasteur SA, Lyon, France), no autorizada para su uso en los Estados Unidos, y que incluye la región preS2 del VHB] no se han observado cambios significativos en la CV media aunque sí elevaciones transitorias en el análisis individual (352).

Respecto al recuento de linfocitos T CD4⁺ no se han detectado reacciones adversas significativamente diferentes a la vacunación por VHB en pacientes con infección por el VIH e individuos sanos. De hecho en individuos sanos se ha demostrado que existe una alteración inmune inespecífica y transitoria y de incierta relevancia clínica, con un descenso de las respuestas linfoproliferativas T a fitohemaglutinina a los 8 días de una dosis de hepatitis B y un descenso similar en los 4 días siguientes a la segunda dosis (353).

- Recomendaciones

Las principales guías recomiendan que la vacuna del VHB debe administrarse a todos los infectados por el VIH, con especial indicación en los grupos de alto riesgo: ADVP, varones homosexuales, mujeres con enfermedades de transmisión sexual, personas que ejercen la prostitución y contactos familiares con portadores del antígeno e del VHB.

La vacuna recomendada y las pautas a seguir son las mismas que en la población sana adulta, pero se recomienda medir el nivel de anticuerpos entre uno y seis meses después de la última dosis de vacuna, y en caso de falta de respuesta se administrará una nueva dosis (219).

Sin embargo, y a pesar de las recomendaciones, la vacunación frente al VHB en los infectados por el VIH tiene baja prevalencia (348).

2.7.6.3. Gripe

- Generalidades de la infección natural en el paciente con infección por el VIH

Aunque no hay datos cuantitativos epidemiológicos para comparar el grado de riesgo de complicaciones por gripe en los pacientes infectados por el VIH respecto a los individuos sanos, diferentes trabajos han demostrado que están más expuestos a padecer gripe, duran más tiempo tanto los síntomas como la replicación del virus gripal (prolongando su diseminación), es más grave (con mayor mortalidad y mayor requerimiento de ingreso hospitalario) y presenta mayor riesgo de complicaciones (224;289;299;354-358). Sin embargo existe algún estudio en el que se sugiere que los pacientes infectados por VIH no tienen un mayor riesgo de adquirir gripe durante un brote (359).

Por otro lado, se ha descrito que la infección gripal en sí misma podría aumentar la replicación del VIH y aumentar la CV (283).

- Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna

La vacunación antigripal ha demostrado producir títulos de anticuerpos significativos en pacientes con infección por el VIH, sobre todo cuando éstos tienen pocos síntomas, recuentos de linfocitos T CD4⁺ altos y CV bajas, llegando al 100% de eficacia en producción de anticuerpos (275;276;295;358;360-363), mientras que en aquellos con pocos linfocitos T CD4⁺ y enfermedad avanzada podría no inducir títulos protectivos (276;362), independientemente de que se administrase una segunda dosis (362;363). Respecto al papel del recuento de linfocitos T CD4⁺, existe bastante unanimidad en los estudios sobre que es crítico en la respuesta vacunal, sobre todo el número de linfocitos T CD4⁺ memoria y nadir (259;364), siendo más discutible el papel de la CV (305;364;365).

Se ha observado también que el nivel de anticuerpos basales podría condicionar la respuesta, independientemente del recuento de linfocitos T CD4⁺ (366).

En cualquier caso, la vacuna sería menos inmunógena que en pacientes sanos, con inducción de un menor número de anticuerpos en una menor proporción de pacientes y con un menor porcentaje de anticuerpos protectivos (259;296;303;305;367), posiblemente debido en su mayor parte a pobre respuesta por parte de las células B memoria (365). La revacunación a los 30 días parece no aportar beneficios en la titulación de anticuerpos (363).

Nuevas formas vacunales como las potenciadas con adyuvantes han demostrado aumentar la inmunogenicidad incluso en los más inmunodeprimidos, consiguiendo más títulos de anticuerpos en mayor número de pacientes y con mayor porcentaje de títulos protectivos, incluso en los que tienen recuentos linfocitarios T CD4⁺ inferiores a 200/mm³ (con respuestas hasta en el 62-71% de los casos) (304;368).

Respecto a la eficacia de la vacuna antigripal en los pacientes seropositivos, diversos estudios han demostrado la eficacia en cuanto a una reducción de la incidencia o de los síntomas en los que finalmente la sufren, con una eficacia de protección calculada del 100%, (siendo el 73% el margen menor del intervalo de confianza), similar al de inmunocompetentes (299;358;363;366;369).

- Efectos de la vacunación sobre la CV del VIH y el recuento de linfocitos T CD4⁺

La mayoría de artículos publicados sobre la influencia de la vacunación en la CV y/o el recuento de linfocitos T CD4⁺ y viceversa hacen referencia a la vacuna antigripal. Este hecho se debe probablemente a que es una vacuna recomendada de forma universal a pacientes con patologías crónicas y de administración anual, a diferencia de otras que, al tener administraciones al menos cada 5 años, limitan el número de estudios.

Fue además con la vacuna antigripal con la que se dio la “voz de alarma” al ser la primera vez que se sugirió que una vacunación podría provocar un aumento de la replicación viral. Fue en 1992, midiendo la replicación mediante la titulación de virus en cultivos por dilución, objetivando que en tres pacientes con gripe o vacunados frente a ella se multiplicaban los títulos de replicación por 100 en la primera semana post-evento, volviendo a la normalidad en un mes (283).

Posteriormente, diversas publicaciones han encontrado evidencia tanto en un sentido como en otro. Así, existen trabajos que demuestran que la vacunación antigripal produce elevaciones en la CV y/o el recuento de linfocitos T CD4⁺, tanto en adultos como en niños (276;283;284;287-289;305). El pico en la elevación oscilaría entre 5 días (284) y 1-2 semanas post-vacunación (275;287), volviendo posteriormente a la normalidad.

Factores que favorecerían esta elevación serían la ausencia de TARGA (289), la CV (correlacionando en algún estudio incluso con la frecuencia y magnitud del aumento) (275), tener un mayor número de linfocitos T CD4⁺ (276), o la presencia de mayor respuesta linfoproliferativa a los antígenos vacunales basalmente y la producción de mayor respuesta serológica (276).

De especial relevancia es el trabajo de Kolber y colaboradores (col.) (285) en el que, además de objetivarse un aumento en la CV tras la vacunación en pacientes con TARGA y CV < 200 copias/mL (7 de 34 pacientes), el análisis del genotipado tras la elevación mostró que en 2 de las 7 elevaciones existían mutaciones en el gen de la retrotranscriptasa o la proteasa que no tenían previamente, fracasando finalmente los pacientes al TARGA.

Otros múltiples estudios sin embargo no encuentran cambios en la CV (290;292;295;296;299;300;302-304;306;368) o el recuento de linfocitos T CD4⁺ tras la vacunación (275;300;362), incluso con nuevas formas vacunales como las potenciadas con adyuvantes, que han demostrado aumentar la inmunogenicidad incluso en los más inmunodeprimidos sin repercutir sobre la CV o el recuento de linfocitos T CD4⁺ (304;368). Cabe destacar sobre todo el reciente trabajo de Nettles y col. (370), donde con determinaciones repetidas de CV cada 2-3 días en 9 pacientes a los que se administró la vacuna no se encontraron aumentos en la CV.

Las razones de estos resultados tan variados incluyen (**Tabla I.2.1**):

- Diferencias en los pacientes incluidos respecto a la existencia o no de TARGA.

El tratamiento antirretroviral podría limitar la activación celular o ser lo suficientemente potente como para disminuir pequeñas elevaciones transitorias de la CV (292).

- Diferencias en el tiempo de análisis de la CV desde la vacunación.

- Falta de grupo control.
- Diferencias en los tamaños muestrales.
- Definiciones inconsistentes de lo que constituye un aumento en la CV, pues algunos trabajos analizan la CV media (sobre todo en pacientes sin TARGA) y otros la proporción de pacientes que elevan la CV por encima de un determinado nivel. Así, dos trabajos (295;301) muestran que entre los pacientes con CV indetectable no se ven cambios en el recuento de linfocitos T CD4⁺ o en la CV a las 4 y 12 semanas, pero sí en los pacientes con CV detectable.
- Diferente sensibilidad de los métodos de laboratorio utilizados para cuantificar la CV (294;295).
- Heterogeneidad de los pacientes incluidos (características demográficas, factores de riesgo, estadios de la infección, tratamiento...).

- Recomendaciones

En general las guías de salud pública y medicina preventiva de los diferentes países recomiendan la vacunación con pautas y vacunas iguales que en la población adulta sana (216-219).

2.7.6.4. *Varicela*

- Generalidades de la infección natural en el paciente con infección por el VIH

Los niños infectados por el VIH que sufren una varicela primaria tienen un riesgo mayor de complicaciones comparados con los niños sanos (371;372), aunque parecen menores que en otros tipos de inmunosupresión como leucemias (373). Los adultos, aunque existen pocos datos porque probablemente muchos ya la han pasado antes de infectarse por el VIH (el 95% de los adultos según las series tienen anticuerpos frente al VVZ (374)), tienen también más posibilidades de desarrollar una varicela grave (375), aunque no se acompaña de progresión a SIDA (376). Además, los pacientes infectados por el VIH que ya han tenido varicela tienen también mayor riesgo de desarrollar Zoster (clásico o crónico), más agresivo y recurrente que en

individuos sanos (374;377), mayor cuanto más grave sea el grado de inmunodepresión, aunque raramente causa diseminación visceral como en otras inmunodepresiones (375).

- Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna

Dado que la vacunación por varicela se ha considerado clásicamente contraindicada en los pacientes con infección por el VIH, existen pocos estudios al respecto. Sin embargo, algunos datos en niños asintomáticos o moderadamente sintomáticos (categoría N1 o A1 de la clasificación de la CDC, con linfocitos T CD4⁺ ≥ 25%) indican que la vacuna es inmunógena (con tasas de seroconversión del 56% y del 82% de respuestas celulares específicas) y efectiva (372;378). De hecho, estudios en otros niños inmunodeprimidos como son los leucémicos muestran tasas de seroconversión tras una y dos dosis del 85 y 95% respectivamente, con una eficacia del 90% (379).

Un estudio reciente en el que se incluyeron niños más inmunodeprimidos ha objetivado que la vacunación era segura e inmunogénica, con un 79% de seroconversiones, en pacientes con ≥ 15% y/o ≥200 linfocitos T CD4⁺/mm³ (380;381).

- Efectos de la vacunación sobre la CV del VIH y el recuento de linfocitos T CD4⁺

La literatura al respecto del potencial efecto sobre la CV o el recuento de linfocitos T CD4⁺ de la vacuna de la varicela es escasa o inexistente. Sin embargo, algunos datos en niños asintomáticos o moderadamente sintomáticos (categoría N1 o A1 de la clasificación de la CDC, con linfocitos T CD4⁺ ≥ 25%), y más recientemente en pacientes con ≥ 15% y/o ≥200 linfocitos T CD4⁺/mm³, indican que la vacuna es segura y no afectaría la CV o el recuento de linfocitos T CD4⁺ (378;380).

Con respecto a otros efectos perjudiciales, aunque se ha descrito que en inmunosupresión grave podrían presentar varicela diseminada (382), la incidencia de efectos secundarios locales y rash cutáneo en los niños infectados por el VIH asintomáticos es similar a la de niños sanos (378).

- Recomendaciones

La infección por el VIH no constituye una indicación para la vacunación de la varicela. En el caso que estuviese indicada por otro motivo en un paciente infectado, en general las guías contraindican la vacunación cuando existe evidencia clínica de infección por el VIH, mientras que si la infección es asintomática o con un porcentaje de linfocitos T CD4⁺ superior al 25% se puede aplicar (372).

Cabe la posibilidad que en un futuro existan nuevas indicaciones para la vacunación con varicela, fundamentalmente para la prevención del zoster. Con la edad, la frecuencia y gravedad del herpes zoster aumenta, mientras que la inmunidad celular T específica contra el VVZ disminuye. Como la incidencia de zoster en vacunados es menor que en los que pasan la varicela (383), existe la idea, recientemente demostrada, que la inmunización activa de personas adultas (aunque hubiesen pasado la varicela) podría potenciar la respuesta celular contra VVZ y disminuir la frecuencia y severidad (o ambas) del zoster en los vacunados (384;385). Como los pacientes con infección por el VIH tienen mayor riesgo de herpes zoster, podría ser interesante valorar en ellos si la vacunación es efectiva en este aspecto.

2.7.6.5. Triple vírica (*sarampión-rubéola-parotiditis*)

- Generalidades de la infección natural en el paciente con infección por el VIH

Los pacientes infectados por el VIH, fundamentalmente los niños, tienen un mayor riesgo de complicaciones graves e incluso mortales cuando se infectan por el sarampión (386-389). Se ha descrito hasta una mortalidad entre los niños del 70% (390).

- Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna

Basalmente, un gran número de adultos ya están protegidos frente a sarampión-rubéola-parotiditis. Así, un estudio prospectivo en adultos con infección por el VIH mostró que el 95% estaban inmunizados (391), sin diferencias en la seroprevalencia entre los pacientes con más de 400 y menos de 200 linfocitos T CD4⁺/mm³.

La mayoría de estudios de inmunogenicidad se han desarrollado en niños y frente al sarampión, donde se ha objetivado que la respuesta vacunal es peor en infectados que en individuos sanos, con una menor proporción de pacientes con anticuerpos detectables contra el sarampión (389;391-393), objetivándose que la reinmunización de niños con inmunosupresión moderada o grave no produce un aumento en el título de anticuerpos (sólo responden a ella el 14%) (392). Sin embargo se han constatado una disminución en la mortalidad por sarampión entre los pacientes infectados por VIH y vacunados, sin presentar diferencias con los sanos (390;392;393), sugiriendo una protección más allá del nivel de anticuerpos producidos.

La respuesta vacunal mejora cuando se administra en el primer año, cuando la inmunosupresión es menor, con tasas de respuesta del 18-58% entre los sintomáticos frente al 60-100% entre los asintomáticos, y con el TARGA (64,3% vs 21,4%), aunque siempre con un título menor que los sanos (269;386;389;392;393).

Respecto a la vacuna de la parotiditis el número de estudios es muy reducido, aunque también se objetiva una menor inmunogenicidad en niños (394). Lo mismo ocurre con la rubéola (395), con correlación con el recuento de linfocitos T CD4⁺ y la CV.

- Efectos de la vacunación sobre la CV del VIH y el recuento de linfocitos T CD4⁺

Aunque no existen estudios de la repercusión de la vacunación con la triple vírica sobre la CV o el recuento de linfocitos T CD4⁺, existe el temor que, como se había observado con otras vacunas, también podría suceder teóricamente con la triple vírica (396).

Sí existe experiencia documentada sobre la potencial morbilidad de la vacuna en pacientes gravemente inmunodeprimidos por su naturaleza de vacuna viva. Se han descrito casos de complicaciones en inmunodeprimidos por causas diferentes de la infección por el VIH (397;398), así como también entre infectados muy inmunodeprimidos por el VIH (389;399;400). Sin embargo, se considera en general una vacuna segura fuera de estos casos de inmunosupresión grave (394;396;401;402).

No se han reportado casos de enfermedad grave tras la administración de vacunas de rubéola o parotiditis en el paciente infectado por el VIH.

- Recomendaciones

En general, las diferentes guías no consideran que la infección por el VIH en sí misma como una indicación para la vacunación debido a la baja incidencia de infección por sarampión, rubéola y parotiditis en nuestro medio, y el nivel de anticuerpos protectores existentes en la población adulta. Sin embargo, las personas infectadas por el VIH sin inmunodepresión grave (linfocitos T CD4⁺ superiores a 200 células/mm³ o un porcentaje de éstos respecto al total superior al 25%), sintomáticas o no, pueden ser vacunadas si se consideran susceptibles o existen evidencias de exposición a un enfermo de sarampión. La vacuna y pautas son iguales a la población adulta sana (216;217;225).

Las mismas recomendaciones se tendrán en cuenta para los contactos próximos susceptibles y que no tengan contraindicación.

En el caso de que el paciente tenga inmunosupresión grave y exista una exposición de riesgo deberá recibir profilaxis con inmunoglobulina, independientemente de sus antecedentes de vacunación.

La búsqueda de anticuerpos en personas con infección por el VIH asintomática no es necesaria antes de administrar la vacuna triple vírica u otra vacuna con sarampión (225).

2.7.6.6. *Neumococo*

- Generalidades de la infección natural en el paciente con infección por el VIH

La infección neumocócica invasiva es la enfermedad vacunalmente prevenible más común y más grave entre los pacientes con infección por el VIH en todo el mundo (403-408) y es la causa más frecuente de neumonía bacteriana entre estos pacientes en los Estados Unidos (409). Se estima que la infección es 100 veces más frecuente entre los pacientes VIH positivos que en la población general (410;411), así como más grave (412;413), con una tasa de mortalidad de la neumonía neumocócica bacteriana entre la población infectada por el VIH del 5-11% (403). También la recurrencia es relativamente común (13% de los casos recurren en 6 meses). Incluso se ha demostrado que ha aumentado el número de infecciones por neumococo

resistente a penicilina entre los pacientes con infección por el VIH (414). El TARGA disminuye el riesgo de esta infección (415).

- Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna

Diversos trabajos han demostrado que la vacuna neumocócica produce aumentos significativos de anticuerpos en los pacientes con infección por el VIH, sobre todo cuando están en estadios tempranos, con recuentos absolutos y nadir de linfocitos T CD4⁺ altos (259-261;416-419), aunque estudios más recientes no confirman estas diferencias en función del recuento de linfocitos T CD4⁺ (absoluto o nadir) (306;420-422). El aumento de la respuesta vacunal observado con el TARGA parece depender más del aumento en el recuento de linfocitos T CD4⁺ que del tratamiento en sí mismo (423).

Como otras vacunas, se ha descrito menos inmunógena en los pacientes infectados por VIH que en individuos sanos (259;306;416;418;418;421;424-426;426-431), aunque algunos trabajos no hallan diferencias (259;260;361;420). También se ha objetivado ser menos duradera (432), siendo la respuesta a la reinmunización modesta (433).

Por lo que respecta a su eficacia, estudios sobre todo observacionales han hallado una reducción del riesgo de enfermedad neumocócica, con una eficacia superior al 70% (369;415;418;424;425;434-439). Sin embargo un estudio randomizado controlado con placebo, realizado en Uganda, mostró que la vacunación neumocócica podría asociarse a una mayor incidencia de enfermedad neumocócica y neumonía bacteriana de todas las causas entre los pacientes seropositivos que no recibían TARGA (440). Esta contradicción está aparentemente relacionada con diferencias en los diseños de los estudios y la población estudiada, así como el acceso a la profilaxis antimicrobiana, al TARGA y a otros cuidados de la infección por el VIH. En el estudio africano, los pacientes podrían haber tenido otras infecciones concurrentes endémicas, y limitación o no acceso al TARGA y otras medidas de cuidado estándar accesibles en países desarrollados que, conjuntamente con un incremento de la CV post-vacunación, podrían haber provocado una pérdida de inmunidad y una muerte precoz antes de demostrar los beneficios de la vacunación.

En los individuos sanos, las vacunas conjugadas neumocócicas son más inmunógenas que la polisacárida convencional (441). Aunque un estudio también lo ha demostrado en adultos infectados por el VIH (442), de momento estas vacunas conjugadas no parece ofrecer ventajas en esta población (428;443).

- Efectos de la vacunación sobre la CV del VIH y el recuento de linfocitos T CD4⁺

Mientras que un trabajo halló un aumento de la CV tras la vacunación antineumocócica en relación con el título de anticuerpos producidos (286), otros estudios no han encontrado cambios en la CV o el recuento de linfocitos T CD4⁺ (261;298;306-308;434;444;445).

- Recomendaciones

Actualmente es una vacuna que se recomienda en la población con infección por el VIH con las mismas pautas y vacuna que en la población adulta no seropositiva, recomendando la revacunación una vez cada 5 años. Anteriormente, algunas recomendaciones sugerían que la vacunación debería administrarse a todos los que tuviesen un recuento de linfocitos CD4⁺ \geq 200 células/mm³, mientras que en los de menos de 200 células/mm³ sería opcional, debiendo retrasarse hasta que el sistema inmune se hubiese restablecido si estaban iniciando TARGA (219).

2.7.6.7. *Tétanos-difteria*

- Generalidades de la infección natural en el paciente con infección por el VIH

Dada la baja incidencia actual en nuestro medio de ambas infecciones gracias a los programas vacunales, no existe experiencia sobre si la infección por tétanos o difteria son de mayor gravedad o frecuencia en los pacientes infectados por el VIH.

- Inmunogenicidad y eficacia de la vacuna

La vacuna de Td es capaz de inducir respuesta con anticuerpos específicos y de alta afinidad (254;263) en pacientes con infección por el VIH. Sin embargo, diversos estudios han

hallado que tiene menor inmunogenicidad que en individuos sanos, tanto en niños (446) como adultos (254;262-264), y tanto en cantidad de anticuerpos producidos como en duración de la respuesta (262;446). El toxoide diftérico es incluso menos inmunogénico que el tetánico en los pacientes con infección por el VIH (447).

Se ha descrito también que la respuesta aumenta con el número de linfocitos T CD4⁺ en el momento de la vacunación, de forma que el porcentaje de respuestas a difteria sería del 61% en pacientes con < 100 linfocitos T CD4⁺/mm³, 70% para los que tienen entre 100-300 células/mm³ y 73% para los de > 300 células/mm³, mientras que para el tétanos sería del 83-100% en los de > 300 linfocitos T CD4⁺/mm³ (254;259;262;321;426).

- Efectos de la vacunación sobre la CV del VIH y el recuento de linfocitos T CD4⁺

Un estudio clásico describió un aumento de la CV (entre 2 y 36 veces) tras la vacunación con tétanos en adultos, así como un aumento del ADN proviral en plasma y ganglio linfático (277). Dicho aumento tenía un pico al 13^o día de media, volviendo a la normalidad en 6 semanas, con una tendencia no significativa de los linfocitos T CD4⁺ a disminuir.

Otros estudios sin embargo no han demostrado aumentos en CV tras la vacunación en niños o adultos (264;293;298;446;448).

- Recomendaciones

Con los estudios actuales se puede decir que la vacunación con tétanos o Td en personas infectadas por el VIH no entraña un riesgo especial y su aplicación no está contraindicada. La vacuna recomendada y las pautas a seguir son las mismas que en la población adulta, sin haber recomendaciones específicas para la administración de la vacuna Td en estos pacientes (216;217;449).

2.7.6.8. Otras

- *Haemophilus influenzae:*

Haemophilus influenzae constituye una causa importante de neumonía extrahospitalaria en el paciente con infección por el VIH (404;450). Sin embargo, la enfermedad invasiva (bacteriemia y/o meningitis) es relativamente infrecuente y sólo la mitad de las cepas adultas invasivas están incluidas en la vacuna disponible de *H. influenzae* tipo b. Por ello, aunque la vacuna conjugada se ha demostrado inmunogénica entre los pacientes con infección por el VIH (260;451), aunque menos que en sanos y menos duradera (256;328;403;452-456), su potencial beneficio es limitado en esta población y no está recomendada en adultos (457).

La respuesta vacunal depende del recuento de linfocitos T CD4⁺ (256;260;453;458), No se han constatado cambios en los recuentos de linfocitos T CD4⁺ o la CV tras la vacunación (261;292;452;458).

- **Fiebre tifoidea:**

La vacuna oral está contraindicada en las personas con inmunodeficiencia congénita o adquirida, incluyendo la infección por el VIH. Cuando sea necesario, se administrará la forma parenteral inactivada. Es menos inmunógena que en sanos y la respuesta varía en función de recuento de linfocitos T CD4⁺ (459).

- **Fiebre amarilla:**

La seguridad y eficacia de la vacuna, que contiene virus vivo, son inciertas en personas con infección por el VIH, y en guías como las de Cataluña están contraindicadas (216). Aunque algunos trabajos no han descrito efectos secundarios (460) ni alteraciones en la CV (270), otros han hallado graves consecuencias (461), por lo que cabría ser prudentes al considerar su uso, limitándolo a los viajeros con infección por el VIH asintomáticos que no puedan evitar la exposición. En pacientes con recuentos de linfocitos T CD4⁺ superiores a 200 células/mm³ tiene una inmunogenicidad del 70-100% (462).

- **Tos ferina:**

Es inmunógena, aunque menos que en sanos, correlacionándose la respuesta con el recuento de linfocitos T CD4⁺ (463). No existe contraindicación en los pacientes con infección por el VIH. Actualmente sólo se recomienda en niños, pero dado que recientes estudios demuestran tasas de infección en la población adulta superiores a las que se creían (464), es posible que en el futuro se recomiende el uso en adultos de la vacuna que lleva un componente acelular de pertussis asociado a la vacuna del Td (465;466).

- **Antipoliomielítica:**

Tanto la forma oral atenuada como la inactivada parenteral producen respuesta neutralizante en niños con infección por el VIH, que, excepto en el caso de pacientes sintomáticos (262;467), consiguen títulos de anticuerpos comparables a los sanos (467). Aunque la forma oral inactivada se ha demostrado segura (401;467), la recomendada es la forma inactivada.

Un estudio en adultos con SIDA que ya tenían títulos contra el poliovirus observó una disminución paradójica de los mismos tras la vacunación, atribuida a un posible fenómeno de desensibilización (468).

- **Antimeningocócica:**

No existe contraindicación para su administración en los pacientes infectados por el VIH, aunque es menos inmunógena, incluso en seroconvertidores recientes (260).

- **Antirábica:**

No existe contraindicación para su administración en los pacientes con infección por el VIH.

- **Anticolérica:**

La forma atenuada está contraindicada en pacientes con infección por el VIH.

- **Viruela:**

Existen datos que muestran seguridad tras la vacunación “accidental” en pacientes con infección desconocida por el VIH (469;470), aunque se ha descrito un caso de viruela diseminada tras la vacunación (471). De este modo, aunque hoy en día sólo se administra en el contexto de los ejércitos en misiones de guerra, sería segura en pacientes sin inmunosupresión grave (466).

- **Bacillus Calmette-Guerin (BCG):**

Aunque se han reportado casos de infección diseminada posterior a la vacunación (472;473), incluso años después (474), y su eficacia en pacientes VIH positivos no se ha demostrado, en países en vías de desarrollo se utiliza (466). Su uso no está recomendado en los países desarrollados.

3. EPISODIOS DE VIREMIA INTERMITENTE EN EL PACIENTE CON INFECCIÓN POR VIH BAJO TARGA

3.1. INTRODUCCIÓN

Con los tratamientos antirretrovirales disponibles hoy en día se pueden conseguir grandes niveles de supresión de la replicación viral, y aunque se sabe que la erradicación de la infección no es posible únicamente con el TARGA, se ha conseguido cambiar el curso de una infección mortal hasta hace unos años y convertirla en una infección crónica.

El objetivo del TARGA es conseguir la máxima inhibición de la replicación viral, lo que a nivel práctico se mide mediante la indetectabilidad de la CV. Sin embargo hasta el 46% de los pacientes según las series presentan episodios de viremia transitorios, es decir CV que se hacen detectables y posteriormente vuelven a la indetectabilidad, en el curso de su infección bajo TARGA (475-479).

Múltiples trabajos en la literatura reciente abordan el tema de los episodios de viremia intermitente o comúnmente conocidas con el término anglosajón “*blip*”. Y a pesar de los múltiples estudios realizados sigue siendo todavía un tema controvertido, desde su definición, sus características, sus factores predisponentes y, sobre todo, lo que resulta más importante de cara a la práctica clínica habitual, sus implicaciones pronósticas.

3.2. RESERVORIO VIRAL

El TARGA que reciben hoy en día los pacientes con infección por el VIH ha demostrado que puede disminuir significativamente las CV por debajo de los límites de detectabilidad (26;480;481), puede disminuir sustancialmente los niveles de ARN en tejido linfoide, secreciones genitales y líquido cefalorraquídeo (76;482) y permite un grado considerable de reconstitución inmune. Sin embargo, se sabe que actualmente es incapaz de erradicar el virus completamente debido a la existencia de reservorios de larga vida como las células T CD4⁺ memoria en reposo en los ganglios linfáticos y la circulación periférica (482),

que albergan virus infeccioso con capacidad replicativa en forma de ADN proviral que se puede detectar en técnicas de cultivo con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos no infectados a las que se han extraído los linfocitos T CD8⁺ (78-80). Este reservorio latente se establece de forma precoz en la infección y persiste a pesar del TARGA, incluso cuando éste se inicia de forma temprana (79;80;83;483). Según la tasa de aclaramiento del reservorio viral se sugiere que, para una potencial erradicación viral sería necesario continuar con TARGA supresivo al menos durante 10 años en los estudios más optimistas (75), y 60 años en otros (484).

Existiría otro tipo de reservorio, más virtual, que estaría constituido por células infectadas o virus libre en zonas del organismo donde el TARGA no es capaz de llegar de forma supresiva, los denominados “santuarios virales” (485-489).

3.3. SUPRESIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL CON EL TARGA

Dado que con el TARGA actual no se puede conseguir la erradicación de la infección por el VIH, los objetivos del tratamiento serán reducir la mortalidad y morbilidad asociadas a la infección por el VIH, aumentar la calidad de vida, restaurar y preservar la función inmunológica y suprimir la CV (plasmática) al máximo durante el mayor tiempo posible (490).

Desde el punto de vista de la CV, la respuesta óptima que un paciente puede conseguir tras iniciar un TARGA es un descenso rápido y sostenido en la CV a niveles bajo nuestra capacidad de medirla, hasta la indetectabilidad. Si esta cifra hace unos años se establecía en 200 copias/mL, los actuales métodos ultrasensibles han permitido establecerla en menos de 50 ó 20 copias/mL. Conseguir la indetectabilidad es predictivo del éxito a largo plazo del TARGA (491-493), pues evita la aparición de resistencias al tratamiento, que es la principal causa de fracaso (490;494;495). Además, el nadir de CV que se consigue se ha asociado a la durabilidad de la respuesta (496).

Mantener la supresión virológica depende de un gran número de variables, como son la potencia subóptima de un determinado régimen, mayores niveles basales de CV, presencia de resistencias basales (497-503), la adherencia al TARGA, la farmacocinética de los

antirretrovirales, las vacunaciones (ver **apartado 2.7.** de la **Introducción**), o los polimorfismos en los genes de los receptores de quimiocinas (504;505) entre otros.

Sin embargo el tener niveles de ARN indetectables en plasma no significa que la replicación viral se haya detenido. De hecho existen evidencias de lo contrario a través de la detección de diferentes marcadores como son la evolución en la secuencia viral (sobre todo en pacientes que presentan CV entre 20 y 400 copias) (75;506;507), la expresión de ARN mensajero viral en las CMSP y ganglios linfáticos (14;83;508), la presencia de niveles bajos pero detectables de ARN viral plasmático (509;510) o la presencia de ADN episómico (511). Así, un trabajo reciente demuestra que el 80% de los pacientes que presentan una CV inferior a 20 copias/mL tienen viremia superior a 1 copia/mL, con una media estable de 3 copias/mL. Este nivel de viremia “ultra-ultra sensible” se relacionaría con la CV basal, pero sería independiente de la potencia o la naturaleza del TARGA y el grado de inmunodeficiencia, y probablemente sea el reflejo no de una replicación viral continua, sino de una liberación desde las células infectadas previamente al TARGA constituidas en reservorio (510). Otro trabajo establece este nivel de replicación en una media de 17 copias/mL (509).

Es por este motivo que cuando los pacientes interrumpen el tratamiento o cuando la adherencia del mismo es reducida, se observan elevaciones de la CV del VIH (497-499).

3.4. DEFINICIONES

Para identificar un determinado suceso y valorar sus consecuencias es importante contar con una buena definición. Y este es uno de los principales problemas para poder interpretar la literatura reciente acerca de los “*blips*”.

3.4.1. “*Blip*” o episodio de viremia intermitente

Probablemente el término más correcto, y por ello será el que utilizaremos a partir de ahora, sería el de episodio de viremia intermitente (EVI) o rebote transitorio (“*intermittent viremia*” o “*transient relapse*” en inglés) y consistiría en la elevación de la CV por encima del límite de sensibilidad de forma transitoria, es decir, precedido y seguido de otra determinación

de CV indetectable, sin haber realizado cambios en el TARGA. De hecho, según Di Mascio y col. (512) habría que distinguir entre el “*blip*”, que sería la determinación detectable de CV, y el EVI, que sería el período desde que la CV se hace detectable hasta que vuelve a ser indetectable, de forma que dos *blips* consecutivos podrían formar o no parte de un mismo EVI.

Esta definición, aunque parece sencilla, plantea diversos problemas:

1. *Elevación de la carga viral:*

En general nunca se ha definido un límite superior a partir del cual una determinación de CV detectable transitoria no se considera EVI. Sin embargo, es lógico pensar que el origen y la implicación que puedan tener casos extremos no será la misma. Es más, difícilmente una elevación extrema transitoria de la CV pueda justificarse en ausencia de cambios en la adherencia al TARGA.

La magnitud también va a depender del momento de la determinación, pues una extracción puede coincidir con el pico de una viremia transitoria o con el valle, presentando entonces valores muy distintos (**Figura I.3.1.**).

2. *Por encima el límite de sensibilidad:*

Dado que las técnicas más actuales y utilizadas con mayor frecuencia tienen su límite de sensibilidad en las 50 copias/mL, es éste el límite inferior de los EVI para la mayoría de autores recientes. Sin embargo, los ensayos de CV iniciales tenían un rango dinámico de alrededor de $3 \log_{10}$, con límites inferiores de detección de 400 copias/mL primero y 200 copias/mL después, dependiendo de la técnica de determinación de CV utilizada. Este límite va a ser crucial en la definición del EVI, pues un determinado nivel permitirá detectar más o menos episodios de elevaciones por encima de una cifra determinada y establecer su duración, como se refleja en la **Figura I.3.1.** De este modo, la aparición de ensayos más sensibles ha hecho que algunos pacientes que eran indetectables cuando el límite de detección era de 200 copias/mL, hayan pasado a detectables cuando el límite se ha establecido en 50 copias/mL, aumentando el número de EVI de forma “súbita”.

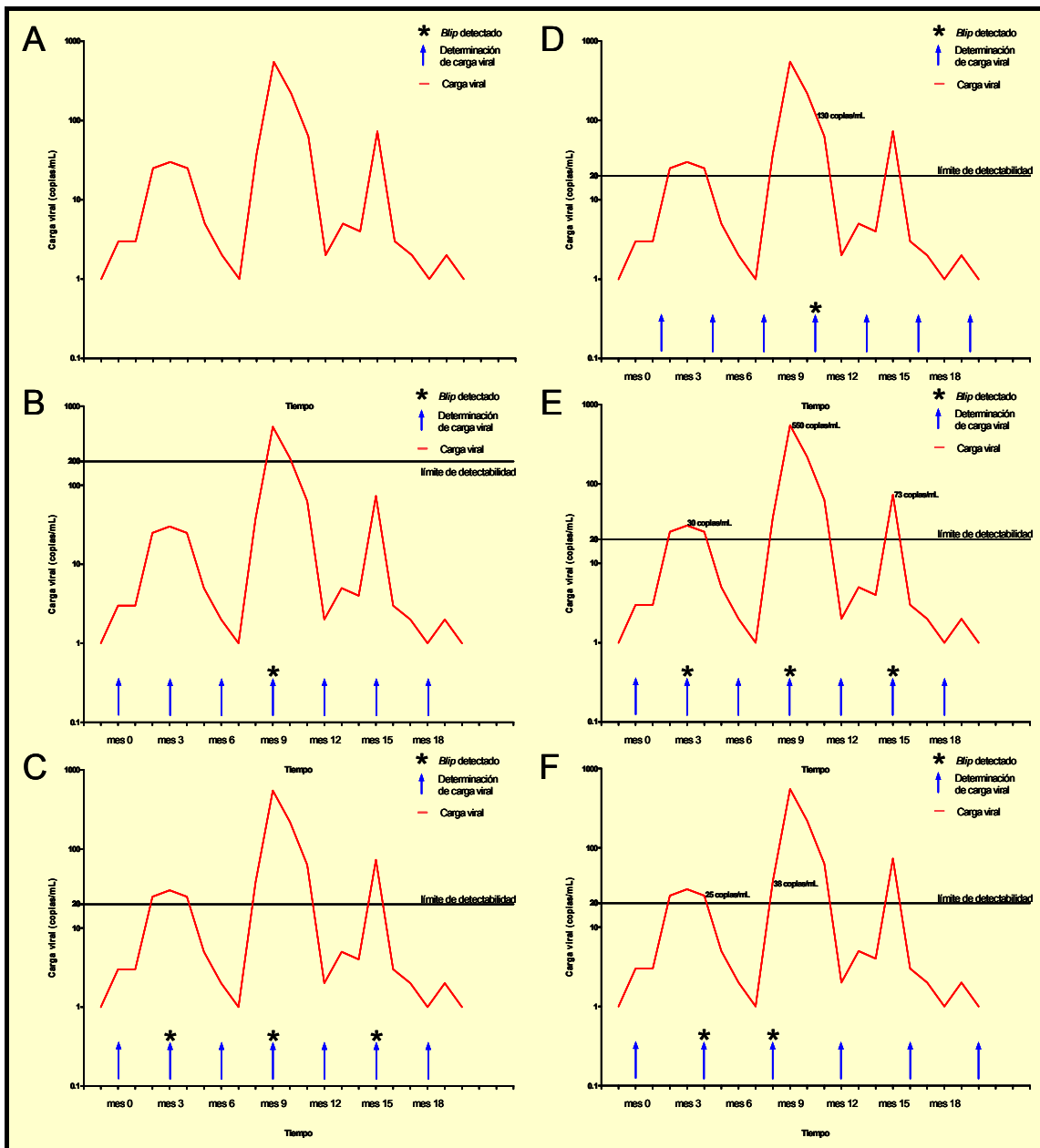


Figura I.3.1. Variaciones en la determinación de episodios de viremia intermitente (EVI) o *blips*. Suponiendo un hipotético patrón de evolución de CV (A), la cantidad y la magnitud de los EVI puede ser diferente en función del límite de sensibilidad de la técnica, la periodicidad de las determinaciones y el momento de la determinación. En el ejemplo, para las mismas determinaciones en el mismo momento, el tener un límite de detectabilidad de 200 copias/mL (B) o de 20 copias/mL (C) hace que el mismo paciente pase de presentar un único EVI a 3 en el mismo período de observación. Con una misma sensibilidad, cambiar el momento de la determinación puede hacer pasar de determinar un único EVI (D) a 3 (E) y con una magnitud diferente. Y si en lugar de cada tres meses las determinaciones se hubiesen hecho cada cuatro se hubiese detectado un único EVI más largo (F).

Actualmente la agencia estadounidense del medicamento (FDA, de “*Food and Drug Administration*”) aprueba tres ensayos de CV del VIH para el uso clínico:

- Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa de la retrotranscriptasa del VIH-1 (Amplicor HIV-1 Monitor Test, version 1,5, Roche Diagnostic), con un límite de detección de 50 copias/mL.
- Test de amplificación de ácidos nucleicos para el ARN del VIH (NucliSens HIV-1 QT, Organon Teknika), con un límite de detección de 80 copias/mL.
- Ensayo de sonda de amplificación de señal de ácidos nucleicos (VERSANT HIV-1 RNA 3,0 assay, Bayer), con un límite de detección de 75 copias/mL.

3. *De forma transitoria:*

La duración de los EVI no está bien establecida. De hecho, la definición necesita que existan al menos tres determinaciones de CV: una indetectable inicial, la detectable del EVI y una indetectable posterior. Lógicamente, la probabilidad de encontrar más o menos episodios o de menor o mayor duración dependerá del número de determinaciones y la periodicidad en que se hagan (**Figura I.3.1.**). Encontrar una CV detectable en un momento dado puede implicar que esa viremia esté desde sólo ese momento, un día, o incluso 60 ó 90 días si la siguiente determinación es a los 3 meses.

Además, en función del tiempo entre dos extracciones, dos determinaciones de CV por encima del nivel de detectabilidad podrían corresponder a un mismo episodio de elevación, de forma que dos *blips* consecutivos podrían formar o no parte de un mismo EVI. Como las determinaciones de CV son infrecuentes (la DHHS recomienda en los pacientes en tratamiento la determinación de CV cada 3-4 meses), puede ser difícil diferenciar entre un *blip* y un EVI. En este mismo sentido, Greub (479) acuñó el término “*bump*” (bache, rebote) para denominar aquellas situaciones en las que dos determinaciones consecutivas son detectables seguidas de la indetectabilidad, para diferenciarlas de los “*blips*” que sería una única determinación.

4. *Seguido de otra determinación de CV indetectable:*

Implica que el diagnóstico de EVI sólo se puede hacer de forma retrospectiva. Una CV detectable en un momento dado no es posible saber si va a ser el inicio de un fracaso o si sólo va a representar una elevación transitoria. Hellinger (513) ha propuesto para esa determinación detectable actual el término de “*slur*” (mancha).

3.4.2. Fracaso

En los trabajos en los que se habla del potencial riesgo de fracaso virológico asociado a la presencia de los EVI, la definición del “fracaso” también varía, fundamentalmente en función nuevamente del límite de detectabilidad del ensayo de CV con el que se trabaje. Así, mientras en algunos trabajos se considera el tener dos determinaciones consecutivas de CV por encima de 400 copias/mL (477;514-516), otros lo consideran cuando son por encima de 200 copias/mL (475) y otros 500 (479).

Según la DHHS (490), el fracaso virológico se puede definir como una ausencia de respuesta o una respuesta incompleta al TARGA. Estas guías anticipan un descenso de al menos $1 \log_{10}$ en la CV a las 2-8 semanas del inicio del TARGA, así como un descenso adicional por debajo de los niveles de detectabilidad a las 16-24 semanas. De este modo, en el paciente *naïve* que inicia tratamiento, el fracaso se objetiva por una CV repetida superior a 400 copias/mL tras 24 semanas de TARGA o superior a 50 copias/mL a las 48 semanas. Hablaremos por otro lado de rebote virológico cuando, después de haber conseguido la supresión viral, se objetiva una detección repetida del ARN del VIH.

El fracaso inmunológico se define como el descenso o la falta de un incremento superior o igual a 25-50 células/mm³ sobre el recuento basal tras el primer año de TARGA.

3.4.3. Viremia persistente de bajo nivel

Según la definición comentada de fracaso virológico, cualquier CV detectable de forma persistente cumpliría sus criterios. Sin embargo resulta interesante el concepto de viremia persistente de bajo nivel (VPBN), cuando encontramos bajo TARGA CV detectables de forma

continúa pero no superiores a un determinado nivel de CV, variable según los autores (50-400, 50-1000, incluso hasta 10.000 copias/mL), a pesar del tiempo. Es ésta una situación fisiopatológicamente interesante que merece una mención especial, hablando posteriormente de ella (**apartado 3.9.** de la **Introducción**)

3.5. FISIOPATOLOGÍA DE LOS EPISODIOS DE VIREMIA INTERMITENTE

Si bien se han sugerido múltiples factores asociados a la presencia de EVI en el curso del TARGA en los pacientes con infección por el VIH (**apartado 3.6.** de la **Introducción**), se han postulado dos grandes mecanismos por los que se podrían explicar y que, probablemente, no sean excluyentes entre sí (**Tabla I.3.4.**).

Tabla I.3.1. Posibles mecanismos patogénicos de los episodios de viremia intermitente

Episodios de viremia intermitente falsos
Variación aleatoria
Biológica (del paciente)
Del ensayo
Artefacto en el procesamiento de muestras
Episodios de viremia intermitente reales
Activación de células infectadas en reposo
Asociada a infecciones oportunistas
Asociada a vacunaciones
Asociada a otros estímulos inmunológicos (IL-2,...)
Disminución de la inhibición de la replicación
Disminución de los niveles de fármaco
Disminución en la adherencia
Disminución en la biodisponibilidad
Aumento de la excreción
Interacción con otros fármacos
Penetración insuficiente en “santuarios virales”
Replicación de bajo nivel en células presentadoras de antígenos

3.5.1. Falsos EVI o “pseudoblips”

3.5.1.1. Introducción

En ocasiones una CV detectable no refleja una elevación real de la CV en el paciente entendida como un aumento del número de copias/mL en el plasma del individuo. Variaciones aleatorias en el método de detección de la CV y artefactos en el procesamiento de muestras pueden ser responsables de varios EVI sin aumentos reales en la replicación viral. De hecho no deberían clasificarse propiamente como EVI pues no lo son, de ahí el nombre de “*pseudoblip*”. Los EVI asociados con este fenómeno, lógicamente, tiene un significado clínico limitado y podrían explicar porque su presencia en determinados estudios no compromete la evolución de los pacientes.

3.5.1.2. *Fluctuación biológica aleatoria y variación estadística del método*

Diferentes estudios demuestran que analizando una misma extracción por laboratorios diferentes, incluso con la misma técnica, el nivel de concordancia en la determinación de la CV es pobre, hasta un coeficiente kappa del 4,4%, y variaciones inter e intra-ensayo del 35,4 y 40% respectivamente (370;517-519).

Por otro lado, se sabe que las técnicas de CV cuantitativas tienen limitaciones de precisión, sobre todo a bajos niveles de replicación del VIH, habiéndose encontrado ARN falsamente positivo en el 2-3% de los ensayos (520).

Además, Nettles y col. (370) han mostrado en un estudio reciente, en el que analizó prospectivamente un grupo de 10 pacientes con infección por el VIH con determinaciones de CV frecuentes (cada 2-3 días) durante 3-4 meses, que la proporción de CV positivas era consistente con una variación aleatoria alrededor de un nivel de CV media de 10-20 copias/mL más que una elevación significativa de la viremia (usando el coeficiente de variación del ensayo).

Estos trabajos sugieren por tanto que la mayoría de EVI serían debidos a una combinación de fluctuaciones menores de la CV y variaciones del ensayo de CV. De hecho, la DHHS ya contempla que el mínimo cambio en la CV considerado como estadísticamente significativo (dos desviaciones estándar) es un aumento o descenso en el triple del valor de la

CV o un cambio de $0,5 \log_{10}$ copias/mL (490), y que antes de cambiar un tratamiento a partir de un determinado valor de CV se debería repetir la determinación para confirmarlo.

Sin embargo, posiblemente no todas las determinaciones detectables de CV puedan explicarse de este modo. Se ha visto que, a menudo, determinados pacientes acumulan EVI mientras que otros permanecen siempre indetectables. Modelos matemáticos afirman que esta variabilidad de frecuencias entre diferentes pacientes no se puede explicar asumiendo la distribución de probabilidades común como sería de esperar si fuesen simplemente variaciones del ensayo (521).

3.5.1.3. *Artefactos del procesamiento de muestras:*

Las CV pueden ser falsamente elevadas en los ensayos ultrasensibles de Roche Amplicor en sus versiones 1.0 o 1.5 (Roche Diagnostics, Inc.) cuando se realizan sobre sangre recogida y almacenada en tubos PPT[®] (Plasma Preparation Tubes[®]) comparados con las recogidas en tubos de EDTA (Ácido tetraacético de etilendiamina) (522-524).

Por ello la estandarización de los procesos de recogida y procesamiento de muestras para la determinación de la CV es esencial para limitar la variabilidad intra e interpaciente.

3.5.2. EVI “reales”

La presencia de ARN del VIH en plasma de los pacientes por encima de los niveles de detectabilidad del ensayo puede derivarse de dos posibles mecanismos, como son la activación de las células infectadas latentes o una disminución de la inhibición de la replicación. Excluimos por tratarse de un fenómeno totalmente diferente la superinfección por una cepa diferente de VIH.

3.5.2.1. *Activación de células infectadas en reposo*

Las células infectadas antes del inicio del TARGA y que se encuentren en reposo o latentes, con el ADN proviral integrado en su genoma, se pueden activar en respuesta a estímulos inmunológicos como infecciones oportunistas, administración de IL-2 o vacunaciones

(78;525-527). Estas células posteriormente podrán morir de forma directa o indirecta o bien se volverán nuevamente quiescentes.

En estas circunstancias, el virus que aparece es el salvaje (*wild type*) o el previo al tratamiento que lo hizo indetectable. El TARGA con inhibidores de la transcriptasa inversa no podría inhibir la producción de estos viriones, pero sí sus ciclos subsiguientes de replicación, y por tanto estos viriones no serían infectivos para nuevas células. Consecuentemente no se generarían virus resistentes. Este mecanismo se apoya por los hallazgos en algunos trabajos de aumentos en la respuesta específica CD8⁺ anti-VIH y anti-citomegalovirus (CMV) asociados a los EVI, así como aumentos en la activación linfocitaria (528), aunque es difícil saber si estos cambios son causa o consecuencia de los EVI.

3.5.2.2. *Disminución de la inhibición de la replicación*

Por otro lado, se podría producir un aumento en el ARN plasmático del VIH como consecuencia de una disminución de la inhibición de su replicación resultado de concentraciones insuficientes de los fármacos antirretrovirales por diferentes circunstancias: adherencia intermitente, alteraciones transitorias en la absorción, interacciones con otros fármacos... En este caso, al estar coexistiendo virus con capacidad replicativa y fármacos a niveles no supresivos sí se podrían generar virus mutaciones nuevas y adquirir virus resistentes.

Existe la posibilidad de que la replicación provenga de lugares en los que el TARGA no penetra de forma efectiva, de los “santuarios virales”. En este caso, la penetración puede ser lo suficientemente inefectiva como para que no se produzca una presión farmacológica selectiva y el virus resultante también sería sensible, sin mutaciones de resistencia (485-489).

Otros autores han propuesto la existencia de replicación de bajo nivel en otras células como macrófagos o células dendríticas (529).

A favor de esta hipótesis de EVI secundarios a una inhibición de la replicación insuficiente existen dos estudios en los que se observó que, cuando se intensificaba el tratamiento en pacientes que tenían una CV con TARGA entre 5 y 50 copias/mL, la CV se

podía reducir por debajo de 5 copias/mL al introducir otro fármaco (530), lo que daba lugar a un descenso en la frecuencia de EVI (531).

3.6. FACTORES ASOCIADOS A LOS EPISODIOS DE VIREMIA INTERMITENTE

Diferentes estudios han asociado la presencia de EVI a múltiples factores demográficos, clínicos, inmunológicos y virológicos. Los resultados son variados y a menudo contradictorios, habiéndose argumentado las diferencias en los estudios en base a los diferentes diseños, la programación infrecuente de extracciones o el carácter retrospectivo de muchos trabajos. Por lo tanto, sus conclusiones aunque importantes, pueden no ser absolutamente precisas para definir la relación de un determinado evento con un EVI. Como ejemplo de esta controversia, mientras que Easterbrook y col. (532) hallaron factores responsables de EVI por encima de 400 copias/mL en el 75,8% de sus pacientes (por pobre adherencia, interrupción o cambio de TARGA en el 42,66%, infección o vacunación intercurrente en el 26,2% e interacción farmacológica en el 6,8% de los casos), Nettles y col. (370) no hallaron diferencias con ningún tipo de factor, salvo únicamente una relación marginal ($p = 0,08$) con episodios reportados de no adherencia.

3.6.1. Parámetros demográficos

Aunque Nettles y col. (370) no encontraron diferencias en la detección de EVI en función de sexo, raza o edad, Easterbrook y col. (532) hallaron que las mujeres y los pacientes con menor edad se asociaban a más EVI en el análisis multivariado.

También se ha descrito que los pacientes con más ingresos económicos tienen menos EVI (478;533).

3.6.2. Recuento de linfocitos T CD4⁺ y diferentes subpoblaciones celulares

Como en otros aspectos existen resultados contradictorios. Diferentes trabajos no encuentran relación en los EVI con el recuento de linfocitos T CD4⁺ previo al blip o durante el mismo (370;476;478;514). Sin embargo, otros han hallado una frecuencia de EVI inversamente

relacionada con el recuento de linfocitos T CD4⁺ al inicio del tratamiento, sobre todo cuando el TARGA se inicia durante la primoinfección, sugiriendo factores específicos del huésped como determinantes de la frecuencia (512;534;535). También se ha descrito que mayores niveles de activación (CD4⁺HLA⁺DR⁺) o de diferenciación precoz (CD4⁺CD45RA⁻CD28⁺) son predictivos de mayor riesgo de EVI (536), sugiriendo que estas células tienen mayor potencial para ser infectadas y proliferar y/o menor capacidad citotóxica.

3.6.3. Carga viral

Se ha descrito que el nivel de la CV al inicio del primer TARGA estaría directamente relacionada con la frecuencia de los EVI, sobre todo cuando esa CV es la de equilibrio (*set point*) pasado el período de máxima efervescencia en la primoinfección (475;512;532;535). De hecho, esta relación parece más patente en los individuos primoinfectados que en los crónicos (535). También se ha hallado una relación con el tiempo necesario para conseguir la indetectabilidad (475). Estos resultados podrían indicar que existen pacientes que, por factores no determinados, estarían predispuestos a tener mayores niveles de CV y controlar posteriormente peor la viremia durante el TARGA. Sin embargo, no se han constatado estos hallazgos en otros trabajos (370;476). Tampoco Nettles y col. (370) han hallado relación con el número previo de EVI.

Mención especial merecen los estudios en los que se valora la CV de forma ultrasensible, donde se ha descrito que, bajo TARGA, los pacientes con EVI tendrían de forma basal CV mayores (7,5 vs 3 copias/mL según Martínez y col. (537) o 23 vs 2,5 copias/mL según Havlir y col. (475).

3.6.4. Estadio de la infección por el VIH: primoinfección vs infección crónica

Se han reportado diferencias tanto en la frecuencia como en la magnitud de los EVI entre los pacientes que habían iniciado TARGA durante la infección aguda (menos de 6 meses desde el inicio de los síntomas) y los que lo habían hecho durante la infección crónica (535), es decir, dependiendo de la duración de la infección pre-TARGA. Así, en un estudio el 45% de los

que iniciaban TARGA durante la primoinfección estaban siempre indetectables, mientras que lo hacían sólo el 21% de los crónicos (535). Posteriormente la incidencia de EVI se mantiene similar independientemente del periodo de seguimiento (512;515;535), de forma que diferentes pacientes pueden presentar diferente patrón de EVI, pero un mismo paciente suele presentar el mismo tipo.

Estos hallazgos sugieren dos cosas. Por un lado, que presentar EVI puede ser más una condición del paciente (“*blipper*”) que un hallazgo, concentrándose los EVI en unos pacientes mientras que otros se mantienen indetectables siempre. Por otro lado, el momento en el que se inicia el TARGA va a influir en esta condición. Si esto es así y los EVI fuesen perjudiciales, podría ser otro motivo (junto a la limitación de la extensión de la infección, la preservación de las funciones inmunes y la reducción de las cuasiespecies virales al limitar el número de mutaciones) para iniciar antes el TARGA (535). La justificación de tal evento sería que en primer lugar, al tratar antes, el reservorio y la CV residual serían menores (83;535), y además, se preservarían en parte las respuestas inmunes CD4⁺ y CD8⁺ anti-VIH (538).

3.6.5. Tipo de tratamiento antirretroviral

En general todos los trabajos en los que se han valorado los EVI no encuentran relación entre el TARGA durante los EVI y la frecuencia o amplitud de éstos, observándose tanto con inhibidores de la proteasa (IP) como con inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleótidos (ITINAN), a pesar de que se tenía la sospecha de que, al tener estos últimos una barrera genética baja, podrían presentar una mayor frecuencia e incidencia de fracasos terapéuticos (370;478;479;533;534;537). Con respecto a este último punto, lo único que se ha objetivado es que los pacientes que reciben ITINAN que tenían un EVI presentaban más opciones de tener un segundo EVI que el grupo de IP (534).

Lo que sí parece asociarse a una mayor incidencia de EVI son los tratamientos poco potentes. Esto es así tanto en el momento del EVI, siendo más frecuentes los EVI con un tratamiento antirretroviral con biterapia en lugar de triple (476), como durante la historia previa. Así, haber recibido más tratamientos antirretrovirales (476;515;533;534), haber recibido

monoterapia con indinavir, o biterapia con inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleótidos/nucleósidos (ITIAN) (475;479;532) también se asocia a tener más EVI. Sin embargo, no se ha hallado que la monoterapia con zidovudina (AZT), mutaciones de resistencias a AZT o diferentes grados de resistencia se asocien a más EVI (370;475).

3.6.6. Adherencia

Presentar una adherencia baja al TARGA se sabe que se asocia con una menor capacidad para suprimir la CV y una peor evolución (504;539;540). Por ello se ha asumido durante mucho tiempo que la mayoría de los EVI eran el resultado de periodos de pobre adherencia a TARGA. Esta observación se ve reforzada por el hecho de que, cuando el clínico observa un EVI, interroga con más intensidad acerca de la adherencia, a lo que el paciente normalmente responde con el olvido de alguna dosis. Inmediatamente se insiste en la adherencia del paciente y en el siguiente control se observa una normalización de la CV (476;515). Esto va a suponer por tanto un sesgo al prejuzgar una CV detectable como “signo” de pobre adherencia, pues es menos probable que se interroge a conciencia acerca de la adherencia a un paciente con CV indetectable, a pesar de que hay datos que sugieren que la mayoría de pacientes con CV indetectable pierden alguna dosis (504).

Partiendo de la base que, aunque los métodos de notificación de autoadherencia han demostrado asociarse a un buen control de la CV (541;542), en general la medición de la adherencia por cualquier método es imperfecta (543;544), en estudios en los que se ha estudiado con rigor tanto la adherencia como las concentraciones de los fármacos antirretrovirales (370;533;537) no se ha hallado asociación entre éstos y la presencia de EVI, excepto cuando las CV son de gran magnitud (más de 1000 copias) (533).

3.6.7. Otros

Se ha estudiado la relación de los EVI con otras circunstancias. Las vacunaciones y las infecciones intercurrentes, incluyendo las oportunistas, han sido uno de los factores con más frecuencia etiquetados de “presuntos culpables”, hasta el punto que la DHHS recomienda

espaciar una determinación de la CV 2-4 semanas después de alguno de estos hechos. Respecto a la controversia de las vacunaciones y la elevación de la CV, se ha hablado con profundidad en el **apartado 2.7.** de la **Introducción.** Por lo que concierne a las infecciones, modelos matemáticos las han relacionado con la incidencia de EVI (545), aunque trabajos recientes con determinaciones de CV cada 2-3 días tras una infección intercurrente leve (faringitis/sinusitis, infección del tracto respiratorio superior, gota, herpes oral, o trastornos digestivos) no ha encontrado cambios en los EVI (370).

Hay poca evidencia que la variación diurna tenga algún papel significativo en la CV. Se evaluó hace años en dos trabajos sin encontrar diferencias (546;547). Por otro lado, tampoco se ha visto que la incidencia de EVI sea menor con estatinas, fármacos que se habían asociado a un mejor control de la CV (548). Por último, cabe comentar que en un estudio piloto en el que se vacunó a pacientes bajo TARGA con un vacuna plasmídica de VIH, se observó que se lograba un descenso en la frecuencia de EVI (549).

3.7. CARACTERÍSTICAS DE LOS EVI

Aunque con marcadas diferencias según los trabajos, se pueden intentar definir las características de los EVI en cuanto a su frecuencia, magnitud y duración.

3.7.1. Frecuencia

Aunque dependiendo de los trabajos y de la definición de EVI, en general la mayoría de estudios encuentran prevalencias de EVI por encima de 50 copias/mL en períodos variables de tiempo del 30-50% entre los pacientes con TARGA (475;476;478;479;514;515;532;534;550), aunque hay series desde el 11% (477) hasta el 64 (531) e incluso el 90% (370). Cuando el límite inferior está en 200 copias/mL, la prevalencia se reduce hasta el 20-30% (475;515;532).

Aunque las tasas de incidencia se han mirado menos, oscilan entre 19,2 y 51,17 episodios/100 personas año (478;515;532;534) o entre el 3,6 y el 9% de las determinaciones (370;512;531;551).

Entre los pacientes que presentan EVI, los que presentan más de 1 en períodos variables de tiempo oscilan entre el 7 y el 26% (475;478;514;532), y el 13-22% presentan dos episodios consecutivos (475;479).

3.7.2. Duración

Básicamente existen dos modelos de duración de los EVI en función de la base fisiopatológica que se suponga responsable (**apartado 3.3.** de la **Introducción**).

Por un lado están los modelos matemáticos clásicos en los que se estima una duración de 20-30 días, con un ascenso rápido y un descenso en dos fases exponenciales, una más rápida y otra más lenta (512), aunque podría haber casos de asociación de hasta 5 ó 6 blips consecutivos sin significar necesariamente fallo virológico (475;512). Otros autores como Cohen Stuart y col. establecen una duración media más larga, de hasta 8,5 semanas (514). Estos modelos implicarían replicación y no sólo liberación de virus de células infectadas latentes.

Por otro lado está el modelo propugnado por Nettles y col. (370) a partir de la realización prospectiva de determinaciones cada 2-3 días y con la idea de que la mayoría de CV detectables serían por aleatoriedad biológica o del ensayo. En este caso la duración media sería de 2,5 días (2-11,5) y, según refiere el autor, sería difícil perder elevaciones significativas de la CV entre determinaciones pues la vida media de las células productoras de virus es de 1 día aproximadamente.

3.7.3. Amplitud

Nuevamente existen discrepancias en cuanto a la amplitud o magnitud del EVI dependiendo del modelo propugnado. Por un lado, Nettles y col. (370) defienden que la mayoría de EVI serían medidas aisladas de baja magnitud (media 79 copias/mL, rango 51-201 copias/mL), con un agrupamiento de los valores alrededor del límite de las 50 copias y sólo algún valor superior a las 200 copias/mL. De hecho, asumiendo un estado de equilibrio de 20 copias/mL, el 96,4% de los EVI debido a variación aleatoria caerán debajo de 200 copias/mL.

Por otro lado, el perfil que muestran los modelos matemáticos tendría una amplitud de 158 ± 132 copias/mL (512;521;552;553).

En general, la media de de las CV de los EVI de los trabajos más relevantes es de 210 copias/mL (rango de medias 64-1153), aunque la mayoría de estudios tienen una media alrededor de 100 copias/mL (370;478;512;514;532;533;536;537;554), estando el 70-80% de los casos por debajo de 400 copias/mL (478;515).

3.8. CONSECUENCIA DE LOS EVI

Aunque por el diseño de los diferentes trabajos es difícil saber en ocasiones si una determinada característica es causa, consecuencia o simplemente se asocia a la presencia de EVI, se ha publicado que la presencia de EVI induce cambios en la respuesta inmune, evolución viral, durabilidad del TARGA e incluso diferencias en la evolución tras suspender el TARGA.

3.8.1. Sobre el sistema inmune

Existe controversia al respecto de si la presencia de EVI resulta beneficiosa al permitir una presentación antigénica del VIH controlada bajo TARGA, pudiendo estimular así las respuestas específicas contra el VIH y permitir un mejor control; o por el contrario, significa una peor capacidad del sistema inmune para controlar la replicación viral y por tanto una señal de peor evolución que, incluso, podría asociarse con una mayor pérdida de linfocitos T CD4⁺.

Karlsson y col. (528) y Papasavvas y col. (550) han reportado que los pacientes con EVI presentan niveles significativamente mayores en magnitud y amplitud de respuestas CD8⁺ y CD4⁺ VIH-específicas que los pacientes con CV persistentemente indetectable, sobre todo en el mismo momento del EVI. Estos resultados corroboran los hallazgos de Ortiz y col. (538), sobre todo en los pacientes tratados durante la primoinfección y con menor significación entre los tratados durante la infección crónica, sugiriendo en este caso que los pacientes tratados durante la infección temprana pueden tener un umbral antigénico menor al tener sus respuestas inmunes más preservadas. Y están en la misma línea que los resultados de Alatrakchi y col. (555) donde se observa que los pacientes con bajo nivel de replicación (< 10.000 copias) tienen un mayor

número de respuestas específicas anti-VIH CD4⁺ y CD8⁺ que los pacientes con CV indetectables (< 200 copias/mL) y de alta replicación (> 10.000 copias/mL). Estos trabajos concluyen que los EVI estimularían las respuestas específicas anti-VIH lo que, aunque podría facilitar la extensión de episodios de replicación viral localizados al facilitar más células diana, contribuiría al control de la replicación viral (538). Esto explicaría que algunos autores hubiesen encontrado que los pacientes con EVI presentasen mayores aumentos en los recuentos de linfocitos T CD4⁺ que los pacientes persistentemente indetectables o con viremias persistentes (478), o bien cambios similares a los pacientes con CV indetectables de forma persistente (528;535;550).

Sin embargo, otros autores han publicado que los pacientes con EVI tendrían menores ganancias de linfocitos T CD4⁺ (532;536;537), argumentando que los EVI producen un aumento en la activación con incremento en las concentraciones de linfocitos T CD4⁺CD45RA⁻CD28⁻ (efectores) y ADN proviral, disminuyendo las células *naïve* CD4⁺ y CD8⁺ activadas (CD45RA⁺CD62L⁺) de forma proporcional a las elevaciones de la CV. Por el contrario, en otros trabajos no se ha observado un aumento en la activación asociado a los EVI (550) o sólo en los pacientes con viremia persistente (528). Esto último sería lo que marcaría un punto crítico de cara al fracaso, pues la activación inmune aumentaría el número de células diana.

También se ha hallado en los pacientes con EVI un aumento en otras respuestas específicas antivirales como anti-CMV (528).

3.8.2. Sobre la evolución viral

Este ha sido uno de los puntos más controvertidos en la literatura sobre los EVI, pues en diferentes trabajos los han asociado a la aparición de mutaciones de resistencia en el VIH (514;532;554). Sin embargo, en estos trabajos el conocimiento de mutaciones preexistentes y/o la sensibilidad de los análisis genotípicos utilizados eran limitadas, por lo que resulta difícil en algunos casos definir si esas mutaciones son consecuencia de los EVI, o ya estaban presentes y pudieran ser incluso predisponentes (532). Otros trabajos, algunos con métodos de genotipado ultrasensibles antes, durante y después de los EVI tanto en virus plasmático como en células

CD4⁺ en reposo, no han hallado que los EVI se sigan de un aumento en el número de mutaciones, siendo virus filogenéticamente iguales que los pre-EVI, bien salvajes o bien con mutaciones que ya estaban presentes en las muestras previas al EVI (370;475;551). E incluso, de forma curiosa, no observan que los pacientes con más número de mutaciones presenten más EVI (370).

3.8.3. Sobre el fracaso virológico

Aunque algún estudio ha relacionado la presencia de EVI con una mayor probabilidad de presentar fracaso virológico, sobre todo cuando son prolongados (479;532), la mayoría de estudios no han encontrado tal asociación a largo plazo, incluso en algunos que mostraban aparición de resistencias (475;477;478;514;533;534;537;537;554) o sólo cuando son prolongados (476) o de gran magnitud (si es de más de 500 copias/mL fracasan el 50%) (515).

Para justificar el porqué estas elevaciones de CV no se asociarían a fracaso virológico se han propuesto diferentes explicaciones. Por un lado, muchos de estos EVI no serían aumentos reales de la CV (370) o no representarían replicación sino liberación de células infectadas pre-TARGA, como se comentó con anterioridad (**apartado 3.3.** de la **Introducción**). En el caso que fuesen realmente aumentos de la replicación viral, se ha propuesto que sería en forma de pequeñas explosiones que son espacial y temporalmente discontinuas y a un nivel insuficiente para conseguir una adaptación viral efectiva (556;557), bien por una disminución de las dianas en el contexto de la disminución de la activación secundaria al TARGA (82;558), bien por las respuestas inmunes aumentadas (475). En cualquier caso, lo que se ha observado es que la tasa de aclaramiento del reservorio latente del VIH desciende más lentamente en los pacientes con EVI de forma inversamente proporcional, sugiriendo un relleno de dicho reservorio (551).

En los casos en los que se han detectado virus resistentes y que posteriormente la CV volvió a ser indetectable (514;554) se ha postulado además que el virus, aunque genéticamente multirresistente, podría ser fenotípicamente sensible a la combinación de fármacos o que las mutaciones conferirían una disminución de la capacidad replicativa (“*fitness viral*”) (559;560).

3.8.4. Sobre la evolución tras la suspensión del tratamiento

Sólo un estudio observacional ha estudiado la influencia de presentar EVI durante el TARGA en la evolución al suspender el tratamiento (550), viendo que los pacientes que presentan EVI (“*blippers*”) tendrían un mayor rebote de CV a las 8 semanas de la interrupción (87.419 copias *vs* 12.252 copias/mL), debiendo reiniciar antes el TARGA. Además, presentaban a las 4 semanas de la misma un aumento significativo en la frecuencia de células CD3⁺HLADR⁺ y CD8⁺ memoria y activadas (CD8⁺CD45RO⁺CD45RA⁻, CD8⁺HLADR⁺) y un descenso significativo en las CD8⁺ *naïve* y con expresión de CD28 (CD8⁺CD62L⁺/CD45RA⁺, CD8⁺CD28⁺). Y todo ello a pesar de que el grupo con EVI presentó un aumento del cuádruple de las respuestas CD8⁺ anti-VIH tras la interrupción y que presentaba mayores respuestas específicas anti-VIH tanto CD4⁺ como CD8⁺, sin correlación con la magnitud del rebote, indicando que, aunque los EVI durante el TARGA proporcionarían suficiente antígeno para activar mayores niveles de respuestas específicas anti-VIH, éstas no se correlacionaban con el control viral tras la interrupción, sino todo lo contrario.

3.9. VIREMIA PERSISTENTE DE BAJO NIVEL

Aunque, como se ha comentado con anterioridad, no existe consenso de la duración y magnitud máximas de un EVI, los episodios de VPBN o los episodios de marcada magnitud son típicamente considerados distintos de los EVI.

Entre los pacientes con CV indetectable con TARGA, aproximadamente el 4% por año desarrollan VPBN, que puede llevar al fracaso virológico si el régimen no cambia (476;478;561;562).

También, como en el caso de los EVI, no está claro cuál sería el nivel superior en el que delimitar que una viremia persistente es de bajo o de alto nivel. Así, mientras que hay autores que definen entre 50 y 400 copias/mL durante al menos 3 meses y por lo menos dos determinaciones (478;516), otros aumentan el límite superior hasta 1000 copias (563) o incluso 10.000 (112). Aunque es fácil pensar que con estas diferencias los resultados publicados no puedan ser comparables, tienen un denominador común, que es la falta de datos que apoyen o

desaconsejen el cambio de TARGA ante estos pacientes, sobre todo cuando son portadores de tratamientos de segunda o tercera línea.

Por un lado, se ha publicado que aunque la incidencia de eventos definitorios de SIDA y muerte en los pacientes que tienen respuesta inmunológica al TARGA en ausencia de respuesta virológica es mayor que en los que tienen ambas respuestas (14 vs 2%), es menor que en los que no tuvieron respuesta inmunológica pero sí virológica (21%) o ninguna de las dos (67%) (564), por lo que los pacientes con VPBN mantendrían beneficios clínicos e incluso inmunológicos (565;566).

Sin embargo, a diferencia de los EVI, los pacientes con VPBN presentan de forma indudable replicación viral, y ésta, en presencia de fármacos antirretrovirales, promueve la selección de mutaciones de resistencia (567). El problema en los pacientes con VPBN es que, en muchos casos, tendrán CV inferiores a 1000 copias/mL, y en estos niveles los métodos de detección de resistencias habituales no son precisos y presentan alta frecuencia de errores en la secuenciación (568). Pero cuando se utilizan métodos más precisos, se encuentra que en los pacientes con VPBN entre 50 y 400 copias el 57% tienen mutaciones de resistencia (516), llegando hasta el 93% en los de VPBN con un límite superior de 1000 copias/mL según otros trabajos (563;569).

Para explicar esta paradoja (presencia de alta tasa de mutaciones de resistencias con un control relativo de la CV e incluso beneficios inmunológicos y clínicos) se han propuesto diferentes mecanismos como la prevención de la apoptosis de los linfocitos T mediada por los IP, alteración en la cinética de renovación de las células T, mejoras en la respuesta inmune y cambios de la *fitness* viral asociados con la resistencia al TARGA. Así, Deeks y col. (112) han reportado que los pacientes con VPBN bajo TARGA presentan mayores respuestas celulares CD4⁺ anti-VIH que los que tienen CV indetectables o viremias de alto nivel, sugiriendo que sería el sistema inmune el que controlaría estos virus con disminución de la capacidad replicativa por sus mutaciones y el TARGA el que controlaría el virus salvaje no resistente.

Pese a este control relativo y potencialmente beneficioso, las mutaciones que se seleccionan podrían agotar las posibilidades de futuros tratamientos cuando empeorase el

control de la CV, aunque cambiar un tratamiento en un paciente con VPBN que no presenta mutaciones podría ser innecesario, por lo que se ha propugnado una mejoría en los métodos de detección de resistencias (516).

4. PAPEL DEL TIMO EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

4.1. INTRODUCCIÓN

El timo es, como la médula ósea, un órgano linfoide primario que contiene un gran número de células linfoides en desarrollo o timocitos derivados de progenitores hematopoyéticos dentro de un entramado de células no linfoides. Los diferentes estadios del desarrollo de los linfocitos T se producen en microambientes específicos dentro del timo (570), de forma que los progenitores de la línea celular T migran a la zona subcapsular, donde las células dobles negativas ($CD3^-CD4^-CD8^-$) se expanden de forma extraordinaria por la acción de la IL-7. Posteriormente en el córtex se diferencian en células doble positivas ($CD4^+CD8^+$) que, tras la selección positiva, se transformarán en linfocitos T maduros $CD3^+CD4^+$ o $CD3^+CD8^+$. Los pasos finales de la maduración ocurren en la médula tímica (**Figura I.4.1.**).

En el momento del nacimiento, un ser humano ya tiene el repertorio T establecido, hasta el punto que la timectomía no causa deficiencias inmunes inmediatas y permite llevar a cabo una vida normal (571). De hecho, con la edad disminuye la función tímica (**Figura I.4.2.**) y por tanto, parece ser que la inmunidad puede sostenerse sin la producción de cantidades significativas de linfocitos T nuevos y la población linfocitaria T periférica se mantiene por las divisiones de las células T maduras (214). Sin embargo, esto es así siempre y cuando no se produzca una pérdida importante de linfocitos T, circunstancia que ocurre básicamente en la infección por el VIH y en los tratamientos intensivos con quimioterapia. En este caso, y a diferencia de lo que se creía inicialmente, la función tímica, que se mantiene hasta edades avanzadas, parece jugar un papel muy importante (90;572;573). La tasa de pérdida de tejido tímico activo es alta hasta los 30-40 años y a partir de entonces desciende más lentamente (574), pero se ha demostrado la presencia de tejido tímico en adultos hasta los 107 años.

En los últimos años decenas de trabajos han mostrado evidencias indirectas del papel del timo en la recuperación de estados de depleción linfocitaria T, inicialmente en tratamientos quimioterápicos (91) y más recientemente en la infección por el VIH con tratamiento

antirretroviral (85;86;572;575-583). En esta infección se produce además una circunstancia peculiar, pues el mismo VIH puede infectar el timo, tanto los timocitos como las células epiteliales, lo que condiciona una alteración de la timopoyesis (42;85;584;585).

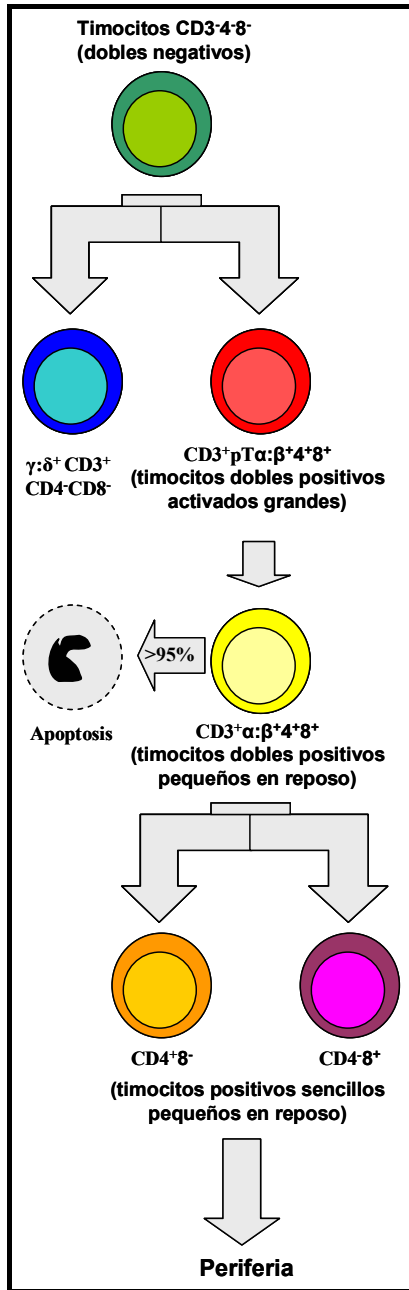


Figura I.4.1. Esquema general de la timopoyesis. Los timocitos más precoces no expresan ni CD3 ni CD4 ni CD8 (dobles negativos). La maduración posterior se produce a través de estadios donde los receptores CD4 y CD8 se expresan por la misma célula (doble positiva), junto con el precursor del receptor de la célula T (pre-T (pTα:β)). Más del 95% de los timocitos mueren en el timo después de convertirse en células pequeñas dobles positivas. Aquellas cuyos receptores se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) propio pierden la expresión del CD4 o CD8 y aumentan la expresión del receptor T, dando lugar a los timocitos positivos sencillos. Éstos, tras madurar, se exportan a la periferia. Modificado de la referencia (214)

Se ha estimado que la producción tímica en adultos humanos es baja, del orden de 10^8 células T por día, lo que explicaría porqué la reconstitución *naïve* sería lenta tras deplecciones de diferente índole (586).

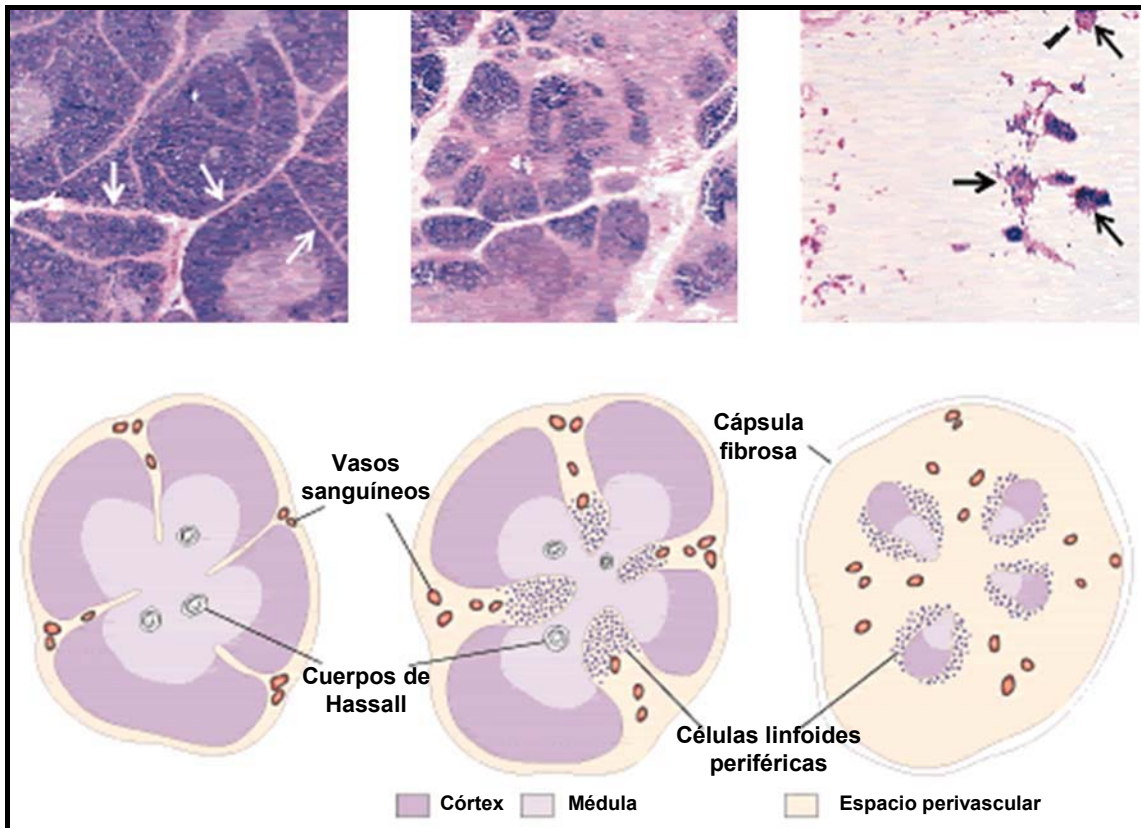


Figura 1.4.2. Involución del tejido tímico con la edad. La timopoyesis tiene lugar fundamentalmente en la médula y córtex tímicos en los primeros años de vida. Con la edad este tejido tímico se atrofia a expensas de los espacios perivasculares (flechas), donde se encuentran células linfoides maduras procedentes de sangre periférica. En la figura se ven tres muestras tímicas con tres esquemas que corresponden a tímicos a las edades de 6 días (izquierda), 15 años (central) y 65 años (derecha). Modificado de la referencia (46).

4.2. ESTUDIO FUNCIONAL DEL TIMO

El estudio funcional del timo hasta la fecha era complejo, debido a la dificultad que conlleva su biopsia y la falta de marcadores fenotípicos inequívocos de células producidas recientemente por él (emigrantes tímicos recientes o ETR) (585). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado distintos métodos para su estudio. Básicamente existen tres estrategias, complementarias entre sí pues ninguna posee una especificidad y/o sensibilidad del 100%: a) el estudio del volumen o tejido tímico mediante pruebas de imagen, básicamente la tomografía computerizada (TC) b) la determinación de los grupos celulares con marcadores fenotípicos de células T *naïve*, y c) la determinación de células portadoras de *TRECs* (del inglés *T cell Receptor Excision Circles* o círculos de escisión del receptor de células T).

4.2.1. TC de timo

La mejor prueba de imagen para la valoración del volumen tímico es la TC mediastínica (584;587;588) (**Figura I.4.3.**), aunque tiene dos grandes inconvenientes: no toda imagen sugestiva de timo por TC significa timopoyesis activa, y la grasa mediastínica no es siempre fácil de distinguir del tejido tímico (46). Los estudios con TC han permitido ver que los pacientes infectados por el VIH tienen alta prevalencia de tejido tímico, que disminuye de forma proporcional con el tiempo de evolución de la enfermedad, y que se correlaciona con el número de linfocitos T *naïve* basal (578), siendo incluso un predictor independiente de la respuesta al tratamiento antirretroviral (575;577;584). Así mismo, con el tratamiento se producen aumentos del recuento de linfocitos T CD4⁺ que se correlacionan con aumentos del volumen tímico (580;583;584).

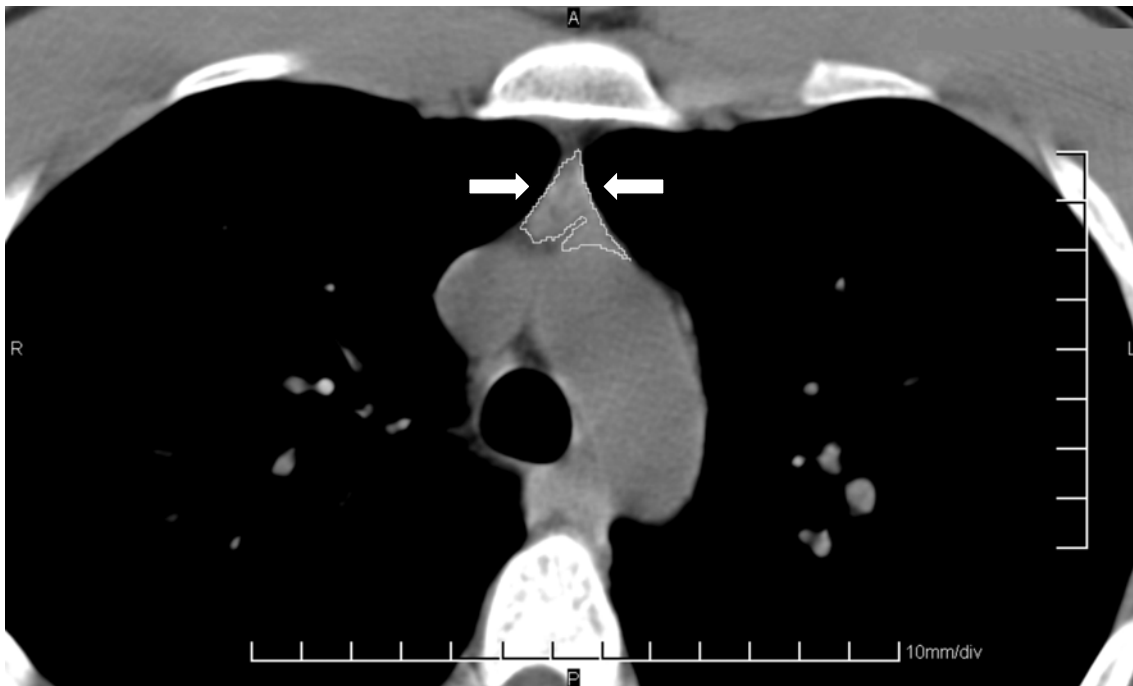


Figura I.4.3. TC torácico que muestra la existencia de tejido tímico (señalado por las flechas blancas y delimitado por una línea blanca) en un varón de 24 años de edad con infección por VIH.

4.2.2. Estudio del inmunofenotipo

Para distinguir entre fenotipos *naïve* y memoria en humanos se han utilizado las isoformas de CD45 RA y RO respectivamente, complementadas o no con el marcador CD62L (589). Identificar células *naïve* con este marcaje para usarlas como ETR tiene cuatro inconvenientes: estas células pueden tener una larga vida quiescente y desde ese punto de vista ser “poco recientes” (590); pueden proliferar de forma antígeno-independiente; pueden proceder de conversión de células memoria CD45RO⁺ (sobre todo las CD8⁺) (591;592); y pueden convertirse en células memoria rápidamente (589). Ello explicaría porqué se ha podido ver aumentos de linfocitos T *naïve* en pacientes VIH timectomizados que, por otro lado, también aumentaron su población de linfocitos T CD4⁺ con TARGA (46). A pesar de ello existen evidencias de una buena correlación de las células CD4⁺ con fenotipo *naïve* y la función tímica (85;583).

Las células *naïve* periféricas también disminuyen con la edad en adultos sanos (593).

Se ha considerado que las células CD4⁺ *naïve* son mejor marcador de función tímica que las CD8⁺ (594), aunque otros trabajos muestran lo contrario (595).

4.2.3. Determinación de *TRECs*

Uno de los mecanismos que el organismo utiliza para conseguir un amplio repertorio de TCR radica en el reordenamiento de los genes que codifican la región variable de dicho receptor. Durante esta reordenación se escinden fragmentos de genoma que se disponen en círculos, los llamados *TRECs* (596). Según el reordenamiento que se realice tendremos uno u otro *TREC*. Uno de estos reordenamientos, el *sj* (*signal joint*) δ Rec- ψ J α *TREC*, está presente en aproximadamente el 70% de nuevas células producidas en el timo, y por defecto es el *TREC* al que se refieren todas las publicaciones (**Figura I.4.4**). Estos *TRECs* son estables, no se replican y no se duplican con la división celular por mitosis, por lo que sólo están realmente en aquellas células que acaban de salir del timo (ETR), quedando “diluidos” cuando éstas se dividen (597). No se forman en lugares diferentes del timo (598), su vida media es prolongada (85) y disminuyen con la edad (595;599).

Se ha demostrado una correlación entre el nivel de *TRECs* en el tejido tímico y el nivel de *TRECs* en sangre periférica (595).

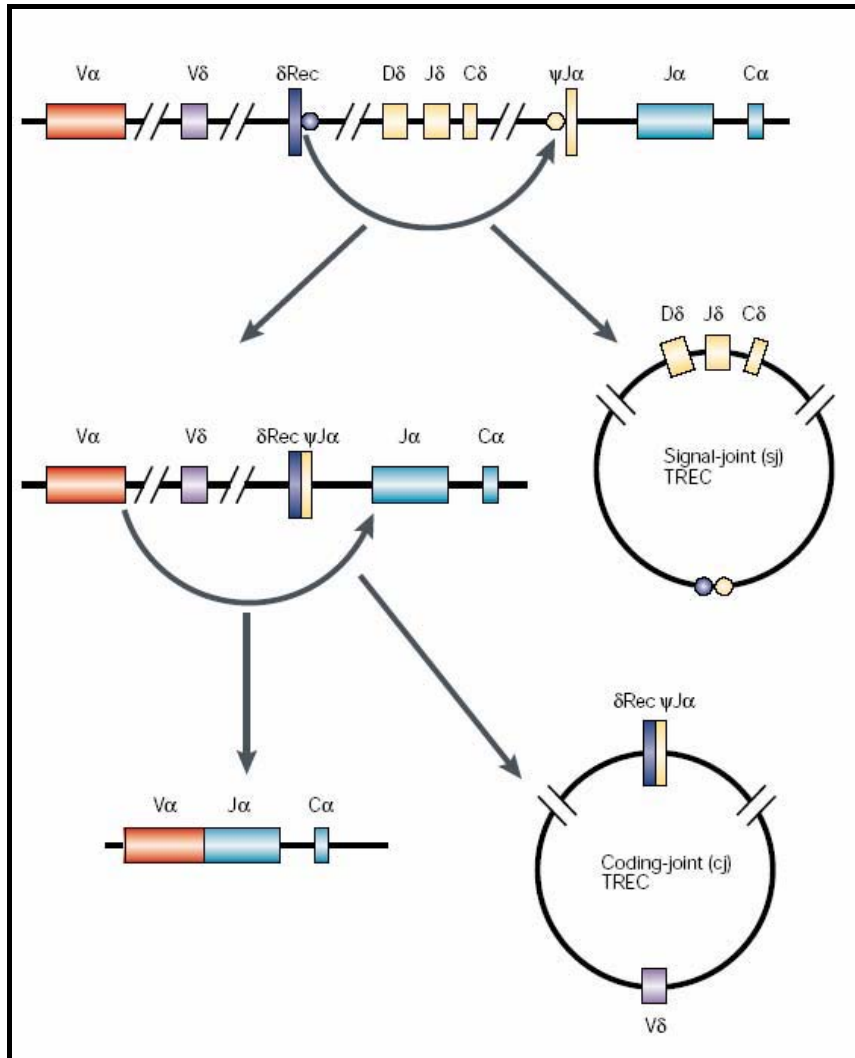


Figura 1.4.4. Formación de los círculos de escisión del receptor de célula T (*TRECs*). Los reordenamientos de los genes V (del término inglés *Variable*), J (del término inglés *Joining*) y D (del término inglés *Diversity*) dan lugar a la delección de fragmentos de ADN que persisten de forma episódica, los *TRECs*. Los reordenamientos en el locus δ/α producen dos tipos de *TRECs*: el (sj)*TREC* (del término inglés *single joint*), procedente del reordenamiento de δRec a $\psi J\alpha$ y presente en el 70% de células T producidas en el timo; y el (cj)*TREC*, del reordenamiento de $V\alpha$ a $J\alpha$. Modificado de la referencia (570)

Múltiples trabajos usan la determinación de *TRECs* para valorar la función tímica, habiéndose demostrado que su concentración es un importante predictor independiente de SIDA y muerte en pacientes con infección por el VIH (600), estando disminuida en algunos de ellos

de forma proporcional al descenso de linfocitos T CD4⁺ (86). Sin embargo, esta técnica también tiene algunas limitaciones, básicamente porque pueden producirse aumentos y descensos en las cifras de *TRECs* que no reflejen cambios en la timopoyesis sino cambios en la proliferación periférica, o redistribución de células portadoras de *TRECs* de tejidos linfoides a sangre periférica (581;582;597;599). Estos inconvenientes se han intentado compensar con diferentes métodos, como la determinación de las células *naïve* que proliferan mediante la objetivación del fenotipo Ki-67 positivo (582), o la expresión en la superficie del CD31 (molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria) que permitiría identificar aquellas células portadoras de *TRECs* que son realmente ETR (601). Otro método que mejora esta determinación es la determinación conjunta de dos tipos de *TRECs*: el habitual *sjTREC* y otro, generado más tempranamente en la maduración de los timocitos, el β *TREC*. Su cociente es una medida más directa de la proliferación intratímica y por tanto de la producción tímica (602;603).

Probablemente el número de *TRECs*, por tanto, no depende sólo de la producción tímica, sino también de la longevidad de las células T *naïve*, por lo que se debe interpretar con precaución los datos de *TRECs* tanto en sanos como, sobre todo, en enfermos.

4.2.4. Otros

Teóricamente la medida de la diversidad del repertorio TCR sería el “patrón oro” para identificar la reconstitución inmune dependiente del timo (604). Sin embargo, dificultades técnicas limitan su uso a pequeños estudios y con conclusiones conflictivas en pacientes infectados por el VIH (169;605).

Por otro lado, recientemente se ha constatado que la tomografía por emisión de positrones puede identificar el tejido tímico metabólicamente activo por captación de F18-fluorodeoxiglucosa, correlacionándose con otras medidas de función tímica (606).

4.3. INFECCIÓN POR EL VIH Y TIMO

Se ha propuesto que el timo juega un papel crucial en la patogenia de la infección por el VIH, por un lado en los mecanismos de depleción linfocitaria, y por otro, en los mecanismos de mantenimiento y, sobre todo, recuperación tras TARGA de la población celular T *naïve*.

4.3.1. Influencia de la infección tímica por el VIH sobre la depleción linfocitaria

El VIH-1 es capaz de infectar el timo y alterar rápidamente su función, sobre todo en jóvenes, como se ha demostrado en diferentes estudios en animales, autopsias e *in vivo* (42-47), colaborando en la depleción de linfocitos T CD4⁺ (23;42;85;584;607). Esta disfunción se compensa parcialmente durante las fases iniciales por una proliferación periférica de las células T *naïve* (571;602;608;609).

Esto hace que, a menudo, los hallazgos en diferentes estudios presenten complejas correlaciones difíciles de interpretar correctamente. En un reciente trabajo Arron y col. (610) observaron que la timectomía en macacos rhesus (*Macaca mulatta*) jóvenes provocaba un descenso similar en los *TRECs* y el recuento de linfocitos T CD4⁺ al producido por la infección por SIV. Sin embargo, cuando los timectomizados eran infectados por SIV, el descenso de linfocitos T CD4⁺ y *TRECs* era aún mayor, lo que indicaría que el papel del timo en la depleción linfocitaria de los pacientes infectados por el VIH es sólo parcial.

La toxicidad tímica producida por el VIH puede seguir además mecanismos complicados. Últimamente se ha sugerido que pacientes con CV similares podrían tener diferentes grados de toxicidad en el timo dependiendo de diferencias en el tropismo viral. La mayor parte de la proliferación celular intratímica tiene lugar de forma precoz en la zona subcapsular, por lo que alteraciones en ese microambiente tendrán un impacto mayor en la producción tímica. Dado que la mayoría de timocitos tienen el correceptor CXCR4, las cepas X4 del VIH pueden infectar timocitos maduros e inmaduros. Sin embargo, sólo los timocitos más maduros expresan el correceptor CCR5, por lo que las cepas R5 del VIH sólo podrán infectar éstas células tímicas. Esto explicaría porqué en modelos animales en simios la infección por diferentes cepas produce patrones de depleción linfocitaria periféricos similares pero muy

diferentes a nivel intratímico, con una mayor depleción cuando la cepa es X4 (611). Incluso se ha llegado a sugerir que el timo podría actuar como reservorio de cepas X4 (612).

4.3.2. Influencia del timo en la repoblación celular en la infección por el VIH

Múltiples estudios han demostrado consistentemente que la mayoría de pacientes infectados por el VIH tienen una función tímica residual que disminuye de forma proporcional con el tiempo de evolución de la enfermedad (habiéndose sugerido incluso la concentración de *TRECs* como un predictor independiente de SIDA y muerte en pacientes con VIH) y que aumenta con el TARGA de forma proporcional al aumento de linfocitos T CD4⁺ (85;86;572;575-584;600), lo que serviría para restaurar total o parcialmente la inmunidad de estos pacientes, al menos a niveles que pueden prevenir las infecciones oportunistas. De hecho, el volumen tímico se ha propuesto como un predictor independiente de la respuesta al tratamiento antirretroviral (575;577).

La mayoría de los estudios demuestran que una función tímica aumentada contribuye al aumento en los recuentos de linfocitos T CD4⁺ con TARGA tanto en adultos como, sobre todo, en niños. De hecho, estudios recientes (613) muestran que pacientes infectados perinatalmente y bien controlados con TARGA presentan en la edad adulta (18 años) volúmenes tímicos, recuentos de linfocitos T CD4⁺ y *TRECs* similares a adultos sanos, por lo que el TARGA en infancia-adolescencia permitiría recuperar o prevenir la pérdida de función tímica. Por el contrario, los adultos de más de 45 años parecen tener una capacidad disminuida para la reconstitución inmune (88), lo cual es importante teniendo en cuenta el aumento en el número de pacientes mayores que adquieren la infección y el aumento de longevidad gracias al TARGA (614). Además, recientemente se ha descrito en pacientes no infectados por el VIH que el TARGA aumenta los parámetros de función tímica, por lo que no sólo lo hace al inhibir la replicación viral y la toxicidad del VIH sobre el tejido tímico, sino que por sí mismo, fundamentalmente cuando incluye un inhibidor de la proteasa, sería capaz de proteger los timocitos de la apoptosis programada y aumentar la producción de ETR (615).

Deben existir sin embargo interacciones complejas entre los diferentes marcadores de función tímica y la homeostasis celular T que hacen que algunos hallazgos parezcan contradictorios. Así, algún estudio (616) ha hallado células con fenotipo *naïve* y *TRECs* elevados en pacientes con poco timo radiológico, grandes recuperaciones de linfocitos T CD4⁺ en pacientes con nadir bajo y poco volumen tímico (617), o incluso aumentos de linfocitos T *naïve* en pacientes con infección por el VIH timectomizados (46). Para explicar estos hallazgos se han propuesto diferentes explicaciones: la existencia de remanentes de tejido tímico involutivo con alta capacidad productiva no visibles por TC; una pérdida preferencial de las células no portadoras de *TRECs* o una mayor supervivencia de las portadoras; la posibilidad de una maduración T extratímica por migración de células madre pluripotenciales desde la médula ósea a tejidos no tímicos (médula ósea, hígado, intestino, ganglios linfáticos mesentéricos y periféricos) (618-621); o que exista una reconstitución celular T con TARGA diferencial en función del volumen tímico, de forma que aquellas personas con volúmenes tímicos pequeños presentarían una reconstitución sobre todo por expansión periférica mediada por IL-7, mientras que en aquellas personas con mayor volumen tímico la desaparición de la activación inmune puede reconducir la pérdida de células T y su restauración a través del timo (622).

4.3.3. Influencia del timo en las respuestas discordantes al TARGA

La evolución natural de un paciente con infección por el VIH que recibe un TARGA correcto consiste en la supresión de la replicación viral con CV indetectables y el aumento progresivo del recuento de linfocitos T CD4⁺. Y cuando este tratamiento fracasa se producirán aumentos de la CV que se acompañarán de descensos en la población T CD4⁺. Sin embargo se han descrito situaciones de respuesta discordantes.

Por un lado, existen los pacientes que presentan una buena supresión viral sin recuperación del recuento de linfocitos T CD4⁺. En estos pacientes, la disminución de la función tímica parece tener un papel importante, aunque no único. Se sabe que el nivel de función tímica basal al inicio del TARGA se correlaciona con la evidencia de reconstitución tímico-dependiente tras TARGA, y que algunos pacientes no retienen una adecuada función tímica para

esta recuperación, aunque se desconoce si las causas del fallo tímico en estos pacientes son dependientes del huésped o de la agresión viral sobre el timo.

A favor de este papel del timo en este síndrome de discordancia virológica van las observaciones de que la incidencia de dicho síndrome aumenta con la edad (572) y se correlaciona de forma inversa con el nadir de linfocitos T CD4⁺, de forma que los pacientes que tienen más de 200 linfocitos T CD4⁺/mm³ antes del TARGA son los que tienen mayores aumentos en el contenido de linfocitos T CD4⁺ con *TRECs* (88;623), pudiendo reflejar cierta preservación del tejido tímico. Además, entre los pacientes con recuento nadir de linfocitos T CD4⁺ bajo, algunos recuperan peor el recuento de linfocitos T CD4⁺ que otros, y éstos son los que tienen menos tejido tímico (por TC y *TRECs*) (616). Tampoco se conoce si esta inferior capacidad tímica es resultado de una menor recuperación con TARGA o un mayor deterioro antes de iniciar tratamiento.

Por otro lado están los pacientes que tienen una discordancia inmune, y a pesar de presentar una replicación mantenida del VIH bajo TARGA, consecuencia de la emergencia de virus resistentes, muestran elevaciones persistentes del recuento de linfocitos T CD4⁺. Esta situación se da hasta en el 25 % de adultos con TARGA, habiéndose postulado que se deba a un virus menos virulento, con menor *fitness* viral, y por tanto más fácilmente controlable por el sistema inmunitario. Pero además se ha propuesto que tenga también menor replicación en el timo y permita así una mayor recuperación del compartimiento linfocitario T (624;625).

4.3.4. Relación entre EVI y timo

Un único trabajo ha valorado la influencia de los EVI a nivel tímico. Papasavvas y col. (550) hallaron que los pacientes que presentaban EVI tras un período de TARGA tenían mayor cantidad de *TRECs* de forma significativa que los que no tenían EVI, aunque no ofreció trascendencia a este dato por la ausencia de diferencias basales, la pequeña magnitud del cambio en esa variable y la ausencia de cambios asociados en las subpoblaciones celulares T.

4.3.5. Papel del timo en las interrupciones del TARGA

Si el VIH afecta el tejido tímico, las interrupciones de TARGA podrían afectar la función tímica. Hasta la fecha, el efecto del rebote viral sobre la función tímica ha sido poco estudiado, habiéndose objetivado un descenso en el número de *TRECs* en los primeros meses, sin estar claro que dicha disminución fuese por un aumento en la proliferación periférica o por un descenso real en la función tímica (608).

Dos trabajos recientes han descrito una correlación entre el volumen basal tímico y la evolución virológica e inmunológica tras la suspensión del tratamiento (626;627). En el primero de ellos se encontró que, aunque sólo al inicio de la interrupción (semana 4), el volumen basal tímico (y no los *TRECs*) se correlacionaba directamente con la CV e inversamente con los cambios en el recuento de linfocitos T CD4⁺ en la semana 4. Aunque no está claro el porqué ni las influencias a largo plazo, una posible explicación sería que un timo más funcional podría ser un sustrato de la replicación viral en sí mismo o que fuese una fuente de nuevas células CD4⁺ diana para la infección y la replicación viral (626). En el segundo, más reciente, se ha descrito que el volumen tímico permite predecir la pérdida de linfocitos T CD4⁺ en pacientes con nadir superior a 250 células/mm³. Así, los pacientes con volúmenes tímicos mayores (> 5,6cm³) presentaban un menor descenso en las cifras de linfocitos T CD4⁺ tras la suspensión, tardando más tiempo en alcanzar un nivel de 350 linfocitos T CD4⁺/mm³, sucediendo lo contrario en aquellos pacientes con volúmenes tímicos menores (627).

4.3.6. Terapéuticas en la infección por el VIH con potenciación de la función tímica

Si el timo juega un papel en la repoblación celular T, la potenciación de su función sería interesante, especialmente en aquellos pacientes en los que dicha repoblación es dificultosa (los que presentan discordancia virológica). En este sentido se han probado diferentes alternativas:

4.3.6.1. IL-2

Se sabe que la administración intermitente de IL-2 a los pacientes con infección por el VIH produce un aumento en el recuento de linfocitos T CD4⁺, aumenta los repertorios *naïve* y

memoria, y disminuye la activación celular T (628). Sin embargo, no está claro si este aumento lo consigue por un aumento en la proliferación periférica de las células existentes, un aumento en su supervivencia, una producción tímica o una combinación de estos factores. A este respecto existen trabajos controvertidos, pues aunque inicialmente parecía que era debido a expansión periférica, sin cambios en volumen tímico y con disminución de *TRECs* (629;630), estudios más recientes han mostrado aumentos de ETR (631;632).

4.3.6.2. *Hormona de crecimiento*

Modelos animales han demostrado que la hormona de crecimiento es necesaria para una función tímica normal, y un estudio reciente en niños con infección por el VIH ha correlacionado su déficit con una alteración de los parámetros inmunitarios (633). Por ello, ya existen grupos que han evaluado los efectos de la terapia con esta hormona en combinación con TARGA en la infección por el VIH, habiéndose descrito aumentos en las células *naïve* (178;634) y aumento en el volumen tímico (178). Otros estudios se encuentran en marcha, incluyendo uno entre los Hospitales Clínic y Germans Trias i Pujol en el que se estudia si la hormona de crecimiento es capaz de aumentar la función tímica y el repertorio celular T, consiguiendo así una mejor respuesta a antígenos vacunales nuevos.

4.3.6.3. *IL-7*

Ver **apartado 5** de la **Introducción**.

5. PAPEL DE LA INTERLEUCINA 7 EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

5.1. INTRODUCCIÓN

Aparentemente en condiciones de salud el tamaño del compartimiento de linfocitos T se mantiene estable a lo largo de la vida, a pesar de la producción tímica de nuevas células T y la expansión de las existentes tras su estimulación por antígenos durante las respuestas inmunes (635). Para ello se cree que debe existir una regulación homeostática que provoque cambios en la timopoyesis y/o redistribución-expansión periférica, así como en la supervivencia de las células existentes cuando sea preciso. Para esta homeostasis serían necesarios estímulos antigénicos, complejos del MHC y factores de crecimiento (636). Entre las citocinas y hormonas identificadas como posibles reguladores, la IL-7 parece jugar un papel esencial. Esta citocina posee una serie de características que la hacen “ideal”: a) es producida predominantemente por los tejidos del estroma y células dendríticas en ganglios linfáticos, lo que mantendría su producción a pesar del descenso de linfocitos T (637); b) tiene capacidad de aumentar la supervivencia de los linfocitos T maduros (638), hecho observado en estados de depleción linfocitaria (82); c) aumenta los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en situaciones de depleción linfocitaria T (639), y lo hace a través de vías timo y no timo-dependientes (640); y d) tiene efectos sobre la timopoyesis (641).

5.2. FISIOLÓGÍA DE LA IL-7

5.2.1. Estructura y origen

La IL-7 es una glicoproteína de 25 kDa producida por diferentes tipos celulares como las células del estroma, células B normales y malignas (642), células del epitelio tímico (643), células del epitelio intestinal (644), células derivadas de la médula ósea fibroblasto-like (645), queratinocitos y células dendríticas (637).

5.2.2. Funciones

La IL-7 tiene un papel importante en la homeostasis linfocitaria, con influencia en varios estadios del desarrollo celular, desde los precursores en la médula ósea a las células maduras en la periferia (**Figura I.5.1.**):

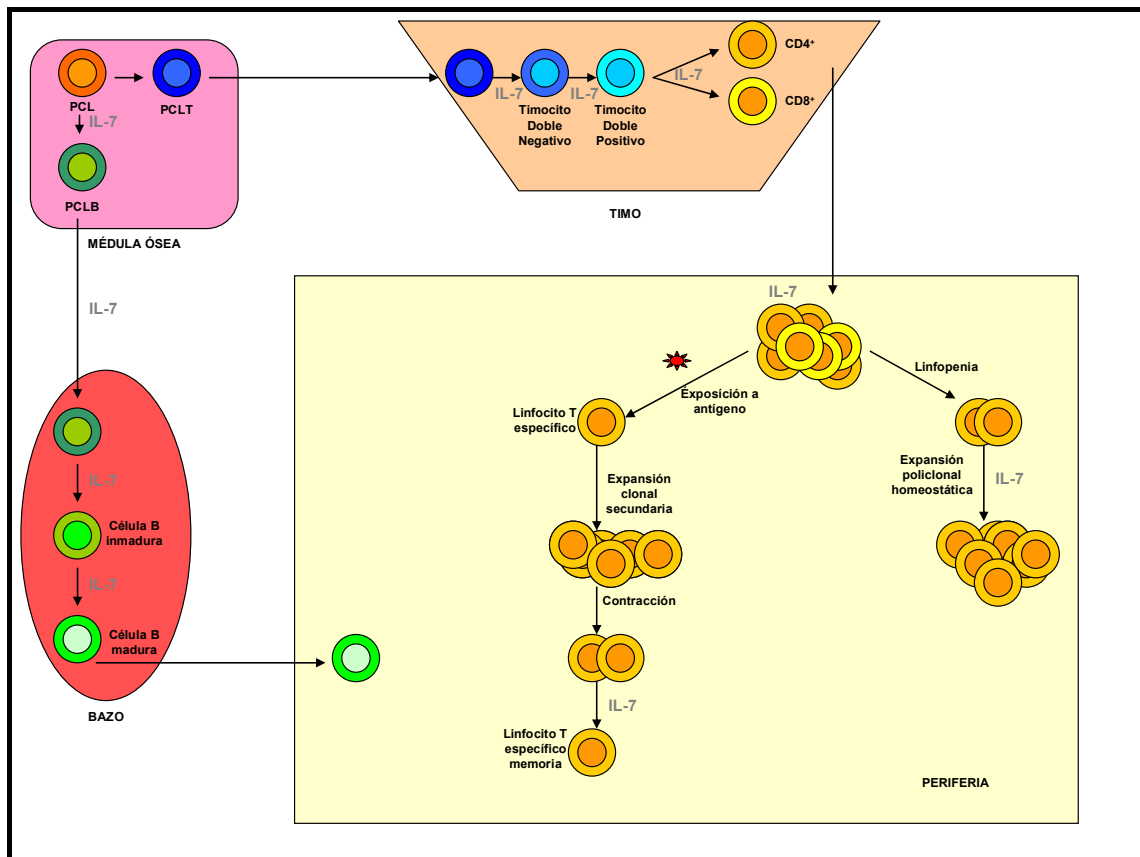


Figura I.5.1. Funciones de la Interleucina 7 (IL-7). La IL-7 actúa a múltiples niveles de la homeostasis linfocitaria, tanto sobre los precursores celulares linfocitarios (PCL) B y T, como en la maduración de los mismos en células B y, sobre todo, sobre la timopoyesis y la homeostasis linfocitaria T en periferia.

- Es un factor de crecimiento y mantenimiento para los timocitos inmaduros y maduros y promueve la supervivencia de los timocitos *in vivo* (646).
- Contribuye a la producción tímica de linfocitos T durante la recombinación de TCR y es un cofactor para el reordenamiento V(δ)J del gen TCR β (647;648).

- Determina la diferenciación celular linfocitaria intratímica, primero sobre los timocitos triple negativos (649) y posteriormente en la diferenciación a linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ (650).
- Regula la maduración y aumenta la supervivencia de las células T CD4⁺ y CD8⁺ *naïve* y memoria (638;651-656).
- Durante las infecciones virales, controla la transición de las células CD8⁺ T_{EM} a T_{CM}.
- Facilita la expansión de las células T CD4⁺ y CD8⁺ periféricas *naïve* y memoria en huéspedes con depleción linfocitaria (639;655-660), de forma independiente de CD28 (661).
- En condiciones de no linfopenia induce la proliferación de células T *naïve* del cordón umbilical, pero no en los adultos (662-665).
- Promueve la movilización de las células madre pluripotenciales hematopoyéticas desde la médula ósea a la circulación periférica (666).
- Tiene efectos complejos sobre la apoptosis linfocitaria T. Por un lado, los linfocitos T CD4⁺ son más sensibles a la muerte celular tras la exposición a IL-7 y aumentan sus niveles de apoptosis dependiente de caspasas (651). Pero por otro lado, se ha demostrado que la IL-7 tiene también un efecto anti-apoptótico en las células T periféricas al aumentar la expresión de Bcl-2 y el factor pulmonar Kruppel-like (656;659;667-672).
- También es un factor de crecimiento para las células B, jugando un papel importante en su supervivencia, diferenciación y la proliferación de sus precursores (673).
- También es importante en la supervivencia y diferenciación de otros tipos celulares como las células dendríticas (636), incluyendo las dendríticas tímicas (674).

Para demostrar su papel homeostático se han llevado a cabo en los últimos años múltiples investigaciones que demuestran que la IL-7 se eleva en respuesta a estados de depleción de linfocitos T de cualquier causa de forma proporcional al descenso de linfocitos T CD4⁺, al volumen tímico y los *TRECs*. Y cuando se normalizan los linfocitos T se producen

descensos proporcionales en la IL-7 plasmática (636;675;676). Se ha relacionado también la IL-7 con la atrofia tímica propia de la edad (584).

Por otro lado, los ratones deficientes de IL-7 o su receptor, y los tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-7 experimentan un desarrollo anómalo tanto T como B (677). En humanos, un defecto en el receptor provoca un grave síndrome de inmunodeficiencia combinada y falta completa de células T (678).

5.2.3. Regulación

El mecanismo por el cual la IL-7 se eleva en respuesta a la depleción linfocitaria T de forma proporcional al descenso linfocitario (679;680) no está claro. Aunque se ha propuesto un aumento de la producción, ésta parece ser constante y sus niveles estarían más determinados por su consumo y por la disponibilidad de células diana que expresan su receptor, de forma que cuando los receptores linfocíticos a los que se une disminuyen, se produce un aumento de su fracción libre (680;681).

La regulación de su expresión genética no se ha estudiado a fondo y no se han identificado secuencias inducibles.

5.3. RECEPTOR DE LA IL-7

El receptor de la IL-7 (IL-7R) consiste en una cadena α (CD127), y una cadena γ , el receptor común de citocinas (CD132) (682), que se dimerizan (683) y forman un receptor con tres dominios citoplasmáticos, A (acídico), S (contiene Serina) y T (contiene Tirosina), que sirven de regiones de acoplamiento potencial para las kinasas (684) (**Figura I.5.2.**).

Es un receptor con alta afinidad para la IL-7 (682) que activa vías reguladoras (a través de fosforilaciones de la tirosin-, serin- y treonin- protein-quinasas) que inducen la supra-regulación de factores de supervivencia celular T (como el Bcl-2 y el factor pulmonar kruppel-like) (685-690).

El IL-7R se expresa a lo largo de todo el desarrollo celular T en el timo, pero desciende en los timocitos doble positivos (641). Se observa de forma constitutiva en las células T *naïve* y

disminuye de forma rápida y profunda en la activación (659;691), re-expresándose o persistiendo expresado al final de la fase de expansión en una minoría de las células T (que representan un 5-10% de las células efectoras), sugiriendo tener un papel crucial en la transición de efector a memoria (692).

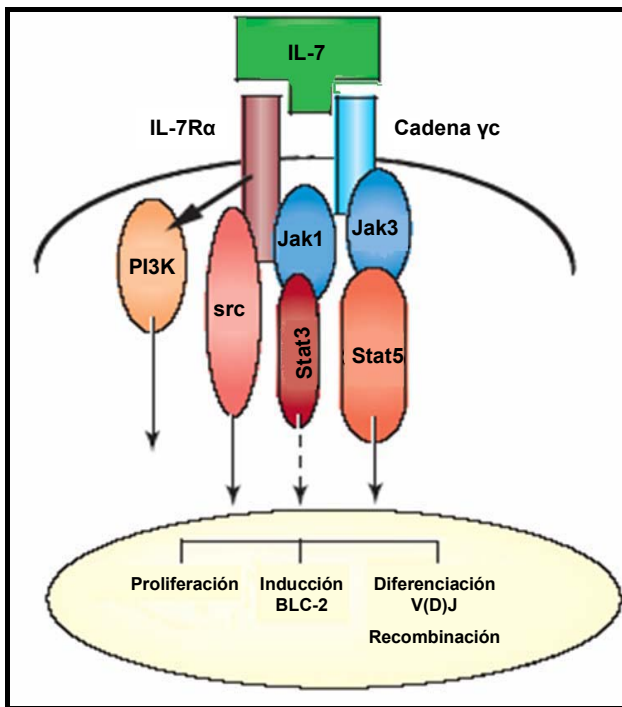


Figura 14. Modelo del receptor de la IL-7. El receptor de la IL-7 (IL-7R) consiste en una cadena α (CD127), y una cadena γ , el receptor común de citocinas (CD132). La unión de la IL-7 a su receptor desencadena una serie de transducción de señales a través de diferentes enzimas y mecanismos que finalmente permiten el desarrollo de sus funciones. Modificado de la referencia (691).

La desregulación del sistema IL-7/IL-7R lleva a graves reducciones en la supervivencia periférica T (659;669) *in vitro* y a inmunodeficiencias combinadas graves *in vivo* (678;693-695).

Los mecanismos que regulan la expresión de los componentes del IL-7R no están totalmente definidos, habiéndose observado que se disminuye su expresión en las células T tras la exposición a IL-2 *in vitro* (696) pero no *in vivo* (632), o tras la administración de IL-7 en modelos animales (697), mientras que aumenta su expresión tras la administración de glucocorticoides (698).

5.4. PAPEL DE LA IL-7 EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

5.4.1. IL-7 y homeostasis linfocitaria en la infección por el VIH

La depleción linfocitaria que provoca la infección por el VIH es un reto para la homeostasis de las células T y para la que parece ser su principal citocina reguladora, la IL-7. Los pacientes con infección por el VIH, tanto aguda como crónica (699), tienen generalmente concentraciones plasmáticas altas de IL-7. Dicho aumento parece ocurrir en las primeras semanas de infección y persiste a lo largo de la progresión de la enfermedad, presentando una correlación inversa con el recuento de linfocitos T CD4⁺ y positiva con la CV plasmática (680;699-701), lo que sugiere un mecanismo para restaurar el recuento celular periférico en pacientes linfopénicos a través de un aumento de su producción o de la disponibilidad de la IL-7 (679;680;702).

Posteriormente, con el inicio del TARGA y la elevación del recuento de linfocitos T CD4⁺ se produce una disminución de las concentraciones plasmáticas de IL-7. Se ha observado que existe una correlación positiva entre los niveles basales de IL-7 y el recuento de linfocitos T CD4⁺ tras 20 meses de TARGA (703;704), habiéndose propuesto que dichos niveles pueden ser un buen marcador predictivo de la restauración de linfocitos T CD4⁺ bajo TARGA (703-707). De hecho, diferentes estudios han visto que presentar niveles bajos de IL-7 a pesar de una linfopenia grave se asocia con una peor reconstitución inmune (572), mientras que altos niveles de expresión de IL-7 y CD127 se han asociado a una reconstitución inmune exitosa (617). Por el contrario, otros estudios han encontrado que los niveles de IL-7 no se normalizan tras la iniciación de TARGA o lo hacen sólo en los pacientes con primoinfección (699), sugiriendo que la reconstitución inmune debe estar mediada por otros factores (708).

Lo que todavía hoy no está claro es si la IL-7 favorece la repoblación linfocitaria T a través de aumentar la producción tímica, la proliferación periférica o ambas. Por un lado, un estudio mostró que niveles basales elevados de IL-7 se correlacionaban con la capacidad de rebote tímico tras TARGA (623), apoyando el papel del timo. Sin embargo, el que otros estudios no hayan demostrado que la IL-7 prediga la reserva tímica (709), y que ensayos recientes en los que se administraban dosis suprafisiológicas de IL-7 a simios infectados por SIV mostraran un aumento de las poblaciones linfocitarias T CD4⁺ periféricas (710;711), sugieren que el aumento de la reconstitución inmune mediada por IL-7 probablemente ocurra a

través de la redistribución y proliferación de las células T periféricas más que por aumento de la producción tímica (710).

Cabe también comentar que se ha postulado que la IL-7, que se eleva rápidamente tras la infección por SIV en los primates conocidos como “*sooty mangabeys*” (*Cercocebus atys*), podría jugar algún papel en la falta de progresión a la enfermedad de estos primates (712).

5.4.2. IL-7 y replicación viral

Además del papel homeostático que la IL-7 pueda jugar en la repoblación linfocitaria T en los pacientes con infección por el VIH, existen evidencias de que esta citocina presenta interacciones relevantes con la propia replicación viral, potenciándola. Así, aunque recientemente se ha visto que la IL-7 podría disminuir la replicación viral en macrófagos (713), múltiples trabajos han demostrado que la IL-7 es capaz de inducir de forma potente la replicación del VIH-1 *in vitro* a partir de cultivos de células infectadas de forma latente, o en modelos animales (665;714-720), y hace las células *naïve* más susceptibles a la infección por el virus (719;721). Además, se han correlacionado los niveles de IL-7 con la CV (680), la progresión de la enfermedad (722;723), la aparición de cepas X4 más virulentas (700), o la apoptosis neuronal, sugiriendo un papel de la IL-7 en el complejo demencia-SIDA (724).

Este efecto tiene una doble lectura cuando se piensa en su potencial terapéutico. Por un lado, podría estimular la replicación de las células infectadas de forma latente y podría ser usada como terapia de activación inmune aditiva al TARGA para purgar los reservorios. Por otro lado, también se ha propuesto que podría fomentar la progresión de la enfermedad favoreciendo la aparición de cepas de VIH más virulentas (725), ya que aumentaría la expresión de CXCR4 en los timocitos maduros pero no de CCR5, favoreciendo la replicación de cepas X4.

Finalmente, también se ha demostrado que la IL-7 potencia en humanos la actividad celular CD8⁺ citotóxica anti-VIH *in vitro* (726) y en ratones inmunizados con proteínas de la envuelta del VIH tanto la actividad anti-VIH CD8⁺ como la CD4⁺ (727).

5.4.3. Papel del receptor de la IL-7 en la infección por el VIH

Se han descrito cambios en la expresión del IL-7R en el contexto de la infección por el VIH, básicamente un descenso en las poblaciones linfocitarias T que podría contribuir a la disrupción de su homeostasis. Así, se ha demostrado una disminución de su expresión y por tanto de su sensibilidad a la IL-7 en los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, incluyendo los específicos anti-VIH, tras la infección (728;729), recuperándose con el TARGA a partir de los 6 meses (729-732). Dicha disminución de la expresión se produce tanto en la proporción de linfocitos T CD8⁺CD127⁺ como en la densidad de receptores CD127 en las células, y es proporcional a la caída de linfocitos T CD4⁺ (733).

En los linfocitos T CD4⁺ también se produce un descenso significativo de la expresión del IL-7R con la infección, de manera inversamente relacionada con la activación inmune y la apoptosis, y de manera directamente relacionada con el recuento de linfocitos T CD4⁺, sin haber hallado correlación con la CV (734).

Esta disminución puede provenir de una infraregulación transitoria tras una activación T antígeno-inducida (735), teniendo en cuenta que en la infección por el VIH hay un estado de hiperactivación T persistente (736).

5.5. POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LA IL-7 EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Dado el papel central de la IL-7 en la homeostasis celular T y su toxicidad limitada, se ha propuesto en los últimos tiempos como una firme candidata para su utilización como coadyuvante en la terapia de las linfopenias, o para aumentar las respuestas antígeno-específicas en tres grandes escenarios: cáncer, trasplante de médula ósea e infección por el VIH.

En el caso de la infección por el VIH, se ha postulado como un tratamiento coadyuvante con un objetivo doble. Por un lado, como inmuno-adyuvante, al aumentar la producción de linfocitos T por vías timo dependientes o no, ayudando a la repoblación celular. Y por otro lado, como activador de linfocitos T CD4⁺ latentes y así estimular e inducir la expresión de sus provirus, para purgar el conjunto de células latentemente infectadas y aumentar la tasa de aclaramiento del reservorio viral (181). Aunque conceptualmente esta terapia de activación inmune se ha demostrado con éxito *in vitro* con otros agentes estimulantes como el OKT3, la

IL-2 o el IFN- γ , capaces de estimular la expresión viral de células infectadas de forma latente induciendo su muerte (172;737-741), la eficacia de esta estimulación no se ha demostrado *in vivo*. Así, se podrían plantear problemas como que los virus latentes residan en diferentes tipos celulares que tengan una respuesta heterogénea a la estimulación y precisen de diferentes agentes estimulantes. O que la estimulación condujese a una diseminación del virus, aunque ésta estaría inhibida por la combinación con un TARGA supresivo.

Hasta la fecha, la administración de IL-7 sólo se ha probado en modelos animales, con diferentes resultados. Desde el punto de vista de la inmunomodulación, trabajos en primates muestran que el efecto que produce sobre la expansión periférica parece más importante que el que produce sobre la timopoyesis (710;742). De hecho, se han hallado efectos contradictorios sobre la timopoyesis, con aumentos en algunos trabajos pero no en otros (743;744), habiéndose descrito un efecto dosis dependiente (745). Además aumenta el paso a fenotipo memoria (746).

Desde el punto de vista de la estimulación y activación de las células infectadas latentes, estudios en ratones y en primates no homínidos infectados con SIV han mostrado que puede estimular la expansión T periférica y el aumento de linfocitos T CD4⁺ *naïve* sin aumentar la replicación viral (710;711;747). Un estudio reciente prometedor (748) ha observado que la administración de IL-7 en macacos infectados con SIV y TARGA no produjo cambios en la CV, aumentó el número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ memoria circulantes expresando marcadores de activación (HLA-DR⁺ y CD25⁺) y proliferación (Ki-67⁺), así como los *naïve* CD45RA⁺CD62L⁺, tanto por proliferación periférica como aumentando la producción tímica *de novo*. Sin embargo, el tratamiento se asoció a la aparición de anticuerpos anti-IL-7 y la desaparición del efecto.

Se han valorado también combinaciones de citoquinas como IFN- α e IL-7 *in vitro*, observando una potenciación del efecto anti-VIH del IFN- α con el efecto beneficioso sobre la supervivencia y maduración celular T de la IL-7 (749).

Actualmente se están iniciando estudios con IL-7 recombinante humana en pacientes con cáncer e infección por el VIH.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. FUNDAMENTO DEL ESTUDIO

La infección por el VIH se caracteriza por un descenso progresivo en la función y el número de linfocitos T CD4⁺, responsables de regular y potenciar la respuesta inmune celular (750). Ello tiene como consecuencia la aparición de infecciones oportunistas (751). Con la introducción del TARGA han disminuido significativamente la morbilidad y mortalidad asociadas a la infección por el VIH. Este beneficio se alcanza mediante la supresión de la replicación viral, logrando un incremento del número absoluto de linfocitos T CD4⁺ circulantes (82). Sin embargo, en contra de las primeras expectativas cuando el tratamiento antirretroviral se introdujo, actualmente se sabe que este aumento de linfocitos T CD4⁺ permite sólo una recuperación inmunológica parcial, en la que se restablece en parte la respuesta inmune contra infecciones oportunistas, pero sin lograr una mejoría de la respuesta específica contra el propio virus (14;105;114;752). Consecuencia directa de ello es que el tratamiento antirretroviral por sí mismo es incapaz de erradicar la infección. Por eso, cuando se suspende el tratamiento, el virus reaparece en sangre periférica, siendo necesario mantenerlo de por vida, lo que conlleva costes elevados tanto en forma de efectos secundarios como económicos. Este es el principal motivo por el que se buscan terapias alternativas que permitan retirar el tratamiento antirretroviral de manera definitiva o, al menos, durante períodos variables de tiempo. Estos períodos de tiempo sin TARGA serán más prolongados si utilizamos estrategias previas a la retirada encaminadas a estimular el sistema inmunológico, sobre todo la recuperación de la respuesta específica celular contra el VIH, con el objetivo de controlar, al menos parcialmente, la replicación viral tras la retirada del TARGA (119).

Actualmente se han llevado a cabo estrategias como las STI y terapias con inmunomoduladores (119;149). Dichas estrategias han demostrado conceptos como la capacidad del sistema inmune de recuperar respuesta celular específica frente al VIH, pero consiguen una disminución del *set point* viral únicamente en una minoría de pacientes. Son necesarios por tanto nuevos abordajes en este sentido.

De hecho, es sabido que al inicio de la infección los pacientes presentan respuestas celulares contra el virus, fundamentalmente por parte de los linfocitos T CD4⁺ colaboradores y los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (35;54-56). Estas respuestas son especialmente intensas en todos los pacientes durante la primoinfección y podrían afectar la progresión de la infección (66;67). Pero a pesar de ellas y de las respuestas humorales anti-VIH, debido fundamentalmente a mecanismos de escape viral y, sobre todo, la desregulación y destrucción de los linfocitos T CD4⁺ mediada por el virus, la mayoría de pacientes no tratados experimentan una alta replicación viral y pérdida de linfocitos T CD4⁺ (71).

Al iniciar el TARGA las respuestas CTL usualmente descienden (36;61;92-94;97-103), mientras que las respuestas específicas anti-VIH CD4⁺ se pueden preservar si se inicia de forma precoz el TARGA (durante la fase aguda de la infección) (56;66;94), aunque si el tratamiento se inicia durante la infección crónica, raramente se observan estas respuestas (82;100;104-106).

Estas observaciones llevan a la teoría de que la inmunidad VIH específica disminuye o desaparece durante el TARGA porque las células específicas no se estimulan de forma óptima con niveles apropiados de antígeno, lo cual se apoya con la recuperación de parte de estas respuestas, al menos de forma transitoria, cuando el sistema inmune se reexpone a los antígenos del VIH durante las interrupciones del TARGA (66;107-111).

En relación con este aspecto se ha descrito que aquellos pacientes en tratamiento con TARGA que presentan pequeñas elevaciones de la CV, los denominados “*blips*” o EVI, presentan un aumento importante de la respuesta *helper*, citotóxica (CTL) y de anticuerpos neutralizantes específicos frente al VIH respecto a otros pacientes con CV continuamente indetectable (538;753-755), lo que pudiera ser beneficioso de cara a un mejor control de la replicación viral si se suspende el TARGA.

Los EVI no son un fenómeno excepcional. Aunque el objetivo del TARGA es conseguir la máxima inhibición de la replicación viral, lo que a nivel práctico se mide mediante la indetectabilidad de la CV, hasta el 46% de los pacientes según las series presentan EVI, es decir, CV que se hacen detectables y posteriormente vuelven a la indetectabilidad, en el curso de su infección bajo TARGA (475-479).

Teniendo en cuenta que la CV plasmática es un importante marcador pronóstico en la infección por VIH (756;757), numerosos trabajos han intentado evaluar qué factores promueven la aparición de estas elevaciones en la CV, aunque sean transitorias, y establecer sus implicaciones pronósticas. Sin embargo hasta hoy en día los resultados son controvertidos.

Se ha observado que diversos estímulos inmunológicos con distintas vacunas (neumococo, influenza, tétanos) o la prueba de la tuberculina pueden producir pequeñas y transitorias elevaciones de la CV (277;286;287;758) secundarias a la activación linfocitaria (271-273), fundamentalmente en pacientes sin TARGA. Pero también, aunque con menor frecuencia, se ha descrito en pacientes con TARGA. Incluso se ha descrito que tras la administración de una dosis de vacuna antigripal, hasta un 20% (7 de 34 casos) de los pacientes presentaron un rebote de la carga viral, observándose resistencias genotípicas al gen de la retrotranscriptasa y de la proteasa en 2 enfermos (285). Este hecho es sumamente importante, sobre todo si tenemos en cuenta que los pacientes infectados por VIH, aunque se encuentren en buena situación inmunológica, se consideran pacientes inmunodeprimidos y, por lo tanto, deben recibir una adecuada cobertura vacunal. Esta cobertura debe incluir vacunas para hepatitis (B y A), gripe, y neumococo, así como asegurar la cobertura de sarampión, rubéola y parotiditis y de tétanos/difteria. Sería necesario establecer el riesgo-beneficio de la vacunación de los pacientes VIH, pues si estas vacunas pudieran provocar el desarrollo de resistencias, esto podría comprometer el futuro del tratamiento de la infección por VIH en estos pacientes. Incluso en caso de que se mantuvieran las vacunaciones, si existe riesgo de resistencias, se tendría que recomendar la realización de un seguimiento estricto del paciente y, en caso de que hubiera un repunte de la CV tras la vacunación, la realización de una prueba de resistencias.

Un aspecto importante a este respecto es que la mayoría de estudios han explorado las consecuencias de una vacunación aislada frente a un determinado agente. Sin embargo, se desconoce el efecto que tendría tanto sobre el sistema inmune como sobre la CV la administración de varias vacunas frente a diferentes agentes dentro de un calendario. Ésta es, por otro lado, una situación cotidiana, pues los adultos en general y los pacientes infectados por el VIH en particular, tienen indicación de recibir diferentes vacunas que, una vez indicadas, se

deberían administrar lo antes posible. Su administración conjunta podría influir de forma diferente sobre la interacción sistema inmune-virus, y también el paciente podría presentar una respuesta vacunal diferente a la que presentaría con la administración por separado de las vacunas.

Se podría plantear la hipótesis de que los pacientes infectados por el VIH que reciban múltiples dosis de vacunas presentarían elevaciones transitorias de virus. Estas elevaciones podrían comportarse como una forma simple de inmunoterapia activa, equiparable a una autovacunación con el “virus autólogo atenuado”, en la que la atenuación vendría dada por la supresión vírica con el TARGA. Esto conllevaría un aumento de la respuesta específica contra el VIH y un mejor control de la replicación viral tras la suspensión del TARGA.

Para conseguir estos resultados el timo podría jugar un papel importante. Las vacunaciones inducen cambios en las poblaciones linfocitarias T, básicamente produciendo un cambio de fenotipo celular *naïve* a memoria por dos mecanismos (127;245;759;760). Un mecanismo directo por los inmunógenos vacunales en los pacientes que no los habían recibido ni de forma natural ni vacunal, o que lo habían hecho hacía tanto tiempo que sus células memoria específicas habían pasado a *naïve*. Y otro mecanismo, menos directo, al provocar con los estímulos inmunológicos rebotes de carga viral que volverían a presentar cuasiespecies del virus que estaban latentes (275). Esto provocaría un descenso en el compartimiento de las células *naïve*, un consecuente aumento en la IL-7 y, finalmente, una estimulación de la timopoyesis que daría lugar a nuevas *naïve*, algunas de las cuales podrían reconocer antígenos secundarios del VIH (89;761).

Por otro lado, al convivir estas células *naïve* durante cortos periodos de tiempo con el virus que rebota, no infectándose por ser un virus atenuado por el tratamiento, se transformarían en memoria, permitiendo que al retirar el TARGA presentasen una respuesta inmune eficaz contra el virus, con lo que podría prescindirse, al menos de forma temporal, del tratamiento antirretroviral, con todas las ventajas que ello supone. Asimismo, la utilización de distintos tipos de vacunas permitiría movilizar virus diferentes de reservorios diferentes (diferentes

cuasiespecies que se encuentran en las células *naïve* o memoria latentes, activadas por cada una de las vacunas utilizadas), con lo que la estimulación antigénica sería mayor (718). Estas dos ventajas (atenuación del virus y movilización de diferentes virus) harían que su eficacia como estímulo antigénico pudiera ser superior al STI. En primer lugar, en la interrupción de tratamiento se pueden observar en algunos pacientes picos muy elevados de carga viral, y dado que las células CD4⁺ con respuesta específica frente al VIH son las que se infectan más tras el rebote de la CV (28), la eliminación clonal de estas células podría explicar la falta de respuesta. En segundo lugar, hay datos que sugieren que tras distintos rebotes de la CV, el virus no cambia mucho (762) y que la inmunidad específica que se recupera sólo es un aumento de la que estaba previamente (56;111;195), probablemente debido a que se exponen repetidamente al mismo antígeno. Se podría prever que la atenuación del virus al mantener el TARGA y la movilización de diferentes cuasiespecies virales podrían evitar estos problemas de las STI. Además, la estimulación de las células latentemente infectadas permitiría un aumento en la tasa de aclaramiento del reservorio viral (738).

Finalmente, hasta la fecha se ha estudiado el efecto de las interrupciones de tratamiento sobre la CV y sobre el sistema inmune. Pero es poco o nada conocido el efecto que tiene la interrupción del TARGA sobre la función tímica, el sistema IL-7/IL-7R y sobre las respuestas a antígenos vacunales.

Respecto a la influencia de la interrupción sobre el timo, se ha demostrado en diferentes estudios en animales, autopsias e *in vivo* que el VIH es capaz de infectar el timo y alterar rápidamente su función, sobre todo en jóvenes (42-47), colaborando en la depleción de linfocitos T CD4⁺ (23;42;85;607). Por tanto, las interrupciones de TARGA podrían afectar la función tímica. Hasta la fecha, el efecto del rebote viral sobre la función tímica ha sido poco estudiado, habiéndose objetivado un descenso en el número de *TRECs* (608). Dos trabajos recientes han observado una relación entre el volumen tímico y la evolución virológica e inmunológica tras la suspensión del tratamiento (626;627).

Por otro lado, se sabe que la IL-7 juega un papel primordial en la homeostasis linfocitaria y el mantenimiento de este compartimiento celular y se cree que es un factor importante en la evolución de la infección por el VIH (679;680;702). Dado que la interrupción del TARGA supone un cambio dramático en la homeostasis linfocitaria, resultaría interesante estudiar qué ocurre con el sistema IL-7/IL-7R en estas circunstancias.

Por último, se ha descrito que la respuesta vacunal de los pacientes infectados por el VIH se encuentra comprometida (253), tanto por alteración en la función celular B (254), como la T (255-257). Las respuestas vacunales empeoran con el estadio de la infección y el nadir de linfocitos T CD4⁺ (262-266), pudiendo mejorar con la recuperación inmune inducida por el TARGA (tanto humoral como celular) (82;267-269). Además, se sabe que la inmunidad vacunal en los pacientes con infección por el VIH no sólo es de menor magnitud, sino también de menor duración, perdiéndose más rápidamente que en individuos sanos. Por ello hay autores que recomiendan que se debiera revacunar activamente (270). Esto podría agravarse más en el caso de interrupciones de tratamiento. Dado que la interrupción provoca grandes cambios en las respuestas T y B, la respuesta vacunal adquirida con anterioridad podría deteriorarse hasta el punto de no ser protectora y provocar riesgo de infecciones para las que inicialmente el paciente estaba inmunizado. Por ello sería útil estudiar el efecto de la interrupción sobre estas respuestas.

Por estos motivos se desarrolló en el Servicio de Infecciones del Hospital Clínic un ensayo clínico (VAC-01 o EARTH-06) en el que se pretendía valorar si estímulos inmunológicos repetidos con vacunas comerciales en pacientes infectados por el VIH con TARGA en estadios tempranos de la infección podían aumentar el riesgo de rebote viral y de desarrollo de resistencias, así como el efecto de estos estímulos sobre las respuestas inmunitarias específicas frente al VIH, y la posibilidad de control de la replicación viral tras la retirada del tratamiento antirretroviral.

Es éste un escenario ideal para estudiar toda una serie de variables y factores tanto durante el tratamiento como tras la interrupción:

A. Efecto de un calendario vacunal sobre

1. Durante el tratamiento
 - a. La CV, si aumenta el riesgo de aparición de CV detectables de forma transitoria (EVI o “blips”), y si esto implica la emergencia de resistencias.
 - b. Las subpoblaciones linfocitarias, si aumenta el grado de activación, cambia el fenotipo celular, y si es beneficiosa o deletérea para el recuento de linfocitos T CD4⁺.
 - c. Las respuestas específicas CD4⁺ y CD8⁺ frente al VIH, si las aumenta o permanecen inalteradas.
 - d. La función tímica y el sistema IL-7/IL-7R, si existen cambios en estos parámetros con las vacunaciones.
 - e. La respuesta humoral y celular a las vacunas administradas. Al administrar diversas vacunas de forma conjunta dentro de un calendario, su efecto pudiera resultar diferente al esperado de la administración de cada vacuna de forma individualizada.
2. Tras la interrupción
 - a. El rebote de la CV, si se asocia a un mayor rebote o por el contrario permiten un mejor control de la CV sin TARGA.
 - b. La evolución de las subpoblaciones linfocitarias.
 - c. Las respuestas específicas frente al VIH, tanto CD8⁺ como CD4⁺.
 - d. La función tímica y el sistema IL-7/IL-7R.
 - e. Los cambios en las respuestas humorales y celulares adquiridas a antígenos vacunales.

B. Efecto de EVI sobre los mismos aspectos: Valorar mediante un subestudio si la presencia (si la hubiese) de EVI influye sobre los parámetros comentados anteriormente durante el tratamiento y la interrupción, de forma independiente de la

vacunación. Este análisis se podría realizar con distintos niveles de detectabilidad (200 y 20 copias/mL).

- C. Efecto de la interrupción sobre la función tímica, el sistema IL-7/IL-7R y las respuestas adquiridas a antígenos vacunales. Valorar mediante otro subestudio la evolución en la cohorte global de estos tres aspectos.

2. HIPÓTESIS

Los pacientes infectados por el VIH, en estadios tempranos de la infección (con más de 500 linfocitos T CD4⁺/mm³ y un nadir superior a 300 linfocitos T CD4⁺/mm³) y bien controlados con TARGA (con una CV inferior a 200 copias/mL) que reciban múltiples dosis de vacunas presentarían elevaciones transitorias de virus y aumentaría el riesgo de desarrollo de resistencias. Por otro lado, estos rebotes virales podrían comportarse como una forma simple de inmunoterapia activa, equiparable a una autovacunación con el “virus autólogo atenuado”, induciendo respuestas inmunitarias específicas frente al VIH, aumentando la función tímica y la posibilidad de control de la replicación viral tras la retirada del tratamiento antirretroviral.

3. OBJETIVOS

3.1. PRINCIPAL

A. Estudiar el efecto de un calendario vacunal en pacientes con infección por el VIH en estadios tempranos de la infección y bien controlada con TARGA, sobre

1. Durante el tratamiento
 - a. La CV, si aumenta el riesgo de aparición de cargas virales detectables de forma transitoria (EVI o “blips”) y si esto implica la emergencia de resistencias.
 - b. Las subpoblaciones linfocitarias, si aumenta el grado de activación, cambia el fenotipo celular y si es beneficiosa o deletérea para el recuento de linfocitos T CD4⁺.
 - c. Las respuestas específicas CD4⁺ y CD8⁺ frente al VIH, si las aumenta o permanecen inalteradas.
 - d. La función tímica y el sistema IL-7/IL-7R, si existen cambios en estos parámetros con las vacunaciones.
 - e. La respuesta humoral y celular a las vacunas administradas. Al administrar las vacunas de forma conjunta a otras dentro de un calendario, su efecto pudiera resultar diferente al esperado de la administración de cada vacuna de forma individualizada.
2. Tras la interrupción
 - a. El rebote de la CV, si se asocia a un mayor rebote o por el contrario permiten un mejor control de la CV sin TARGA.
 - b. La evolución de las subpoblaciones linfocitarias.
 - c. Las respuestas específicas frente al VIH, tanto CD8⁺ como CD4⁺.
 - d. La función tímica y el sistema IL-7/IL-7R.

- e. Los cambios en las respuestas humorales y celulares adquiridas a antígenos vacunales.

3.2. SECUNDARIOS

B. Estudiar el efecto de los EVI sobre los mismos aspectos: Valorar mediante un subestudio si la presencia (si la hubiese) de episodios de viremia intermitente influye, de forma independiente de la vacunación, sobre:

1. Durante el tratamiento
 - a. Las subpoblaciones linfocitarias, si aumenta el grado de activación, cambia el fenotipo celular y si es beneficiosa o deletérea para el recuento de linfocitos T CD4⁺.
 - b. Las respuestas específicas CD4⁺ y CD8⁺ frente al VIH, si las aumenta o permanecen inalteradas.
 - c. La función tímica y el sistema IL-7/IL-7R.
 - d. La respuesta humoral y celular a los antígenos vacunales. La presencia de EVI podría influir en la respuesta a vacunas.
2. Tras la interrupción
 - a. El rebote de la CV, si se asocia a un mayor rebote o por el contrario permiten un mejor control de la CV sin TARGA.
 - b. La evolución de las subpoblaciones linfocitarias.
 - c. Las respuestas específicas frente al VIH, tanto CD8⁺ como CD4⁺.
 - d. La función tímica y el sistema IL-7/IL-7R.
 - e. Los cambios en las respuestas humorales y celulares adquiridas a antígenos vacunales.

3. Estudiar si la identificación de los EVI con diferente nivel de detectabilidad (con ensayos con límite inferior de detectabilidad de 200 y 20 copias/mL) influye de forma diferente sobre esos parámetros.

C. Estudiar mediante un subestudio en el global de la cohorte el efecto de la interrupción del TARGA sobre:

- a. La función tímica.
- b. El sistema IL-7/IL-7R.
- c. Las respuestas adquiridas a antígenos vacunales.

4. INTERÉS Y ACTUALIDAD DEL TEMA DE LA TESIS

Los pacientes con infección por VIH, aunque se encuentren en buena situación inmunológica, pueden presentar determinadas infecciones con mayor frecuencia y/o gravedad, pudiendo además presentar una peor respuesta que las personas sanas al tratamiento antibiótico debido a la “falta de colaboración” de su sistema inmunitario (215). Por otro lado, los mismos factores de riesgo que los llevaron a adquirir la infección por el VIH facilitan su exposición a otros patógenos como VHA y VHB, que no sólo pueden producir una importante morbimortalidad, sino que pueden potenciar la toxicidad de los fármacos antirretrovirales (252). Ello hace que sea una población en la que las vacunaciones podrían jugar un papel esencial en la prevención de dichas infecciones, y es por ello que se recomienda que estos pacientes reciban una serie de vacunas. Sin embargo las vacunaciones en los pacientes con infección por el VIH plantean una serie de interrogantes. Por un lado, la respuesta vacunal en los pacientes con infección por el VIH está alterada, tanto por alteración en la respuesta humoral como celular. Además, no suele ser infrecuente que un mismo paciente necesite recibir más de una vacuna (VHA y VHB, sarampión, rubéola, parotiditis, tétanos...). Se ha demostrado que resulta eficiente combinar la administración de diferentes vacunas, con la intención de no perder la oportunidad de vacunar y reducir el número de visitas e inyecciones. Sin embargo, existen pocos datos al respecto de la administración de un calendario vacunal en los pacientes con infección por el VIH, limitándose la mayoría de trabajos a valorar el efecto de una o dos vacunaciones.

Por otro lado, diferentes trabajos han planteado que la vacunación podría alterar el curso de la propia infección por el VIH, con la inducción de elevaciones en la CV que podrían incluso asociarse a la aparición de resistencias al TARGA (y comprometer, por tanto, la evolución a largo plazo de la infección) y a la disminución en el recuento de linfocitos T CD4⁺. Hasta la fecha, los resultados que se han publicado ofrecen informaciones contradictorias al respecto.

Se ha descrito también que la presencia de EVI se asocia a un aumento de las respuestas específicas frente al VIH, tanto CD4⁺ como CD8⁺, lo que eventualmente podría asociarse a un mejor control de la replicación viral en ausencia de TARGA. Si las vacunaciones son capaces de inducir EVI, esta sería una manera “natural” de potenciar por tanto la respuesta anti-VIH y una forma de terapia inmunomediada.

La infección por el VIH es un problema de salud mundial. El TARGA ha mejorado el pronóstico y la evolución de estos pacientes, pero no es capaz de erradicar la infección y debe realizarse de por vida. Esto no está exento de efectos secundarios, riesgo de desarrollo de resistencias por problemas de adherencia a largo plazo, y de altos costes económicos. Además, la mayoría de la población mundial afectada por el VIH no tiene acceso a estos medicamentos. El conocimiento de estrategias alternativas que pudieran ayudar a controlar la infección viral sin TARGA, al menos temporalmente, conllevaría múltiples beneficios: a) disminución de los efectos secundarios asociados a dicho tratamiento, tanto por la prevención de los que todavía no han aparecido, como por la recuperación de algunos ya presentes, entre ellos las alteraciones metabólicas (dislipemia, diabetes) que constituyen actualmente graves problemas de morbilidad y mortalidad en los pacientes con tratamiento antirretroviral de años de evolución; b) prevención de la aparición de resistencias contra los fármacos actuales, lo que permitiría reservarlos para situaciones en las que son imprescindibles y que en éstas su eficacia fuese máxima; c) mejorías psicológicas en los pacientes que, como todos los pacientes crónicos, pueden presentar complicaciones por el tratamiento prolongado; d) y gran ahorro económico en un Sistema Sanitario en que cada vez los nuevos fármacos son más caros, provocando importantes limitaciones.

Además, las vacunaciones permiten explorar tanto el brazo aferente como el eferente del sistema inmunitario. Las interacciones que pudieran tener con el TARGA y con la interrupción del tratamiento son un buen modelo para el estudio patogénico del VIH. Por otro lado, dentro de la inmunofisiopatología de esta infección en particular y de la reconstitución inmune en estados de depleción linfocitaria adquirida en general (transplante de médula ósea, situaciones postquimioterapia), está adquiriendo hoy en día especial protagonismo el papel del timo y la IL-

7. Su mejor conocimiento podría dar la clave del por qué existen respuestas discordantes en algunos pacientes (buena respuesta virológica sin la esperada elevación de los linfocitos T CD4⁺) y por qué unos pacientes evolucionan mejor que otros. Y podría, sobre todo, ayudar a elaborar estrategias para el tratamiento de estos pacientes, ya que si se pudiese estimular la timopoyesis, mejoraríamos su reconstitución inmunológica y se podría, incluso, en caso de recuperar la respuesta específica frente al VIH, conseguir el control de la infección sin tratamiento antirretroviral.

El estudio cuyos resultados se exponen a continuación intenta explorar todos estos aspectos. La administración de un calendario vacunal en pacientes infectados por el VIH bien controlados con TARGA, con un grupo control al que se administra placebo, es un escenario excelente para valorar el sistema inmune y su relación con el virus. Por un lado, estudiar la capacidad de estas vacunas de desarrollar CV detectables y la aparición consecuente de resistencias. Evaluar la influencia de las vacunaciones sobre diferentes aspectos del sistema inmune, incluyendo las respuestas específicas frente al VIH y evaluar si se asocian a un mejor control de la CV tras la interrupción y, consecuentemente, valorar si pueden ser una herramienta como terapia inmunomediada. Estudiar las respuestas a vacunas en los pacientes VIH, sobre todo con la particularidad de que lo que se administra es un conjunto de vacunas y no una vacuna en concreto. Y por último, analizar los efectos potenciales de las vacunaciones sobre el timo y el sistema IL-7/IL-7R.

Además, el gran control al que se sometieron los pacientes ha permitido estudiar el efecto de los EVI sobre los mismos parámetros, de forma independiente de la vacunación.

Y finalmente, la interrupción que se realiza permite evaluar el efecto de la misma sobre aspectos poco o nada conocidos, como son la función tímica, el sistema IL-7/IL-7R y las respuestas adquiridas a antígenos vacunales.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. INTRODUCCIÓN

Para llevar a cabo los objetivos presentados, se desarrolló en el Servicio de Infecciones del Hospital Clínic de Barcelona el ensayo clínico denominado VAC-01 (o también EARTH-06), aprobado por el Comité de Ética del propio Hospital Clínic y por la Agencia Española del Medicamento (**Anexos**). En este ensayo se valoró si estímulos inmunológicos repetidos con vacunas comerciales en pacientes infectados por el VIH con tratamiento antirretroviral en estadios tempranos de la infección podían aumentar el riesgo de rebote viral y el desarrollo de resistencias, así como el efecto de estos estímulos sobre las respuestas inmunitarias específicas frente al VIH, y la posibilidad de control de la replicación viral tras la retirada del tratamiento antirretroviral.

Es un estudio longitudinal, comparativo, enmascarado doble ciego, controlado con placebo, prospectivo y unicéntrico, en el que se incluyeron un total de 26 pacientes adultos infectados por el VIH con un recuento estable de más de 500 linfocitos T CD4⁺/mm³, en tratamiento antirretroviral, asintomáticos y con CV plasmática menor de 200 copias/ml.

Los 26 pacientes se randomizaron en dos grupos de 13 pacientes cada uno: el Grupo Vacunado (GV), que recibió tratamiento antirretroviral junto con vacunaciones comerciales; y el Grupo Placebo (GP), que recibió tratamiento antirretroviral junto con placebo (suero fisiológico).

El tratamiento antirretroviral y las vacunaciones (o placebo) se mantuvo durante 1 año. Dos meses tras la última vacunación (o la última dosis de placebo) se retiró el tratamiento antirretroviral. Posteriormente se reinició si la CV era mayor de 5000 copias/mL tras 6 meses sin tratamiento antirretroviral o si los linfocitos T CD4⁺ caían por debajo de 350 células/mm³ en cualquier momento (**Figura M.1.1.**).

El calendario vacunal de los pacientes del GV consistió en las siguientes vacunaciones: hepatitis B (mes 0, 1, 2 y 6), gripe (mes 1), neumococo (mes 2), hepatitis A (mes 4 y 10),

varicela (mes 4 y 6), triple vírica (sarampión, parotiditis y rubéola) (mes 8) y tétanos/difteria (mes 10) (Figura M.1.2).

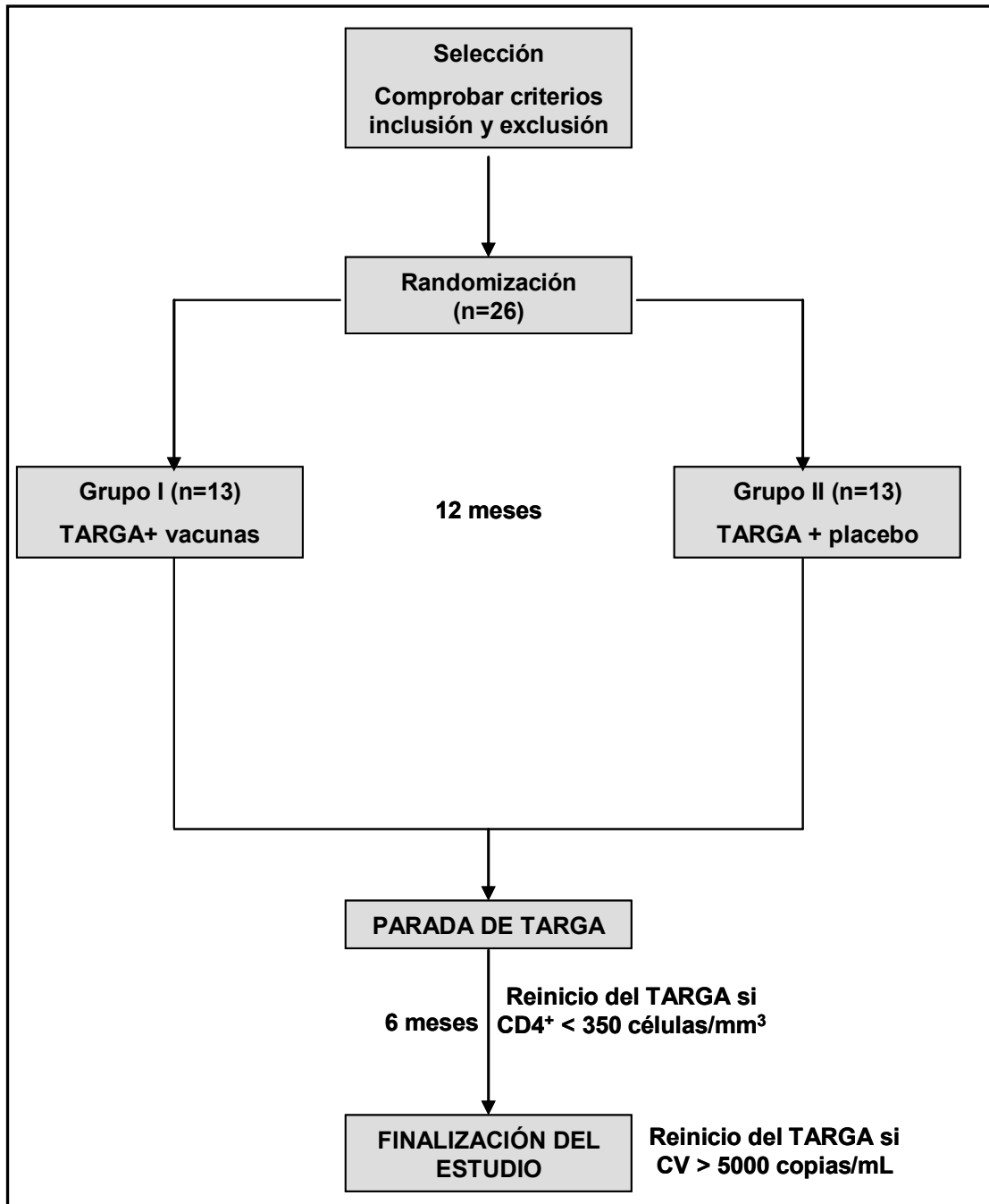


Figura M.1.1. Esquema del protocolo VAC-01. TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad; CV: Carga viral plasmática del VIH

A la inclusión, se informó a los pacientes de la naturaleza del estudio y se les ofreció el consentimiento informado para ser firmado. El seguimiento y las extracciones de los pacientes tuvieron lugar en las Consultas Externas del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínic de Barcelona.

Los procedimientos y técnicas realizados para conseguir los diferentes objetivos fueron los siguientes:

- Estudio de la replicación viral: Se realizaron determinaciones mensuales de la CV tanto por debajo de 200 copias/mL como por debajo de 20 copias/mL.
- Estudio de parámetros inmunológicos y de la respuesta inmune específica contra el VIH.
 - Se realizó el estudio de diferentes subpoblaciones celulares de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).
 - Se realizó el estudio de la respuesta proliferativa específica de linfocitos CD4⁺ frente al VIH, así como de la respuesta específica CD8⁺ de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).
- Estudio de aparición de resistencias: Se realizó el análisis genotípico de resistencias en cada rebote >1000 copias de la CV durante el tratamiento y de la primera CV detectable tras suspender el tratamiento.
- Estudio de la función tímica:
 - Se realizaron TC mediastínicas en los meses 0, 12 y 18 del estudio.
 - Se determinaron las subpoblaciones celulares de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CD45RA⁺CD62L⁺ (*naïve*) y CD45RO⁺ (memoria) de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).
 - Se determinaron las subpoblaciones de células *naïve* en proliferación (Ki-67⁺) de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).
 - Se determinaron las células portadoras de *TRECs* de forma semestral durante el tratamiento (mes 0, 6 y 12) y trimestral tras su suspensión (mes 15 y 18).

- Se determinaron los niveles séricos de IL-7 y la expresión del IL-7R (CD127) en subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ de forma semestral durante el tratamiento (mes 0, 6, y 12) y trimestral tras su suspensión (mes 15 y 18).
- Estudio de la respuesta vacunal:
 - Respuesta humoral: Se analizó la respuesta de inmunoglobulinas (IgG) específicas a los distintos antígenos vacunales mediante técnicas de ELISA comerciales en los meses 0, 3, 6, 9, 12 y 18.
 - Respuesta celular: Se analizó la respuesta celular a las diferentes vacunas administradas mediante las técnica de ELISPOT y AMPLISPOT en los meses 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18.

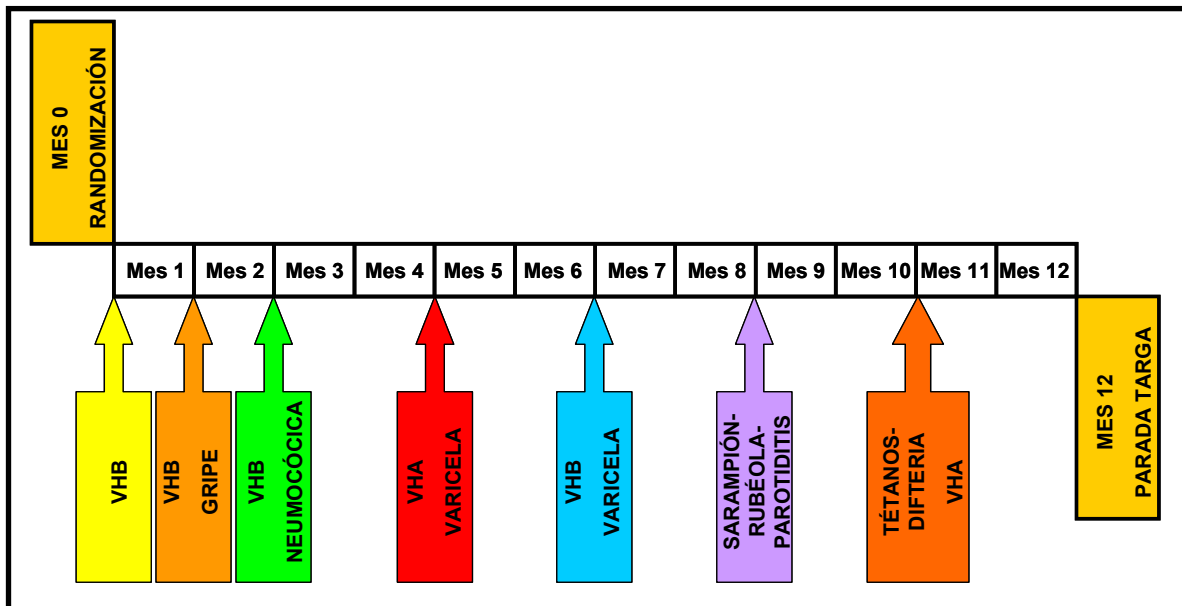


Figura M.1.2. Calendario vacunal que recibieron los pacientes incluidos en el estudio. VHB: Virus hepatitis B; VHA: Virus hepatitis A

2. PACIENTES

2.1. CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

El estudio VAC-01 es un estudio longitudinal, comparativo, enmascarado, doble ciego, controlado con placebo, prospectivo y unicéntrico, en el que se incluyeron un total de 26 pacientes infectados por el VIH.

2.1.1. Criterios de inclusión

Los pacientes debían cumplir los siguientes criterios de inclusión:

1. Tener una infección por el VIH-1 confirmada por Western-blot.
2. Estar asintomáticos respecto a la infección por el VIH (categoría A de la clasificación de la CDC modificada de 1993).
3. Tener un recuento estable de linfocitos T CD4⁺ >500 células/mm³ previo a la inclusión.
4. Tener un nadir de linfocitos T CD4⁺ > 300 células/mm³.
5. Estar recibiendo TARGA de forma continua al menos durante los 12 meses previos a la inclusión.
6. Tener una CV por debajo de 200 copias/mL durante al menos los últimos 6 meses antes de la inclusión.
7. Haber presentado una CV superior a 5000 copias/mL antes de haber recibido ningún tratamiento antirretroviral.
8. Haber dado el consentimiento informado por escrito.

Los antecedentes vacunales, si bien se recogían, no formaban parte de los criterios de inclusión o exclusión, ni eran determinantes a la hora de incluir los pacientes en uno u otro grupo.

2.1.2. Criterios de exclusión

Los pacientes que cumplieran los siguientes criterios no podían ser incluidos en el estudio:

1. Tener síntomas de las categorías B o C de la clasificación de los CDC de 1993.
2. Tener menos de 18 años de edad.
3. Que por las características del paciente hubiese una previsión de cumplimiento incorrecto del tratamiento o vigilancia de difícil realización.
4. Que el paciente no aceptase las normas de seguridad para evitar contagios, como la utilización de preservativo para evitar la infección por VHB.
5. Mujeres embarazadas, con previsión de hacerlo, o lactantes.
6. Denegación del consentimiento.
7. Tener una creatinina plasmática basal superior a 2,5 mg/dl.
8. Tener cifras de ASAT (Aspartato aminotransferasa)/ALAT basales superiores a 250 UI/L.
9. Padecer una hepatitis crónica por el VHB.
10. Tener alergia conocida a alguno de los componentes de las vacunas.

2.1.3. Justificación del perfil de los pacientes incluidos

La elección de pacientes con características virológicas e inmunológicas concretas obedecía a una serie de consideraciones.

Se escogieron pacientes con una cifra de linfocitos T CD4⁺ superior a 500 células/mm³ porque son los que mejor responden a las vacunaciones, mientras que en pacientes con sistemas inmunitarios alterados no es seguro que la vacunación sea totalmente efectiva. Son además los que reciben más vacunas en la práctica clínica, y los que más se pueden beneficiar de las conclusiones del estudio. Desde el punto de vista inmunológico, son el grupo de pacientes que mejor responden a un estímulo antigénico repetido.

El hecho de que los pacientes incluidos debían tener una CV por debajo de 200 copias/mL durante al menos 6 meses fue para tener la seguridad de que el paciente no estaba en

fracaso terapéutico a los fármacos antirretrovirales, de forma que las elevaciones de CV que siguiesen a las vacunaciones se pudieran atribuir a éstas y no a falta de respuesta al TARGA.

Por último, el criterio de tener una CV superior a 5000 copias/mL antes de recibir ningún tratamiento antirretroviral, obedecía al hecho que los pacientes que la tuviesen más baja o indetectable podrían tener un virus con poca capacidad replicativa y, por lo tanto, la posibilidad de una elevación de la CV tras estímulos antigénicos podría ser menor.

2.2. TAMAÑO MUESTRAL

Se asumió para el cálculo del tamaño de la muestra que:

1. En la rama que recibiría placebo no habría rebotes de la CV durante el TARGA por encima de las 20.000 copias/mL.
2. Un 50% de los pacientes que recibiesen las vacunaciones tendría un rebote de la CV. La diferencia mencionada del 50% debía ser significativa si se producía.
3. Error tipo alfa de 0,05 y tipo beta de 0,2.
4. Se preveían pocas pérdidas de seguimiento.

2.3. INCLUSIÓN Y RANDOMIZACIÓN

Las solicitudes de inclusión se remitían a una persona encargada de la aleatorización, que comprobaba el cumplimiento de los criterios de inclusión y asignaba a cada paciente un número en el estudio, informando de ello al Centro de Vacunaciones, que era el responsable de la realización de las vacunaciones.

Los 26 pacientes se randomizaron en dos grupos de 13 pacientes cada uno: el GV, que recibía TARGA junto con vacunaciones comerciales; y el GP, que recibía TARGA junto con placebo (suero fisiológico). La aleatorización se realizó mediante una tabla de números aleatorios compensados generada por ordenador inmediatamente después de comprobados los criterios de inclusión y de exclusión por el médico investigador, e inmediatamente antes de comenzar la fase de tratamiento. Así pues, el número de inclusión (o de identificación) del paciente en el estudio se atribuía el día D0.

3. MÉTODOS

3.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El ensayo se ha llevado a cabo de acuerdo con los principios que emanan de la Declaración de Helsinki, y según la normativa legal vigente (Real Decreto 561/1993, de 16 de abril), y no se inició hasta haber obtenido la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic, la conformidad del Director de la Institución, y el permiso de la Agencia Española del Medicamento (**Anexo**). Además, según la normativa actual, se inscribió en la base de datos pública del Instituto de Salud de los Estados Unidos (Clinicaltrials.gov, consultable en www.clinicaltrials.gov) con el número NCT00329251.

Los pacientes fueron informados oralmente y por escrito, comunicándoles toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento. Se les proporcionó una hoja de información y se les solicitó la firma del consentimiento informado (**Anexo**).

Los pacientes fueron informados de que su participación en el ensayo sería tratada con la misma confidencialidad que su documentación clínica, pero que, en caso necesario, un miembro del Comité Ético del centro, un inspector designado por las autoridades sanitarias, o el monitor del ensayo clínico podría tener acceso a la misma.

En el cuaderno de recogida de datos, el paciente se identificó únicamente por su número de inclusión en el estudio y sus iniciales, no habiendo aparecido el nombre del paciente en ninguna publicación o comunicación de los resultados del estudio. Asimismo, los cuadernos de observación y los registros de los análisis biológicos realizados en el marco de este protocolo han quedado identificados sólo con el número de identificación asignado a cada paciente en el estudio.

La participación del paciente en el ensayo quedó reflejada en su historia clínica.

Todos los documentos se conservan en un local cerrado con llave, y los ficheros informáticos están constituidos de conformidad con la ley sobre Protección de Datos de Carácter Personal 15/1999.

3.2. ESQUEMA GENERAL DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio longitudinal, comparativo, enmascarado a doble ciego, controlado con placebo, prospectivo y unicéntrico, en el que los 26 pacientes incluidos se randomizaron en dos grupos de 13 pacientes cada uno: el GV, que recibió TARGA junto con vacunaciones comerciales; y el GP, que recibió TARGA junto con placebo (suero fisiológico). El TARGA y las vacunaciones (o placebo) se mantuvieron durante 1 año. Dos meses tras la última vacunación (o la última dosis de placebo) se retiró el TARGA. Posteriormente se reinició si la CV fue mayor de 5000 copias/mL tras 6 meses o los linfocitos T CD4⁺ caían por debajo de 350/mm³ en cualquier momento (**Figura M.1.1.**).

Los procedimientos y técnicas realizados durante el estudio fueron:

1. *Historia clínica*: Completa, en el mes 0, incluyendo edad, sexo, grupo de riesgo, fecha aproximada de contagio, si hubo primoinfección sintomática, otros antecedentes patológicos (enfermedades de transmisión sexual, hepatitis crónica, herpes zoster) y vacunaciones recibidas. Cada tres meses (mes 3, 6, 9, 12, 15 y 18) se realizó una visita de seguimiento en la que se interrogó sobre los eventos acontecidos hasta ese momento, con especial énfasis en el registro de efectos secundarios tras la vacunación, la adherencia e infecciones intercurrentes.

2. *Examen físico*: Completo, en el mes 0 y cada tres meses (mes 3, 6, 9, 12, 15 y 18), incluyendo la medida de la temperatura y el peso, la determinación del índice de Karnofsky, la búsqueda de adenopatías y los signos de infección oportunista.

3. *Radiografía de tórax*: En el mes 0, como referencia en el caso de que se desarrollara posteriormente alguna patología pulmonar.

4. *Análisis biológicos rutinarios*: Se realizaron de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18), incluyendo parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito, leucocitos totales y fórmula leucocitaria, y plaquetas) y bioquímicos (creatinina, ASAT, ALAT, fosfatasa alcalina, GGT (gammaglutamiltranspeptidasa), bilirrubina, colesterol, triglicéridos, amilasa y lipasa).

5. *Estudio de la replicación viral*: Se realizaron determinaciones mensuales (mes 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18) de la CV tanto por debajo de 200 copias/mL como por debajo de 20 copias/mL.

6. *Estudio de aparición de resistencias*: Se realizó el análisis genotípico de resistencias en cada rebote de CV superior a 1000 copias/mL durante el tratamiento y de la primera CV detectable tras suspender el tratamiento.

7. *Estudio del sistema inmunitario y de la respuesta específica contra el VIH*:

a. Se realizó un estudio de *subpoblaciones celulares* de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).

b. Se realizó un estudio de la *respuesta proliferativa CD4⁺ específica* frente al VIH, así como la *respuesta celular CD8⁺ específica* frente al VIH de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).

8. *Estudio de la función tímica*:

a. Se realizó una *TC mediastínica* en los meses 0, 12 y 18 del estudio.

b. Se realizaron determinaciones de *subpoblaciones celulares* de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CD45RA⁺CD62L⁺ (*naïve*) y CD45RO⁺ (*memoria*) de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).

c. Se realizaron determinaciones de *subpoblaciones de células naïve en proliferación (Ki-67⁺)* de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).

d. Se realizaron determinaciones de *células portadoras de TRECs* de forma semestral durante el tratamiento (mes 0, 6 y 12) y trimestral tras su suspensión (mes 15 y 18).

9. *Estudio del sistema IL-7/IL-7R*: Se realizaron determinaciones de las concentraciones séricas de IL-7 y de la proporción de poblaciones linfocitarias portadoras de la subunidad α del IL-7R (CD127) de forma semestral durante el tratamiento (mes 0, 6, y 12) y trimestral tras su suspensión (mes 15 y 18).

10. *Estudio de la respuesta vacunal*: Se realizó valorando los dos tipos de respuesta posibles:

a. *Respuesta humoral*: Se determinó la respuesta de inmunoglobulinas (IgG) específicas a los antígenos vacunales de VHA, VHB, neumococo, varicela, sarampión, rubéola, parotiditis, tétanos y difteria mediante técnicas de ELISA comerciales de forma trimestral durante el TARGA (meses 0, 3, 6, 9 y 12) y 6 meses después de la suspensión del TARGA (mes 18). Dependiendo de la técnica se obtuvieron tres tipos de resultados:

- Cuantitativo.
- Cualitativo: Sólo es posible saber si el paciente es “positivo” o “negativo”, la técnica no ofrece un resultado valorable desde el punto de vista cuantitativo.
- Semicuantitativo.

b. *Respuesta celular*: Se analizó la respuesta celular a las vacunas de VHA, VHB, gripe, neumococo, varicela, sarampión, parotiditis y tétanos mediante las técnicas de ELISPOT y AMPLISPOT de forma trimestral (meses 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).

3.3. GRUPOS

Los 26 pacientes se randomizaron en dos grupos de 13 pacientes cada uno:

- GV: Recibieron TARGA junto con vacunaciones comerciales.
- GP: Recibieron TARGA junto con placebo.

3.4. TARGA

Inicialmente todos los pacientes siguieron con el TARGA que realizaban a la inclusión. Las opciones siguientes se seleccionaron según la disponibilidad de los fármacos, los efectos secundarios y las preferencias de los pacientes. Se utilizaron siempre fármacos comercializados o de uso compasivo de acuerdo con las indicaciones aprobadas hasta la fecha.

La suspensión en el mes 12 se hizo retirando de forma simultánea todos los fármacos antirretrovirales. En el caso de que el paciente estuviese tomando algún fármaco de vida media larga como efavirenz o nevirapina, éste se suspendió 5 días antes que el resto para evitar la

aparición de resistencias por mantener niveles plasmáticos durante más tiempo y evitar así una “monoterapia virtual”.

3.5. VACUNAS

3.5.1. Calendario vacunal

El calendario vacunal consistió en (**Figura M.1.2.**):

- Mes 0: Hepatitis B
- Mes 1: Hepatitis B, gripe
- Mes 2: Hepatitis B, neumococo.
- Mes 4: Hepatitis A, varicela
- Mes 6: Hepatitis B, varicela
- Mes 8: Triple vírica
- Mes 10: Tétanos/difteria, hepatitis A.

Las vacunas administradas fueron las vacunas comerciales habituales que se encuentran en los calendarios vacunales, a saber:

- Vacuna antihepatitis B (Engerix B[®] 20 µg) (Smithkline Beecham, SA): Una dosis (1 mL) contiene como principio activo 20 µg de HBsAg recombinante (proteína S) adsorbido [producido por ingeniería genética en células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)]. Otros componentes: óxido hidrato de aluminio, polisorbato 20, cloruro sódico, fosfato sódico dihidrato, fosfato sódico dibásico, agua para inyectables. La dosis administrada fue de 40 µg.
- Vacuna antihepatitis A (Havrix 1440[®]) (Smithkline Beecham, SA): Una dosis (1 mL) contiene como principio activo 1440 U ELISA de antígeno del virus del VHA (cepa HM 175). Otros componentes: hidróxido de aluminio, 2-fenoxietanol, aminoácidos para inyección, fosfato disódico, fosfato monopotásico, polisorbato 20, cloruro potásico, cloruro sódico y agua para inyectables. La vacuna contiene residuos de sulfato de neomicina (menos de 40 ng/dosis) y

de formaldehído (no más de 100 µg/ dosis).

- Vacuna antitetánica - antidiftérica (Ditanrix Adulto[®]) (Smithkline Beecham, SA): Una dosis (0,5 mL) contiene como principio activo 40 UI de toxoide de tétanos y 4 UI de toxoide de difteria adsorbidos. Otros componentes: hidróxido de aluminio, timerfonato sódico, cloruro sódico y agua para inyectables. La vacuna contiene residuos de formaldehído.

- Vacuna antineumocócica polisacarídica (Pneumo 23[®]) (Aventis Pasteur MSD SA): Una dosis (0,5 mL) contiene como principio activo polisacáridos capsulares purificados de *Streptococcus pneumoniae* [serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F (25 µg para cada serotipo)]. Otros componentes: fenol, cloruro sódico, fosfato disódico, fosfato monosódico, agua para inyectables.

- Vacuna antigripal: Los principios activos son las tres cepas de virus gripales propagados en huevos e inactivados y fraccionados que recomienda anualmente la OMS, en este caso los recomendados para la vacunación de la temporada 2003-2004 [cepa análoga a A/New Caledonia/20/99 (H1N1), cepa análoga a A/Moscow/10/99 (H3N2) y cepa análoga a B/Hong Kong/330/2001].

- Vacuna triple vírica (antisarampión – antiparotiditis - antirubéola) (Priorix[®]) (Smithkline Beecham, SA): Una dosis (0,5 mL) contiene como principio activo $10^{3,0}$ CCID₅₀ (del inglés “*culture infectious dose 50*”, la dosis 50 infecciosa en cultivo celular) de virus vivos atenuados del sarampión de la cepa Schwarz, $10^{3,7}$ CCID₅₀ de virus vivos atenuados de la parotiditis de la cepa RIT 4385, y $10^{3,0}$ CCID₅₀ de virus vivos atenuados de la rubéola de la cepa Wistar RA27/3. Otros componentes: aminoácidos, albúmina humana, lactosa (anhidra), manitol, sulfato de neomicina, sorbitol y fenol rojo.

- Vacuna antivariolosa (Varilrix[®]) (Smithkline Beecham, SA): 1 dosis (0,5 ml) contiene como principio activo $10^{3,3}$ Unidades Formadoras de Placas de la cepa OKA de VVZ vivo atenuado. Otros componentes: sulfato de neomicina, albúmina humana, aminoácidos para inyección, sorbitol y manitol.

Las vacunas se conservaron hasta su administración entre +2°C y +8°C en un frigorífico con registro continuo de temperatura. Se administraron posteriormente por vía intramuscular en el deltoides o en la cara anterolateral del muslo (vasto externo), a excepción de las vacunas antisarampión-antiparotiditis-antirubéola y la antivariolosa que se administraron por vía subcutánea. Cuando se administraba una vacuna, se registraba el lote en la historia del paciente. El lote podía variar en función de la disponibilidad de la misma.

3.5.2. Justificación de las vacunas utilizadas

El calendario vacunal que se utilizó incluía las vacunas actuales que con mayor frecuencia se indican en los pacientes adultos y que, o bien ya están indicadas, o probablemente lo estarán en los pacientes con infección por el VIH (ver **Tabla I.2.2.**). La única que actualmente todavía existen dudas de su inclusión en las guías para pacientes adultos infectados por el VIH es la de la varicela, pero probablemente, gracias a la seguridad demostrada en recientes trabajos en niños (380;381) y el buen control de la infección por VIH con TARGA, es probable que a medio plazo también se incluya en los calendarios habituales.

3.6. PLACEBO

Los pacientes del GP recibieron TARGA y placebo. Como placebo se utilizó una jeringa con solución salina fisiológica (0,5 ml) que se administró por la misma vía que la vacuna correspondiente y en las mismas fechas que correspondían a la administración vacunal.

3.7. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

A todos los pacientes en el estudio se les realizó mensualmente una extracción de sangre venosa de 100 mL, repartidos de la siguiente forma:

- 90 mL en 9 tubos de 10 mL con EDTA como anticoagulante. De aquí se obtuvieron células y plasma. Parte de estos 90 mL se envió al circuito habitual de muestras del laboratorio central del hospital para la determinación de los parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito, leucocitos totales con fórmula leucocitaria, y plaquetas) y bioquímicos (creatinina, ASAT, ALAT, fosfatasa alcalina, GGT, bilirrubina, colesterol, triglicéridos, amilasa y lipasa) rutinarios. Y se guardó una alícuota de sangre venosa congelada para la posterior extracción del ADN genómico.

- 10 mL en un tubo de 10 mL seco, sin anticoagulante. La sangre aquí se coaguló, sirviendo para la obtención de suero.

3.7.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvieron a partir de sangre anticoagulada con EDTA con un sistema de centrifugación por gradiente de Ficoll-Hypaque siguiendo los siguientes pasos:

- Centrifugar la sangre a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos.
- Separar el plasma, pasando el resto a un tubo cónico.
- Diluir la sangre con Dulbecco en proporción 1:2. El Dulbecco es un tampón sin calcio, magnesio ni bicarbonato, con pH 7,2 y que contiene KCl (200 mg/L), KH_2PO_4 (200 mg/L), NaCl (8000 mg/L) y Na_2HPO_4 (1400 mg/L).

- Añadir lentamente la sangre diluida a otro tubo cónico donde previamente se había añadido el Ficoll-Hypaque, de tal manera que quede la sangre sobre el Ficoll sin que se mezclen, en proporción 1:2 Ficoll/sangre diluida.

- Centrifugar a 2000 rpm 30 minutos. Durante la centrifugación, los eritrocitos y los granulocitos son agregados por el Ficoll y sedimentan rápidamente, mientras que los linfocitos y otras células mononucleadas quedan en la interfase plasma-Ficoll. La mayor parte de las plaquetas se eliminan durante las etapas de lavado. Después de centrifugar, quedan cuatro fases

separadas: plasma, CMSP, Ficoll y hematíes.

- Recoger la fase de CMSP.
- Pasar las células a un tubo limpio y añadir 10 mL de tampón Dulbecco.
- Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el *pellet* o botón celular con 10 mL de tampón

Dulbecco.

- Repetir las dos operaciones previas de centrifugación-decantación y resuspensión (lo que se conoce comúnmente como “lavado”) en dos ocasiones.

- Tras la tercera centrifugación, decantar el sobrenadante y añadir 10 mL de medio RPMI-1640.

- Contar y ajustar a la concentración deseada con el medio de cultivo correspondiente.

En nuestro caso lo hicimos para conseguir una concentración de 2×10^6 células/mL en RPMI-1640. El contaje celular se realizó en cámara de plástico desechable (HYCOR-Kova) con 10 μ L de CMSP, 10 μ L de suero fisiológico 0.9 y 10 μ L de Trypan Blue (dilución 1:3).

Estas células obtenidas, en parte se utilizaron frescas el mismo día de la extracción, y en parte se criopreservaron en nitrógeno líquido.

3.7.2. Obtención de plasma

Se obtuvo a partir de la sangre con EDTA tras la primera centrifugación de 10 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante es el plasma, que se separó, se alicuotó y se guardó a -70°C para hacer posteriormente las determinaciones necesarias.

3.7.3. Obtención de suero

Se obtuvo a partir de sangre coagulada recogida en tubo sin anticoagulante. Dicha sangre se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos, separando el sobrenadante que es el suero,

y se alicuotó para guardarlo posteriormente en congelador a -70°C hasta el momento de hacer las determinaciones necesarias.

3.8. ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN VIRAL

Se realizaron determinaciones mensuales (mes 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18) de la CV tanto por debajo de 200 copias/mL como por debajo de 20 copias/mL.

La concentración del ARN del VIH en plasma se realizó utilizando la técnica de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa) cuantitativa con el ensayo comercializado Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultra Sensitive Specimen Preparation Protocol Ultra Direct Assay (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ, EEUU) versión 1.5 siguiendo las instrucciones del fabricante con un límite de cuantificación de 200 copias/mL y 20 copias/mL.

3.9. ESTUDIO DE LA APARICIÓN DE RESISTENCIAS

Se realizó el análisis genotípico de resistencias en cada rebote de CV superior a 1000 copias/mL durante el tratamiento y de la primera CV detectable tras suspender el tratamiento.

Para ello el ARN del VIH se retrotranscribió en ADN complementario y se amplificó por RT-PCR utilizando el ensayo comercializado de ViroseqTM (Abbot Park, IL, EEUU) versión 2 siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema permite la retrotranscripción a ADN complementario y la posterior amplificación de la región gag-pol. Posteriormente, las muestras amplificadas fueron purificadas y secuenciadas utilizando los cebadores que facilita la casa comercial. El resultado es un amplicón de unos 1300 pares de bases que incluye el último fragmento del gen gag y aproximadamente 1000 pares de bases del gen pol. La secuencia, obtenida con el secuenciador ABI PRISM 3100, cubre las regiones donde se sitúan las mutaciones que confieren resistencia a los fármacos antirretrovirales. El alineamiento de las

secuencias se hizo utilizando el programa que ofrece la propia casa comercial, que compara la secuencia problema con una cepa de laboratorio salvaje de VIH, la HXB-2.

3.10. ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES LINFOCITARIAS T

El estudio de las subpoblaciones celulares de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se realizó de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18) mediante inmunofluorescencia directa de triple marcaje con anticuerpos monoclonales fluorocromados (PerCP, PE, FITC) y análisis por citofluorimetría de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) sobre CMSP aisladas por centrifugación sobre gradientes de Ficoll-Hypaque. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

- En tubos de polipropileno de 5 mL añadir 5 µL de cada uno de los anticuerpos monoclonales comerciales marcados con los fluorocromos correspondientes (PerCP, FITC y PE) (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, EEUU). En este caso se utilizaron los anticuerpos contra los siguientes CD de superficie con diferentes fluorocromos y combinaciones: CD3, CD4, CD8, CD45, CD45RO, CD45RA, CD62L, CD28, CD57, CD38, HLADR, CxCR4, CCR5 y CD25 además de un control negativo (γ1-PC, γ1PE y γ1-FITC) (**Tabla M.3.1.**).

- Añadir posteriormente a cada tubo 50 µL de CMSP resuspendidas en medio de cultivo X-VIVO-10 (para conseguir 10⁵ células por tubo).

- Agitar.

- Incubar 30 minutos a 4°C.

- Añadir 2 mL de tampón de lavado. En este caso el tampón estaba preparado con PBS dilución 1:1 (un tampón fosfato salino), 0.5% de BSA (albúmina bovina) y 0.1% de azida sódica.

- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.

- Decantar el sobrenadante.

- Añadir 150 µL de tampón de fijación (preparado con PBS 1:1 y formol al 1%).

- Guardar a 4°C protegido de la luz hasta su análisis en el citómetro de flujo.

Tabla M.3.1. Estudio de las subpoblaciones linfocitarias T mediante citometría de flujo. Se muestran los anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo utilizados (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, EEUU), el tipo celular que identifica y su significado. LT: Linfocito T

Marcadores de membrana	Tipo celular que identifica	Significado
$\gamma 1$ -PC + $\gamma 1$ -PE + $\gamma 1$ -FITC	Control negativo	
CD3-PC + CD8-PE + CD4-FITC	LT CD4 ⁺ LT CD8 ⁺	Linfocitos CD4 ⁺ totales Linfocitos CD8 ⁺ totales
CD4-PC + CD57-FITC + CD28-PE	LT CD4 ⁺ CD28 ⁺ LT CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	Molécula coestimuladora, marcador de activación/maduración/diferenciación Molécula marcadora de citotoxicidad. Población senescente, muy diferenciada
CD4-PC + DR-FITC + CD38-PE	LT CD4 ⁺ CD38 ⁺ LT CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	Marcador de activación Marcador de activación
CD8-PC + CD57-FITC + CD28-PE	LT CD8 ⁺ CD28 ⁺ LT CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	Molécula coestimuladora, marcador de activación/maduración/diferenciación Molécula marcadora de citotoxicidad. Población senescente, muy diferenciada
CD8-PC + DR-FITC + CD38-PE	LT CD8 ⁺ CD38 ⁺ LT CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	Marcador de activación Marcador de activación
CD4-PC + CD45RA-FITC + CD45RO-PE	LT CD4 ⁺ CD45RA ⁺ RO ⁺ LT CD4 ⁺ CD45RA ⁺ RO ⁻ LT CD4 ⁺ CD45RA ⁻ RO ⁺	Marcador de fenotipo de transición <i>naïve</i> -memoria Marcador de fenotipo <i>naïve</i> Marcador de fenotipo memoria
CD4-PC + CD45RA-FITC + CD62L-PE	LT CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	Marcador de fenotipo <i>naïve</i>
CD8-PC + CD45RA-FITC + CD45RO-PE	LT CD8 ⁺ CD45RA ⁺ RO ⁺ LT CD8 ⁺ CD45RA ⁺ RO ⁻ LT CD8 ⁺ CD45RA ⁻ RO ⁺	Marcador de fenotipo de transición <i>naïve</i> -memoria Marcador de fenotipo <i>naïve</i> Marcador de fenotipo memoria
CD8-PC + CD45RA-FITC + CD62L-PE	LT CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	Marcador de fenotipo <i>naïve</i>
CD4-PC + CCR5-FITC + CXCR4-PE	LT CD4 ⁺ CXCR4 ⁺ LT CD4 ⁺ CCR5 ⁺ LT CD8 ⁺ CXCR4 ⁺ LT CD8 ⁺ CCR5 ⁺	Marcador de correceptor de entrada del VIH Marcador de correceptor de entrada del VIH Marcador de correceptor de entrada del VIH Marcador de correceptor de entrada del VIH
CD3-PC + CD4-FITC + CD25-PE	LT CD4 ⁺ CD25 ⁺	Marcador de linfocito regulador

Para el análisis se adquirieron un mínimo de 5000 células en el citómetro. Durante el análisis y tras definir las células mononucleares por FSC y SSC, se definió una región para FL3 donde se analizaron consecutivamente FL1 y FL2 mediante el uso del software CELLQuest® (Becton Dickinson) (Figura M.3.1).

Se evaluaron así las siguientes subpoblaciones:

- Linfocitos T CD3⁺.
- Linfocitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺).
- Linfocitos T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺).
- Diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺:
 - CD3⁺CD4⁺CD28⁺ y CD3⁺CD8⁺CD28⁺ (CD28 como molécula coestimuladora y marcador de activación/maduración/diferenciación).
 - CD4⁺CD28⁻CD57⁺ y CD8⁺CD28⁻CD57⁺ (CD57⁺ es un marcador de citotoxicidad, pero el interés de la población CD28⁻CD57⁺ es porque se considera una población senescente, muy diferenciada y terminal y con poca capacidad proliferativa).
 - CD3⁺CD4⁺CD38⁺ y CD3⁺CD8⁺CD38⁺ (CD38 como marcador de activación).
 - CD4⁺CD38⁺HLADR⁺ y CD8⁺CD38⁺HLADR⁺ (CD38 y/o HLA DR como marcadores de activación).
 - CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ y CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ (marcador de fenotipo celular *naïve*).
 - CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ y CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ (marcador de fenotipo celular de transición entre *naïve* y memoria).
 - CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ y CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ (marcador de fenotipo celular memoria).
 - CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺ y CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ (marcador de fenotipo celular *naïve*).
 - CD3⁺CD4⁺CXCR4⁺ y CD3⁺CD8⁺CXCR4⁺ (marcador de un correceptor de entrada del VIH).
 - CD3⁺CD4⁺CCR5⁺ y CD3⁺CD8⁺CCR5⁺ (marcador de un correceptor de entrada del VIH).
 - CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (como linfocitos T reguladores).

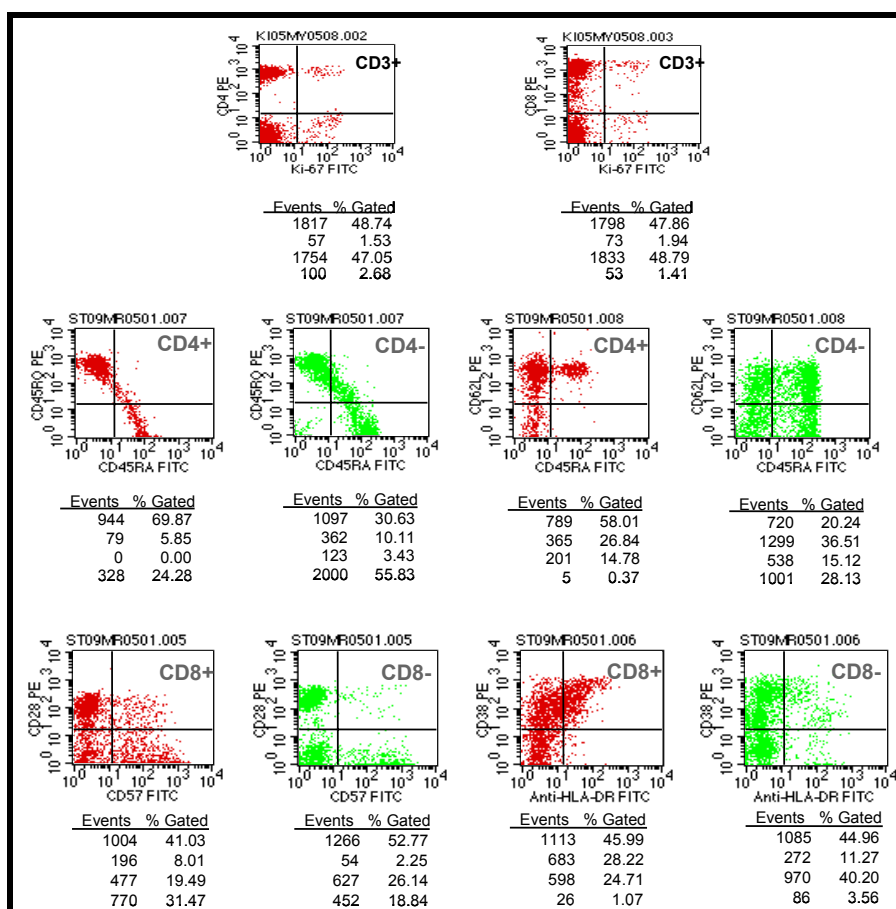


Figura M.3.1. Ejemplo de los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia directa de triple marcaje con anticuerpos monoclonales fluorocromados (PerCP, PE, FITC) y análisis por citofluorimetría de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias

3.11. ESTUDIO DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA T (CD4⁺)

El estudio de la respuesta proliferativa que presentan las células T frente a diferentes estímulos se ha considerado clásicamente un indicador de la respuesta T CD4⁺ en general y frente a determinados antígenos en particular (251).

Se realizó en nuestro caso el análisis de la respuesta proliferativa de las células T frente a estímulos policlonales, antígenos de recuerdo ubícuos y proteínas del VIH-1 de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18). Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- Las CMSP se resuspendieron en medio libre de proteínas (X-VIVO 10, Biowhitacker, Maryland).

- Se cultivaron estas células por triplicado a 10^5 células/pocillo (en el caso de cultivos de 4 días con mitógenos policlonales) ó 2×10^5 células/pocillo (en el caso de cultivos de 7 días con antígenos específicos) en placas de 96 pocillos de fondo redondo (TPP, Europa) en presencia de medio de cultivo solo o medio de cultivo con los distintos activadores.

- Los activadores utilizados fueron de tres tipos (**Tabla M.3.2.**):

- Estímulos mitogénicos policlonales:

- Fitohemaglutinina (PHA) 0,5% y 1% (Murex Biotech Ltd, England).
- Mitógeno Pokeweed (PWM) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma, St Louis, MO, EEUU).
- Anticuerpos anti-CD3 (OKT3) 1ng/mL y 10 ng/mL (Ortho Biotech LTd, Raritan, NY).
- Anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, precipitado y purificado a partir de sobrenadante de cultivo del hibridoma 152-2E10, IgG1, producido por el Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona.

- Antígenos de recuerdo y ubícuos:

- Toxoide tetánico 2750 U (Sanofi Pasteur).
- Antígeno del CMV 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BioWhitacker).

- Proteínas recombinantes del VIH-1 producidas en baculovirus (Protein Sciences, Meriden, CT) en concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$:

- gp160.
- p24.

- Los cultivos celulares con el activador se incubaron 4 ó 7 días según el activador (4 para los policlonales y 7 para los específicos).

- Durante las últimas 18 horas de cultivo se incorporó timidina tritiada (Thd-H3, Nuclear Ibérica, actividad específica 2 Ci/mmol) a razón de 2 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$ diluída en medio X-

VIVO 10, y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ según los procedimientos estandarizados.

- Finalmente se evaluó la respuesta proliferativa mediante la recogida del cultivo y posterior lectura en un contador de centelleo de radioactividad beta (Betaplate LKB Wallac, Suecia) que ofreció un resultado de cuentas por minuto (cpm).

- Las respuestas proliferativas fueron consideradas positivas si eran superiores a 3000 cpm y si el índice de estimulación (SI) era superior a 3 para antígenos específicos o superior a 15 para estímulos policlonales. El SI se obtuvo del cociente cpm con estímulo/cpm sin estímulo.

Tabla M.3.2. Activadores utilizados en el estudio de las respuestas proliferativas. Se muestra el activador, el grupo al que pertenece, la casa comercial de la que se obtuvo y la función que representa

Activador	Casa comercial	Función
Mitógenos policlonales		
Fitohemaglutinina 0,5%	Murex Biotech Ltd, England	
Fitohemaglutinina 1%	Murex Biotech Ltd, England	Informan de la viabilidad de los linfocitos,
Mitógeno Pokeweed	Sigma, St Louis, MO, EEUU	fundamentalmente los CD4 ⁺ , y son una
Anticuerpos anti-CD3	Ortho Biotech LTd, Raritan, NY	medida indirecta de su activación
Anticuerpos anti-CD3+anti-CD28	Servicio Inmunología Hospital Clínic	
Antígenos de recuerdo y ubícuos		
Toxoide tetánico	Sanofi Pasteur	Informan de la capacidad de los linfocitos
Citomegalovirus	BioWhitacker	T CD4 ⁺ de reconocer (y activarse) ante
Proteínas recombinantes del VIH-1		
gp160	Protein Sciences, Meriden, CT	esos antígenos específicos
p24	Protein Sciences, Meriden, CT	

3.12. ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS CD8⁺ ESPECÍFICAS ANTI-VIH

Para analizar la respuesta CD8⁺ específica frente a un determinado antígeno se cuantifican aquellas células que son capaces de producir determinadas citocinas ante la presencia de ese antígeno. En este estudio se realizó mediante la detección de producción de IFN-γ por las células CD8⁺ frente a antígenos o péptidos del VIH-1, y se determinó mediante el ensayo ELISPOT de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18). Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

- Se utilizaron placas PVDF de 96-pocillos (MAIP S 45; Millipore, Bedford, MA) sensibilizadas con 15 μg/ml de anticuerpos monoclonales anti-IFN-γ 1-D1K (Mabtech; Stockolm, Sweden) y bloqueadas 3 horas con RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal

bovino.

- Las CMSP se resuspendieron en medio libre de proteínas (X-VIVO 10, Biowhitacker, Maryland).

- Se cultivaron estas células por duplicado en concentración de 2×10^5 /pocillo en las placas comentadas en presencia de un control negativo, de un control positivo con PHA (1µg/mL), y de los distintos péptidos del virus VIH-1 (gag, pol, env, nef) restringidos para los diferentes antígenos del MHC de clase I atendiendo al tipaje HLA del individuo, durante 18 horas a 37°C, 5% CO₂. Para el péptido gag se utilizaron las proteínas p24, p17 y el pool de p2, p7, p1 y p6, conocido como small.

- Tras el cultivo, se descartaron las células de los pocillos.

- Se lavó la placa con PBS más 0,05% de Tween 20.

- Se añadió durante 3 horas 50 µl de 1 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti-IFN-γ 7-B6-1 biotilado (Mabtech).

- Se volvió a lavar la placa con PBS más 0.05% de Tween 20.

- Se añadieron 1:1000 de la dilución del conjugado fosfatasa alcalina-estreptavidina (Mabtech).

- Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

- Se lavó nuevamente la placa.

- Se añadieron 100 µl del sustrato cromogénico fosfatasa alcalina (Bio Rad Labs., Hercules, CA) diluido 1:25, y se protegió la placa de la luz.

- Treinta minutos más tarde, la reacción colorimétrica se terminaba mediante su lavado con agua corriente. Finalmente se dejaba secar la placa al aire hasta proceder a su lectura (**Figura M.3.2.**).

- Las células formadoras de puntos o *spots* (*Spots forming cells* (SFC)) se contaron con la ayuda del lector automatizado AID ELISPOT reader (Autoimmun Diagnostica GmHb, Germany).

- Se sustrajeron los resultados obtenidos de los que mostraba el control negativo, de

CMSP y medio solo, sin antígenos (el *background*).

- La frecuencia de células formadoras de *spots* se expresó con relación a 10^6 CMSP para cada muestra evaluada.
- Se consideró una respuesta positiva cuando el resultado fue superior a 50 SFC/ 10^6 y 2 veces superior al *background*.

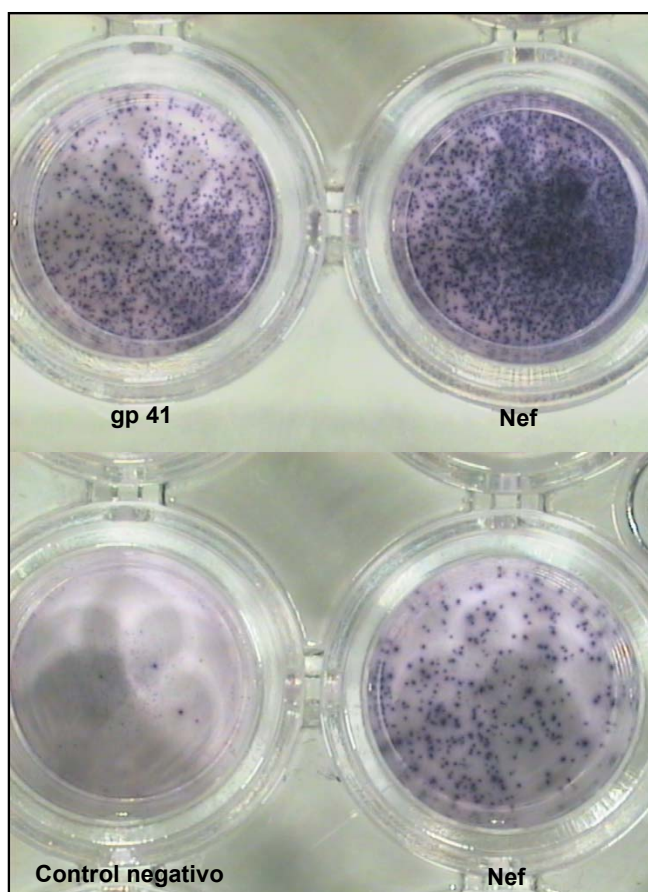


Figura M.3.2. Placas de ELISPOT para la medición de la respuesta CD8⁺ específica anti-VIH. Se muestran 3 placas con respuesta frente a diferentes péptidos (gp 41 y Nef) y una placa de control negativo o *background*.

3.13. TC MEDIASTÍNICA PARA MEDICIÓN DEL VOLUMEN TÍMICO

Se realizó una TC mediastínica en los meses 0 (basal), 12 (tras el calendario vacunal o placebo) y 18 (tras 6 meses sin tratamiento) del ensayo. Los estudios se realizaron con un Scanner Siemens Somaton Plus 4, obteniendo cortes de 5 mm de grosor a intervalos de 5 mm, sin inyección de contraste.

La cantidad de tejido tímico se valoró de dos maneras (**Figura M.3.3.**):

- Índice tímico: El método clásico más utilizado en la literatura (578), consistente en dar un índice de una escala del 0 al 5, donde los valores significan:

- 0: Ausencia de tejido blando, el timo ha sido reemplazado totalmente por grasa.
- 1: Mínimo tejido blando, difícilmente reconocible.
- 2: Mínimo tejido blando pero más obvio.
- 3: Moderado tejido blando.
- 4: Moderado tejido blando de mayor extensión, asemejándose a una masa.
- 5: Masa de tejido, que equivaldría a un timoma o una hiperplasia tímica.

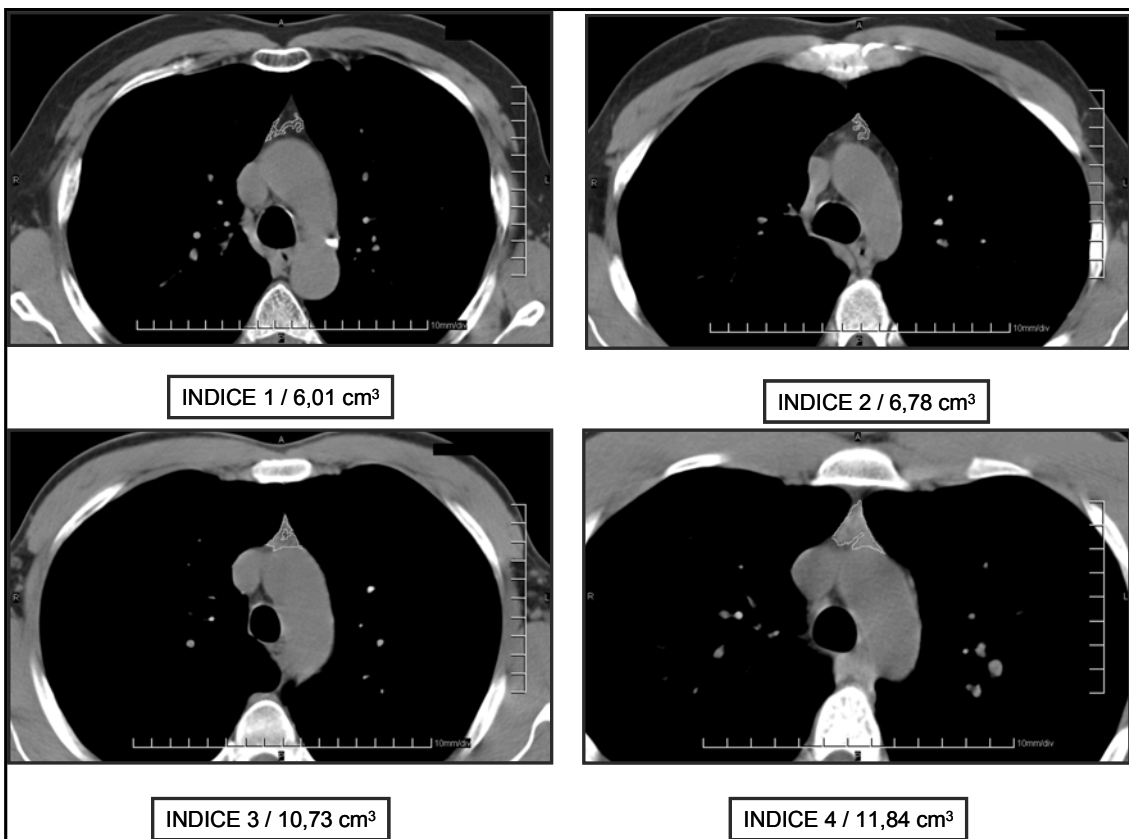


Figura M.3.3. Ejemplo de imágenes obtenidas mediante TC para el estudio del tejido tímico. Se muestran 4 pacientes, con las medidas según índice y volumen

- Volumen tímico: Las TC mediastínicas se analizaron mediante un método modificado previamente descrito en la literatura para determinar el volumen tímico (576). Para ello se identificaron el primer y último corte que contenían tejido tímico y se delimitó de forma precisa, separándolo de la grasa mediastínica en todos esos cortes, basándose en la diferente

densidad que presentan (menor para la grasa). La lectura se realizó mediante el Software Osiris® versión 4.19, desarrollado por la Unidad de Imagen Digital del Servicio para informatización médica del Departamento de Radiología de los Hospitales Universitarios de Ginebra (Suiza), que permite dar un valor en centímetros cuadrados del área marcada en cada corte. El volumen de tejido tímico en ese corte en centímetros cúbicos se obtiene multiplicando el área por el grosor del corte (0,5 cm). El valor final de volumen tímico se consigue con la suma del obtenido en cada corte.

Las TC y las mediciones se realizaron siempre por el mismo técnico y el mismo radiólogo para evitar variaciones.

3.14. DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T NAÏVE EN PROLIFERACIÓN

La identificación de las subpoblaciones celulares T *naïve* en proliferación se realizó mediante el marcador intracelular de proliferación Ki-67. Estas subpoblaciones se determinaron en nuestro estudio de forma trimestral (mes 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).

Se realizó mediante inmunofluorescencia directa de triple marcaje con anticuerpos monoclonales fluorocromados y análisis por citometría de flujo sobre CMSP aisladas por centrifugación sobre gradientes de Ficoll-Hypaque (como en el **apartado 3.10.** de **Pacientes y Métodos**) y previamente permeabilizadas.

Por pasos:

- En tubos de polipropileno de 5 mL se añadieron 10 µL de cada uno de los anticuerpos monoclonales comerciales marcados con los fluorocromos correspondientes (PerCP, FITC y PE) (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, EEUU). En este caso se utilizaron los anticuerpos contra los siguientes CD con diferentes fluorocromos y combinaciones: CD3, CD4, CD8, CD45, CD45RA, además de un control negativo (γ 1-PC, γ 1PE y γ 1-FITC).
- Se añadieron posteriormente a cada tubo 200 µL de CMSP resuspendidas en medio de cultivo X-VIVO-10 (para conseguir 2×10^6 células por tubo).

- Se agitaron.
- Se incubaron 30 minutos a 4°C.
- Se añadieron 2 mL de tampón de lavado (preparado con PBS dilución 1:1 (un tampón fosfato salino), 0.5% de BSA (albúmina bovina) y 0.1% de azida sódica).
- Se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm.
- Se decantó el sobrenadante.
- Se añadieron 2 mL de solución “lisante” dilución 1:1 (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, EEUU).
- Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se volvieron a centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
- Se decantó el sobrenadante.
- Se añadieron 0.5 mL de solución “permeabilizante” dilución 1:1 (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, EEUU).
- Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm.
- Se decantó el sobrenadante.
- Se añadieron 10 µL del anticuerpo Ki-67 FITC y el control negativo.
- Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadieron 2 mL de tampón de lavado.
- Se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm.
- Se decantó el sobrenadante.
- Se añadieron 150 µL de tampón de fijación (preparado con PBS 1:1 y formol al 1%).
- Finalmente se guardaron a 4°C protegido de la luz hasta su análisis en el citómetro de flujo.

Se evaluaban así el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ CD45RA⁺ que coexpresaban el marcador intracelular clásico de proliferación Ki-67:

- CD3⁺Ki67⁺.
- CD3⁺CD4⁺Ki67⁺.
- CD3⁺CD8⁺Ki67⁺.
- CD4⁺CD45RA⁺Ki67⁺.
- CD8⁺CD45RA⁺Ki67⁺.

3.15. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS PORTADORAS DE *TRECS*

La determinación de células portadoras de *TRECs* en CMSP se realizó de forma semestral durante el tratamiento (mes 0, 6 y 12) y trimestral tras su suspensión (mes 15 y 18).

Para ello se utilizó el método descrito por Douek y col. (28) modificado por Franco y col. (577), consistente en una PCR a tiempo real usando un termociclador LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) que permite la cuantificación de las secuencias sj- δ Rec- ψ J α *TREC* durante la fase exponencial de las amplificaciones por PCR. Se utilizó para ello una sonda de hibridación marcada con un fluorocromo o mediante la utilización de SYBR-green. Cuando se utiliza una sonda, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa sobre la sonda específica la escinde, liberándose una señal fluorescente que aumenta de forma exponencial a medida que se producen los ciclos de amplificación. Para cuantificar la señal se utilizó la relación entre la intensidad de la señal fluorescente y el número de ciclos de PCR.

En primer lugar fue necesario realizar la extracción del ADN, la cual se realizó mediante el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemania) usando como fuente los “*pellets*” de CMSP previamente congeladas a -80°C el día de la extracción. Por pasos:

- Se resuspendieron las CMSP en 200 μ L de PBS dilución 1:1.
- Se añadió 200 μ L del tampón comercial AL (tampón de lisis).
- Se añadió 20 μ L de proteinasa K, guardada a -20°C en concentración 20 mg/mL y se agitó en vórtex.
- Se incubó 10 minutos a 56°C.

- Se añadieron 200 μ L de etanol absoluto y se agitó en vórtex.
- Se pasó el volumen a unas columnas comerciales, provistas de una membrana de sílica-gel para retener el ADN, y se centrifugaron 1 minuto a 8000 rpm.
- Se desechó el colector y se puso un colector nuevo.
- Se añadieron 500 μ L de tampón AW1 y se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm.
- Se desechó el colector y se puso un colector nuevo.
- Se añadieron 500 μ L de tampón AW2 (tampón de lavado) y se centrifugó 3 minutos a 14000 rpm.
- Se pasaron las columnas a tubos Eppendorf®.
- Se añadieron 200 μ L de H₂O destilada y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm y se guardó a -20°C hasta la cuantificación.

Para realizar una cuantificación del ADN así como para evaluar su grado de pureza, se analizó mediante espectrofotometría. Para ello se preparó una dilución 1:10 del ADN diluido (10 μ L de la solución con 90 μ L de agua destilada) y se introdujo en un espectrofotómetro con una absorbancia de 260/280 λ , obteniendo la concentración de ADN en $\mu\text{g/mL}$. De acuerdo con la ratio 260/280 se interpretó si existía contaminación de proteínas cuando la ratio fue superior a 1,8.

La cuantificación de *TRECs* en las CMSP se efectuó mediante la comparación con un estándar en PCR a tiempo real en el termociclador referido a dos controles internos, uno específico de célula T y a un gen constitutivo (β -globina).

La secuencia de los cebadores y sondas a utilizar se diseñaron a partir de un sj- δ Rec- ψ J α clonado de 375 pares de bases obtenido de una muestra tímica pediátrica del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla (aprobado por el Comité de Ética del centro), superponibles a los

descritos en la literatura. Se realizaron las determinaciones realizando una escala patrón a partir de muestras con concentración conocida tanto de *TREC* como de β -globina.

Los pasos que se siguieron, y trabajando siempre en frío y por duplicado, fueron:

- Preparar la escalera patrón de *TREC* o de β -globina diluyendo sucesivamente $\frac{1}{2}$ a partir de una muestra patrón de *TREC* y β -globina. En nuestro caso sabíamos por trabajos previos que los valores más adecuados de la escalera se encontraban entre 2050 copias y 128 copias de *TREC* y $1,4 \times 10^4$ y $8,9 \times 10^2$ copias de β -globina. La dilución se realizó en nuestro caso con $3,5 \mu\text{L}$ de patrón y $3,5 \mu\text{L}$ de agua (MILLI-Q o agua estéril para PCR).

- Preparar el MasterMix.

- Para la determinación de *TRECs* se usaron los componentes incluidos en el kit comercial LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche, Penzberg, Alemania):

- 6 partes de H_2O .
- 2 partes de magnesio.
- 2 partes de cebador TCRSE (5'- AAA GAG GGC AGC CCT CTC CAA GGC-3'), fabricado por encargo por TIB Molbiol (Berlín, Alemania).
- 2 partes de cebador TCRAS (5'- AGG CTG ATC TTG TCT GAC ATT TGC TCC- 3') fabricado por encargo por TIB Molbiol (Berlín, Alemania).
- 0,5 partes de sonda FLU (5'- AGG GAT GTG GCA TCA CCT TTG TTG ACA-3', marcada en su extremo 3' con fluoresceína) fabricado por encargo por TIB Molbiol (Berlín, Alemania).
- 0,5 partes de sonda RED (5' GGC ACC CCT CTG TTC CCC ACA GGA-3', marcada con el aceptor fluoróforo Red 640 en su extremo 5') fabricado por encargo por TIB Molbiol (Berlín, Alemania).
- En último lugar se añadían 2 partes de enzima.

- Para la determinación de β -globina se usaron los componentes incluidos en el kit comercial LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche, Penzberg, Alemania):
 - 6,5 partes de H₂O
 - 2,2 partes de Mg.
 - 2 partes de GH20⁺ fabricado por encargo por TIB Molbiol (Berlín, Alemania).
 - 2 partes de PC04⁺ fabricado por encargo por TIB Molbiol (Berlín, Alemania).
 - 1 parte de sonda.
 - 2 partes de enzima.
- Preparar los capilares por duplicado (Roche, Penzberg, Alemania), mezclando 3 μ L de muestra y 9 μ L de MasterMix, así como un capilar de control en el que se mezclaban 3 μ L de muestra con 9 μ L de MasterMix.
- Introducir los capilares en el termociclador LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) donde se realizaba la PCR con las siguientes condiciones:
 - Desnaturalización (1 ciclo) 95°C durante 120 segundos.
 - Amplificación (45 ciclos):
 - Desnaturalización (95°C durante 0 segundos).
 - Acoplamiento (63°C durante 40 segundos) y fluorescencia en F2 y F1.
 - Extensión (72°C durante 40 segundos).
 - Enfriamiento (40° durante 15 segundos).
- Finalmente, para valorar los resultados, se realizaba una curva patrón que cumplía los mejores criterios (R cercana a 1 y pendiente cercana a -3,4) (**Figura M.3.4.**).
- Las determinaciones se realizaron por duplicado, y solamente se dieron como válidos los resultados promedio que presentaron menos del 10% de variabilidad.

De este modo obtuvimos dos valores diferentes de *TRECs*:

- El número total o los *TRECs*/μL. Según algunos autores, sería la cifra que menos se vería influenciada por los cambios en la proliferación periférica de los ETR (582).
- El número de *TRECs*/célula, cuando se ajustó por el número de células cuantificado por la β-globina. Es la forma clásica de presentación, solíéndose expresar en *TRECs* x 10⁶ CMSP.

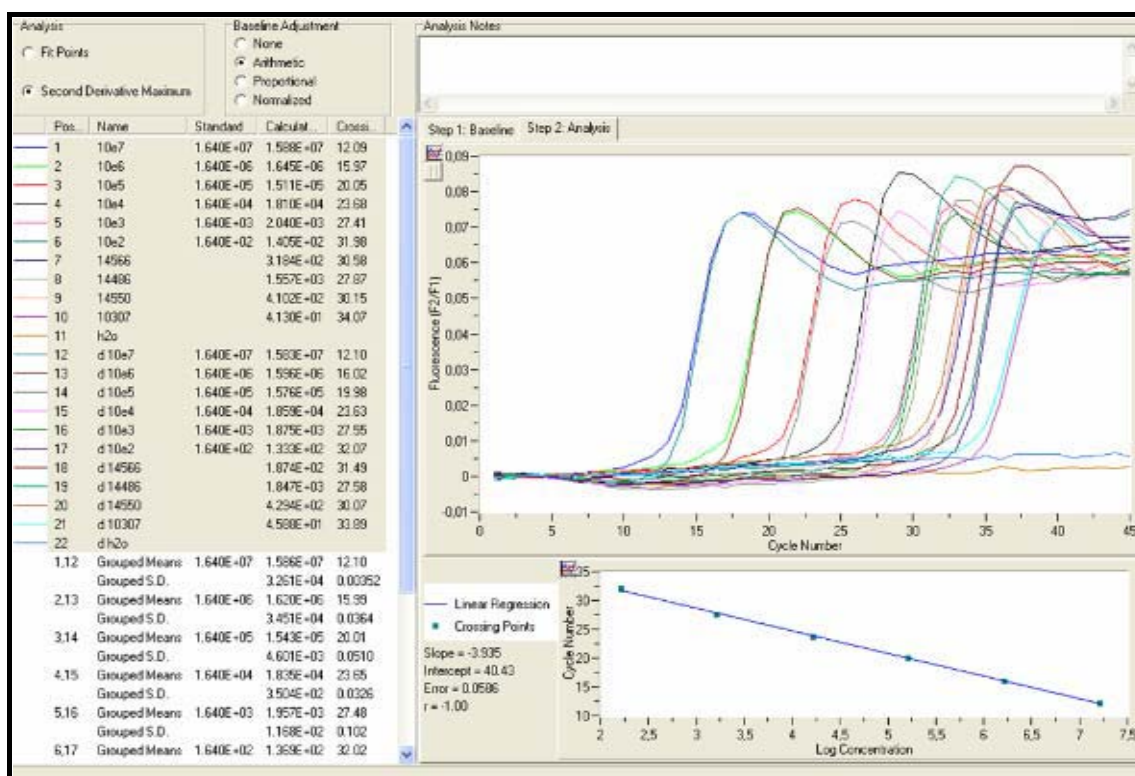


Figura M.3.4. Ejemplo de cuantificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real de las células portadoras de *TRECs*. Se muestra la pantalla del termociclador LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) durante el proceso de amplificación y la recta de regresión para el cálculo de las concentraciones de las muestras problema

3.16. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES SÉRICAS DE IL-7

Se realizaron determinaciones de las concentraciones séricas de IL-7 de forma semestral durante el tratamiento (mes 0, 6, y 12) y trimestral tras su suspensión (mes 15 y 18). Para ello se

utilizó un ELISA colorimétrico de alta sensibilidad (IL-7 immunoassay kit; R&D System QuantikineHS, Minneapolis, MN, EEUU) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

- Descongelar lentamente el suero.
- Poner a temperatura ambiente los diferentes componentes del kit de ELISA.
- Añadir 50 µL del diluyente del ensayo RD1C (que contiene una proteína base tamponada) a cada uno de los 96 pocillos de la placa.
- Añadir 200 µL de cada muestra y de una curva estándar por duplicado: en nuestro caso, del pocillo 1A al 1H se colocó la curva estándar, con su duplicado, es decir, una muestra idéntica, del pocillo 2A al 2H. Y en el resto de pocillos se colocaron las muestras, también por duplicado (Figura M.3.5).

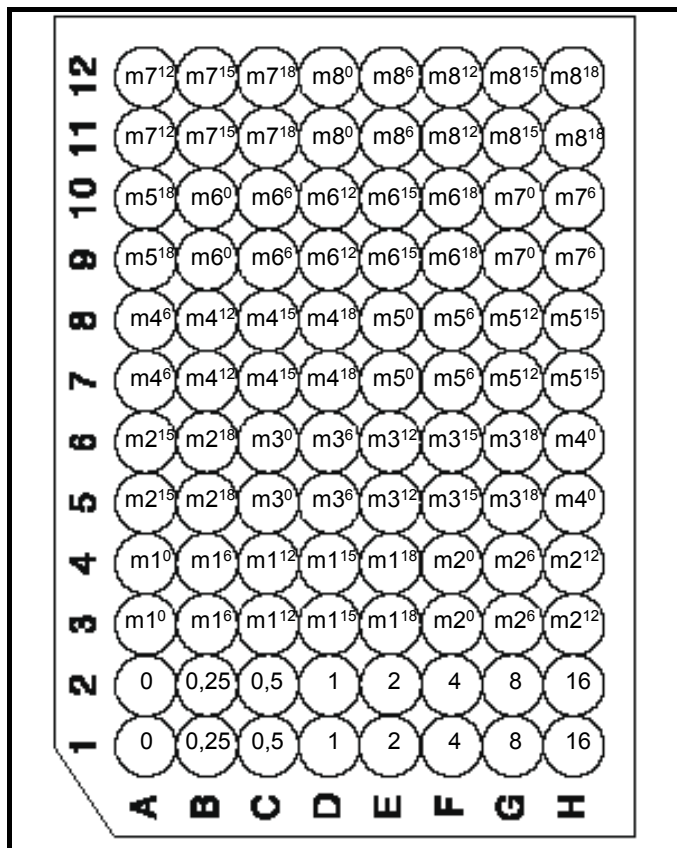


Figura M.3.5. Esquema de la placa de ELISA utilizada para el cálculo de la concentración sérica de IL-7. Se pueden observar en las columnas 1 y 2 las muestras (por duplicado) para el cálculo de la curva estándar y en el resto, las muestras de 8 pacientes diferentes (por duplicado) para los meses 0, 6, 12, 15 y 18. m_x^x = muestra-número de paciente^{número de muestra}

- Para realizar la curva estándar se reconstituyeron 80 pg de IL-7 humana recombinante liofilizada con 5 mL de diluyente calibrador HD6-2 (incluido en el kit). Con ello se conseguía una solución con una concentración de 16 pg/mL, a partir de la cual se podían conseguir,

mediante series de diluciones a la mitad con el mismo diluyente calibrador HD6-2, la curva estándar, con los siguientes valores: 16 pg/mL, 8 pg/mL, 4 pg/mL, 2 pg/mL, 1 pg/mL, 0,5 pg/mL, 0,25 pg/mL. La concentración de 0 pg/mL se conseguía con el mismo diluyente calibrador.

- En nuestro caso, tras una primera serie de determinaciones y observar que la mayoría de valores quedaban en la parte alta de la curva estándar, hicimos una dilución previa de las muestras con el diluyente HD6-2 en relación 1:1 (200 µL de muestra con 200 µL de diluyente).

- Incubar durante 14-20 horas a temperatura ambiente.

- Lavar 4 veces los pocillos. Se realizó indiferentemente de forma manual o automática (Columbus Washer, Tecan, Austria). El tampón de lavado se obtenía tras diluir el concentrado de 100 mL adjunto en el kit con 400 mL de agua destilada.

- Añadir 200 µL de conjugado de IL-7 a cada pocillo, que contenía anticuerpo policlonal contra IL-7 conjugado con fosfatasa alcalina.

- Incubar 2 horas a temperatura ambiente.

- Lavar 4 veces los pocillos.

- Añadir 50 µL de solución de sustrato a cada pocillo. La solución de sustrato se consiguió tras reconstituir un liofilizado de NADPH en 6 mL de diluyente al menos 10 minutos antes de su uso.

- Incubar 45 minutos a temperatura ambiente.

- Añadir 50 µL de solución amplificadora a cada pocillo. La solución amplificadora se consiguió tras reconstituir enzimas liofilizados en 6 mL de diluyente al menos 10 minutos antes de su uso.

- Incubar 45 minutos a temperatura ambiente.

- Añadir 50 µL de solución de parada a cada pocillo, que contenía ácido sulfúrico 2N.

- Determinar la densidad óptica de cada pocillo en los 30 minutos siguientes. La determinación se realizó mediante un lector a 490 nm. Se restaron las lecturas hechas a 650 nm ó 690 nm de las lecturas a 490 nm, lo que permitió corregir imperfecciones ópticas.

Para el cálculo de resultados, se calculó la media de las lecturas de densidad óptica de cada estándar y de cada muestra, restando la media de los valores que daba la muestra de 0 pg/mL. Se fabricó entonces la mejor curva con los valores estándar que permitiese el cálculo de concentraciones de IL-7 a partir de las densidades ópticas obtenidas. Como se diluyeron las muestras, el resultado se multiplicó por el factor de dilución (2).

3.17. DETERMINACIÓN DEL RECEPTOR DE LA IL-7 (IL-7R)

Se determinó la proporción de poblaciones linfocitarias portadoras de la subunidad α del IL-7R (CD127) de forma semestral durante el tratamiento (mes 0, 6, y 12) y trimestral tras su suspensión (mes 15 y 18).

Se realizó mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales fluorocromados y análisis por citofluorimetría de flujo sobre CMSP aisladas por centrifugación sobre gradientes de Ficoll-Hypaque, evaluando la expresión de la cadena α del receptor de la IL-7 (CD 127). Para su determinación se siguieron los siguientes pasos:

- En tubos de polipropileno de 5 mL se añadieron 5 μ L de cada uno de los anticuerpos monoclonales marcados con los fluorocromos correspondientes (PerCP, FITC y PE). En este caso se utilizaron los anticuerpos contra los siguientes CD con diferentes fluorocromos y combinaciones: Receptor de IL-7 o CD127 (Immunotech, Marsella, Francia), así como CD3, CD4, CD8, CD45RO y CD45RA, además de un control negativo (γ 1-PC, γ 1PE y γ 1-FITC) (BD Biosciences-Pharmlingen, San Diego, EEUU).

- Se añadieron posteriormente a cada tubo 50 μ L de PBMC resuspendidas en medio de cultivo X-VIVO-10 (para conseguir 10^5 células por tubo).

- Se agitó.

- Se incubó 30 minutos a 4°C.

- Se añadió 2 mL de tampón de lavado. En este caso el tampón estaba preparado con PBS dilución 1:1 (un tampón fosfato salino), 0.5% de BSA (albúmina bovina) y 0.1% de azida sódica.

- Se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm.
- Se decantó el sobrenadante.
- Se añadió 150 µL de tampón de fijación (preparado con PBS 1:1 y formol al 1%).
- Finalmente se guardó a 4°C protegido de la luz hasta su análisis en el citómetro de flujo.

Un mínimo de 5000 células se adquirieron en el citómetro. Durante el análisis y tras definir las células mononucleares por FSC y SSC, se definió una región para FL3 donde se analizaron consecutivamente FL1 y FL2 mediante el uso del software CELLQuest® (Becton Dickinson).

Se evaluaron de esta forma los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ CD45RA⁺ (*naïve*) y CD45RO⁺ (memoria) que coexpresaban el receptor para la IL-7 (CD127):

- CD4⁺CD45RA⁺CD127⁺.
- CD4⁺CD45RO⁺CD127⁺.
- CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺.
- CD8⁺CD45RO⁺CD127⁺.

3.18. ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL A ANTÍGENOS VACUNALES

Se determinó la respuesta de inmunoglobulinas IgG específicas a los distintos antígenos vacunales administrados mediante técnicas de ELISA comerciales de forma trimestral durante el tratamiento (meses 0, 3, 6, 9 y 12, excepto para el neumococo, que sólo se realizó en los meses 0, 3 y 12, y difteria, que sólo se realizó en los meses 0 y 12) y 6 meses después de la suspensión del TARGA (mes 18). Las determinaciones se realizaron a partir del suero previamente congelado.

Dependiendo de la técnica podíamos obtener tres tipos de resultados:

- a. Cuantitativo.

b. Cualitativo: Sólo fue posible saber si el paciente era “positivo” o “negativo”, la técnica no ofreció un resultado valorable desde el punto de vista cuantitativo.

c. Semicuantitativo.

En el caso de los valores cuantitativos, para realizar el análisis de resultados, se transformaron también en cualitativos (positivo y negativo) según los estándares internacionales.

Todas las técnicas de ELISA utilizadas tenían límites superior e inferior de detectabilidad. Para algunos agentes éstos se alcanzaron con frecuencia (p.ej VHA). Cuando estos límites se alcanzaron no se realizaron diluciones o concentraciones adicionales, por lo que se tomaron éstos como los valores de la determinación para el análisis (**Tabla M.3.3.**).

Tabla M.3.3. Características de los métodos de medición de la respuesta humoral a los antígenos vacunales. Se muestran el método, el ensayo, el tipo de resultado que ofrecen y, en caso de ser cuantitativo, el rango de medidas y los valores a partir de los cuales se consideran positivos.

Agente	Método	Ensayo	Tipo resultado (rango)	Valor positividad (si cuantitativo)
Virus hepatitis A	ELISA	aHAVT-ReadyPack para Advia Centaur Immunoassay System (Bayer HealthCare LLC, Europa)	Cuantitativo (0-100 mUI/mL)	> 20 UI/mL
Virus hepatitis B	ELISA	aHBs-ReadyPack para Advia Centaur Immunoassay System (Bayer HealthCare LLC, Europa)	Cuantitativo (1-1000 mUI/mL)	> 10 mUI/mL
Varicela	ELISA	Vircell microbiologists, Granada, Spain	Cualitativo (positivo/negativo)	-
Parotiditis	ELISA	Vircell microbiologists, Granada, Spain	Cualitativo (positivo/negativo)	-
Rubéola	ELISA	RubG-ReadyPack para Advia Centaur Immunoassay System (Bayer HealthCare LLC, Europa)	Cuantitativo (0,2-500 UI/mL)	≥ 10 UI/mL
Sarampión	ELISA	Vircell microbiologists, Granada, Spain	Cualitativo (positivo/negativo)	-
Neumococo	ELISA	Método descrito por Metzger y modificado por Siber, realizado en laboratorio Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona	Cuantitativo > 0,11 U/mL	Basal > 645 U/mL ↑ ≥ x4 ↑ ≥ 395 U/mL
Tétanos	ELISA	Genzyme diagnostics, Virotech, Rüsselsheim, Alemania	Cuantitativo (0,01-5 UI/mL)	> 0,1 UI/mL
Difteria	ELISA	Genzyme diagnostics, Virotech, Rüsselsheim, Alemania	Cuantitativo (≥ 0,01 UI/mL)	> 0,1 UI/mL

Para analizar los cambios en la respuesta vacunal a lo largo del periodo de estudio se calculó el cociente o razón de los títulos, mediante el cociente de los títulos entre los dos meses a valorar.

3.18.1. Virus hepatitis A

Se analizó la respuesta humoral al VHA mediante el ensayo comercial aHAVT-ReadyPack para Advia Centaur Immunoassay System (Bayer HealthCare LLC, Europa), utilizado en la rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona.

Es un ensayo automatizado de ELISA tipo sándwich que utiliza la tecnología quimioluminométrica directa para detectar IgG contra el antígeno del VHA.

Los resultados se obtuvieron en mUI/mL, con un rango de 0-100,0 mUI/mL. Las muestras con un valor calculado superior a 20 mUI/mL se consideraron reactivas o positivas para los anticuerpos IgG anti-VHA.

El ensayo tenía una sensibilidad relativa inicial del 100% y especificidad relativa inicial del 99,13%.

3.18.2. Virus hepatitis B

Se analizó la respuesta humoral al VHB mediante el ensayo comercial aHBs-ReadyPack para Advia Centaur Immunoassay System (Bayer HealthCare LLC, Europa), utilizado en la rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona.

Es un ensayo automatizado de ELISA tipo sándwich que utiliza la tecnología quimioluminométrica directa para detectar IgG contra el HBsAg humano inactivado.

Los resultados se obtuvieron en mUI/mL, con un rango de valores de 1-1000 mUI/mL. Las muestras con un valor calculado igual o superior a 10,0 mUI/mL se consideraron reactivas o positivas de acuerdo con las normas del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) y basándose en el patrón internacional de la OMS para el suero anti-HBs como indicador del estado inmunológico y como valor límite para detectar a la mayoría de las personas seropositivas.

El ensayo tenía una sensibilidad relativa inicial del 98,5% y especificidad relativa inicial del 99,6%.

3.18.3. Varicela

Se analizó la respuesta humoral al VVZ mediante el kit comercial de ELISA para detección de IgG anti-VVZ utilizado en la rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona (Vircell microbiologists, Granada, Spain).

Brevemente, se colocaron en los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos recubiertos con antígenos de VVZ cepa Ellen (ATCC VR1367), 100 µL de diluyente de muestra (con tampón fosfato) y 5 µL de las muestras y de los controles (control positivo, suero *cut off* y control negativo). Tras incubar durante 45 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ se lavaron los pocillos, se añadió 100 µL de conjugado IgG, que contenía globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa, y se volvió a incubar durante 30 minutos. Posteriormente se volvió a lavar y se añadieron 100 µL de solución de sustrato. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente protegida de la luz, se añadieron 50 µL de solución de parada. La valoración de la reacción se realizó espectrofotométricamente a 450/620 nm antes de 1 hora de acabado el ensayo.

Se consideraron positivas aquellas muestras con un índice de anticuerpos mayor de 11 [índice de anticuerpos = (densidad óptica de la muestra/media de la densidad óptica del suero *cut off*) x 10].

El ensayo tenía una sensibilidad del 98% y una especificidad del 97%, con un coeficiente de variación intraensayo e interensayo del 4 y del 2,33 % respectivamente.

Los resultados obtenidos finalmente fueron cualitativos: positivo o negativo.

3.18.4. Parotiditis

Se analizó la respuesta humoral al virus del sarampión mediante el kit comercial de ELISA para detección de IgG anti-parotiditis utilizado en la rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona (Vircell microbiologists, Granada, Spain).

Brevemente, se colocaron en una placa de 96 pocillos recubiertos con antígenos del virus de la parotiditis, cepa Enders (ATCC VR-106), 100 µL de diluyente de muestra (con tampón fosfato) y 5 µL de las muestras y de los controles (control positivo, suero *cut off* y control negativo) en los pocillos correspondientes. Tras incubar durante 45 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ se lavaron los pocillos, se añadieron 100 µL de conjugado IgG, que contenía globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa y se volvió a incubar durante 30 minutos. Posteriormente se volvió a lavar y se añadieron 100 µL de solución de sustrato. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente protegida de la luz se añadieron 50 µL de solución de parada. La valoración de la reacción se realizó espectrofotométricamente a 450/620 nm antes de 1 hora de acabado el ensayo.

Se consideraron positivas aquellas muestras con un índice de anticuerpos mayor de 11.

El ensayo tuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 82%, con un coeficiente de variación intraensayo e interensayo del 1,33 y del 1,30 % respectivamente.

Los resultados obtenidos finalmente fueron cualitativos: positivo o negativo.

3.18.5. Rubéola

Se analizó la respuesta humoral al virus de la rubéola mediante el ensayo comercial RubG-ReadyPack para Advia Centaur Immunoassay System (Bayer HealthCare LLC, Europa), utilizado en la rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona.

Es un ensayo automatizado de ELISA tipo sándwich que utiliza la tecnología quimioluminométrica directa para detectar IgG contra el antígeno del virus de la rubéola inactivado, cepa HPV 77.

Los resultados se obtuvieron en UI/mL, con un rango de valores de 0,2-500 UI/mL. Las muestras con un valor calculado inferior a 5,0 UI/mL se consideraron negativas para los anticuerpos IgG anti-rubéola, mientras que se consideraron positivas aquellas con valores iguales o superiores a 10 UI/mL.

El ensayo tenía una sensibilidad relativa inicial del 99,4% y especificidad relativa inicial del 98,8%.

3.18.6. Sarampión

Se analizó la respuesta humoral al virus del sarampión mediante el kit comercial de ELISA para detección de IgG anti-sarampión utilizado en la rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona (Vircell microbiologists, Granada, Spain).

Brevemente, se colocaron en una placa de 96 pocillos recubiertos con antígenos del virus del sarampión cepa Edmonston, 100 µL de diluyente de muestra (con tampón fosfato) y 5 µL de las muestras y de los controles (control positivo, suero *cut off* y control negativo) en los pocillos correspondientes. Tras incubar durante 45 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ se lavaron los pocillos, se añadieron 100 µL de conjugado IgG, que contenía globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa y se volvió a incubar durante 30 minutos. Posteriormente se volvió a lavar y se añadieron 100 µL de solución de sustrato. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente protegida de la luz se añadieron 50 µL de solución de parada. La valoración de la reacción se realizó espectrofotométricamente a 450/620 nm antes de 1 hora de acabado el ensayo.

Se consideraron positivas aquellas muestras con un índice de anticuerpos mayor de 11.

El ensayo tenía una sensibilidad del 99% y una especificidad del 92%, con un coeficiente de variación intraensayo e interensayo del 1,55 y del 1,59 % respectivamente.

Los resultados obtenidos finalmente fueron cualitativos: positivo o negativo.

3.18.7. Neumococo

Se analizaron las muestras obtenidas en el mes 0, mes 3 (1 mes tras la vacunación o placebo correspondiente a neumococo), mes 12 y mes 18.

Los niveles totales de IgG específica para *Streptococcus pneumoniae* se determinaron mediante un ensayo de ELISA basado en el método descrito por Metzger y colaboradores (763),

pero modificado usando la vacuna neumocócica como antígeno, según se describió por Siber y colaboradores (764). Esta técnica ha sido ampliamente descrita (765).

Debido a que la vacuna neumocócica polivalente puede estar contaminada con polisacáridos de la pared celular no específicos, los anticuerpos detectados mediante este ensayo no son necesariamente protectivos contra la infección neumocócica (766) (sin embargo, como el motivo del presente estudio era investigar la capacidad de los pacientes para responder frente a los antígenos, no se consideró relevante).

Los resultados de las IgG totales antineumocócico se expresaron como unidades arbitrarias usando un suero de referencia de 2240 U/mL calibrado contra una preparación neumocócica de referencia, etiquetada PN-A, con el valor asignado de 70 U de IgG antineumocócico/mL del *European Quality Scheme* para anticuerpos específicos (Oxfordshire Health Authority, John Radcliffe Hospital; Oxford, UK), donada gentilmente por el Dr. M.J. Rodrigo (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España).

Para la IgG total específica, la mínima cantidad de anticuerpo detectable con el ensayo utilizado fue de 0,11 U/mL. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 7,6 y 10,5% respectivamente.

La especificidad de los anticuerpos detectados a la vacuna se había demostrado por experimentos de inhibición, en los que concentraciones crecientes de vacuna neumocócica (rango de 0 a 80 µg/mL) se añadieron a dos compuestos de suero con concentraciones altas (9250 U/mL) y bajas (150 U/mL) de IgG específica antineumocócica, observando una competición efectiva para la unión al anticuerpo con los polisacáridos neumocócicos.

El criterio para considerar a un paciente respondedor con los IgG específicos se ha descrito ampliamente (765). Brevemente, un respondedor se definió como un individuo que mostró un aumento en sus títulos >395 U/mL, $0,350 A_{450}$ unidades de IgG específica antineumocócica. Estos valores corresponden al límite inferior del intervalo de probabilidad del 90% de la transformación logarítmica de los títulos de IgG postinmunización del grupo control. También se consideró respondedor el que aumenta los títulos en más de 4 veces tras la vacunación. Valores basales superiores a 645 U/mL también se consideraron positivos.

3.18.8. Tétanos

Se analizó la respuesta humoral a tétanos mediante el kit comercial de ELISA para detección de IgG anti-toxoide tetánico utilizado en la rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona (Genzyme diagnostics, Virotech, Rüsselsheim, Alemania).

Brevemente, se colocaron en los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos recubiertos con antígeno liofilizado de toxoide tetánico, 100 µL de diluyente de muestra (con tampón fosfato) y 1 µL de las muestras, de los controles (control positivo y control negativo) y de los sueros patrón para elaborar la curva patrón. Tras incubar durante 30 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ se lavaron los pocillos, se añadieron 100 µL de conjugado IgG, que contenían globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa y se volvió a incubar durante 30 minutos. Posteriormente se volvió a lavar y se añadieron 100 µL de solución de sustrato. Tras 30 minutos de incubación protegida de la luz se añadieron 50 µL de solución de parada. La valoración de la reacción se realizó espectrofotométricamente a 450/620 nm antes de 1 hora de acabado el ensayo.

Con ayuda de los sueros patrón incluidos se elaboró una curva patrón para calcular el contenido de anticuerpos IgG contra el toxoide tetánico existente en el suero.

De acuerdo con las normas de la OMS, las concentraciones de anticuerpos contra el toxoide tetánico se expresaron en unidades internacionales (UI/mL). Si el nivel de anticuerpos IgG era superior a 0,1 UI/mL se consideró que existía protección inmunitaria o protección inmunitaria segura (767).

Los resultados obtenidos finalmente fueron cuantitativos (UI/mL) con un límite inferior de 0,01 UI/mL.

3.18.9. Difteria

Se analizó la respuesta humoral a difteria mediante el kit comercial de ELISA para detección de IgG anti-toxina diftérica utilizado en la rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona (Genzyme diagnostics, Virotech, Rüsselsheim, Alemania).

Brevemente, se colocaron en los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos recubiertos con antígeno liofilizado de toxina diftérica, 100 μ L de diluyente de muestra (con tampón fosfato) y 1 μ L de las muestras, de los controles (control positivo y control negativo) y de los sueros patrón para elaborar la curva patrón. Tras incubar durante 30 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ se lavaron los pocillos, se añadieron 100 μ L de conjugado IgG, que contenía globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa y se volvió a incubar durante 30 minutos. Posteriormente se volvió a lavar y se añadieron 100 μ L de solución de sustrato. Tras 30 minutos de incubación protegida de la luz se añadieron 50 μ L de solución de parada. La valoración de la reacción se realizó espectrofotométricamente a 450/620 nm antes de 1 hora de acabado el ensayo.

Con ayuda de los sueros patrón incluidos se elaboró una curva patrón para calcular el contenido de anticuerpos IgG contra la toxina diftérica existente en el suero.

De acuerdo con las normas de la OMS, las concentraciones de anticuerpos contra difteria se expresaron en unidades internacionales (UI/mL). Si el nivel de anticuerpos IgG fue superior a 0,1 UI/mL se consideró que existía protección inmunitaria suficiente (767).

Los resultados obtenidos finalmente fueron cuantitativos (UI/mL), con un límite inferior de 0,01 UI/mL.

3.19. ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR A ANTÍGENOS VACUNALES

La respuesta celular a los diferentes antígenos vacunales del estudio se determinó, fundamentalmente, mediante el análisis de la respuesta específica CD8^+ frente a éstos a través de técnicas de ELISPOT y AMPLISPOT de forma trimestral (meses 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18).

Para analizar los cambios en la respuesta vacunal a lo largo del periodo de estudio se calculó el cociente o razón de los títulos, mediante el cociente de los títulos entre los dos meses a valorar.

3.19.1. Medición de respuesta celular mediante ELISPOT

Para la técnica del ELISPOT se procedió igual que en el **apartado 3.12**. Por pasos:

- Se utilizaron placas PVDF de 96-pocillos (MAIP S 45; Millipore, Bedford, MA) sensibilizadas con 15 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti-IFN-γ mAb 1-D1K (Mabtech; Stockolm, Sweden) y bloqueadas 3 horas con RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS).

- Las CMSP se resuspendieron en medio libre de proteínas (X-VIVO 10, Biowhitacker, Maryland).

- Se cultivaron estas células por duplicado en concentración de 2×10^5 células/pocillo en las placas comentadas en presencia de controles negativo (CMSP sin antígeno, con medio solo), positivo (conjunto de péptidos PHA y CEF) y de los distintos antígenos vacunales durante 18 horas a 37°C, 5% CO₂.

- Los antígenos vacunales utilizados, que se diluyeron para aplicar al cultivo con R10 para conseguir una concentración final entre 1-5 µg/mL, y que se añadieron en cantidad de 50 µL de la dilución, fueron (**Tabla M.3.4**):

- VHA inactivado, cepa pHM175 (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/12.
- VHA recombinante que contiene la región inmunodominante P2C-P3A del virus (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.
- VHA recombinante que contiene la región inmunodominante VP1-P2A del virus (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.
- VHA recombinante que contiene la región inmunodominante VP3 del virus (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.
- HBsAg recombinante (región S) (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.

Tabla M.3.4. Características de los métodos de medición de la respuesta celular a los antígenos vacunales. Se muestran el método y el tipo de antígeno utilizado en el ensayo. VHA: Virus hepatitis A; VHB: Virus hepatitis B; VVZ: Virus varicela zoster

Agente	Método	Antígeno utilizado
Virus hepatitis A	ELISPOT	VHA inactivado, cepa pHM175 (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
	AMPLISPOT	VHA recombinante que contiene la región inmunodominante P2C-P3A del virus (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
		VHA recombinante que contiene la región inmunodominante VP1-P2A del virus (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
		VHA recombinante que contiene la región inmunodominante VP3 del virus (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
Virus hepatitis B	ELISPOT	Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B recombinante (región S) (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
	AMPLISPOT	EEUU)
Gripe	ELISPOT	Virus Influenza A inactivado, cepa A/Taiwán/1/86 (H1N1) (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
	AMPLISPOT	Virus Influenza A inactivado, cepa A/Shangdong/9/93 (H3N2) (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
		Extracto del virus de la gripe 6A 255 H1 y extracto del virus de la gripe 6A 368 H3 preparados según los métodos estándar del laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic. Cortesía del Dr Tomás Pumarola
Varicela	ELISPOT	Extracto del VVZ obtenido mediante cultivo de la línea celular MRC-5 y preparado según los métodos estándar del laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic. Cortesía del Dr Tomás Pumarola
	AMPLISPOT	métodos estándar del laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic. Cortesía del Dr Tomás Pumarola
		Concentrado de antígeno del VVZ cepa VZ-10 inactivado (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
Parotiditis	ELISPOT	Concentrado de antígeno grado 2 del virus parotiditis cepa Enders inactivado (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
	AMPLISPOT	ME, EEUU)
Sarampión	ELISPOT	Concentrado de antígeno del virus del sarampión cepa Edmonston inactivado y parcialmente purificado (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
	AMPLISPOT	purificado (Biodesign, Saco, ME, EEUU)
Neumococo	ELISPOT	Vacuna antineumocócica polisacarídica (Pneumo 23 [®]) (Sanofi Pasteur)
	AMPLISPOT	
Tétanos	ELISPOT	Toxoides tetánico purificado, 20 Lf/mL (Sanofi Diagnostics Pasteur)
	AMPLISPOT	
Control positivo	ELISPOT	Pool de 32 péptidos CEF (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, MD, EEUU) en concentración 10 µg/mL, que contienen epítopos restringidos para HLA tipo I de CMV, Virus Epstein Barr y gripe
	AMPLISPOT	

- Virus Influenza A inactivado, cepa A/Taiwán/1/86 (H1N1) (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.
- Virus Influenza A inactivado, cepa A/Shangdong/9/93 (H3N2) (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.
- Extracto del virus de la gripe 6A 255 H1 en dilución 1/5. Se trata de un extracto preparado según los métodos estándar del laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic. Brevemente, se obtiene virus de la gripe mediante cultivo y se inactiva por calor a 56°C durante 30 minutos.

Cortesía del Dr Tomás Pumarola.

- Extracto del virus de la gripe 6A 368 H3 en dilución 1/5. Se trata de un extracto preparado según los métodos estándar del laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic. Brevemente, se obtiene virus de la gripe mediante cultivo y se inactiva por calor a 56°C durante 30 minutos.

Cortesía del Dr Tomás Pumarola.

- Extracto del VVZ en dilución 1/5. Se trata de un extracto preparado según los métodos estándar del laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic. Brevemente, se obtiene virus varicela zoster mediante cultivo de la línea celular MRC-5 y se inactiva por calor a 56°C durante 30 minutos.

Cortesía del Dr Tomás Pumarola.

- Concentrado de antígeno del VVZ cepa VZ-10 inactivado (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.
- Concentrado de antígeno grado 2 del virus parotiditis cepa Enders inactivado (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.
- Concentrado de antígeno del virus del sarampión cepa Edmonston inactivado y parcialmente purificado (Biodesign, Saco, ME, EEUU) en dilución 1/125.
- Vacuna antineumocócica polisacáridica (Pneumo 23[®]) (Sanofi Pasteur): en concentración 200 ng/mL.
- Toxoide tetánico purificado, 20 Lf/mL (Sanofi Diagnostics Pasteur), en dilución 1/100.
- Un pool de 32 péptidos de control positivo CEF (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Germantown, MD, EEUU) en concentración 10 µg/mL, que contienen epitopos restringidos para HLA tipo I de CMV, Virus Epstein Barr y gripe (768).

- Tras un cultivo de 18-24 horas se descartaron las células de los pocillos.

- Se lavó la placa con PBS más 0,05% de Tween 20.
- Se añadieron durante 3 horas 50 µl de 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ 7-B6-1 biotinilado (Mabtech).
- Se lavó la placa con PBS más 0.05% de Tween 20.
- Se añadió 1:1000 de la dilución del conjugado fosfatasa alcalina-estreptavidina (Mabtech).
- Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa.
- Se añadieron 100 µl del sustrato cromogénico fosfatas alcalina (Bio Rad Labs., Hercules, CA) diluido 1:25.
- Treinta minutos más tarde, la reacción colorimétrica se terminaba mediante lavado de la placa con agua corriente. Posteriormente se secaba hasta proceder a su lectura.

Las SFC se contaron con la ayuda del lector automatizado AID ELISPOT reader (Autoimmun Diagnostica GmHb, Germany).

Se sustrajeron de los resultados obtenidos el el *background*. La frecuencia de células formadoras de *spots* se expresó con relación a 10^6 CMSP para cada muestra evaluada. Se consideró una respuesta positiva cuando el resultado fue superior a 50 SFC/ 10^6 y fue 2 veces superior al *background*.

En el caso del VHA, en el que se valoró la respuesta a 3 antígenos diferentes, el resultado se obtuvo de la suma de la respuesta a los diferentes antígenos. Por otro lado, las respuestas a gripe y a VVZ se realizaron con dos extractos antigénicos equivalentes en cada caso. El resultado final se obtuvo de la media de la respuesta a éstos.

El análisis de la respuesta vacunal celular se realizó considerando las variables cuantitativas, con el valor en SFC/ 10^6 CMSP, y también, tras transformar la variable en cualitativa (positivo/negativo), se compararon la proporción de pacientes positivos.

3.19.2. Medición de respuesta celular mediante AMPLISPOT

La técnica del AMPLISPOT (769) pretende aumentar la sensibilidad del ELISPOT mediante la amplificación de la producción de IFN- γ tras añadir IL-7 e IL-15 al cultivo de las CMSP + antígenos. Los procedimientos y los antígenos utilizados son los mismos que con ELISPOT, añadiendo a los pocillos 50 μ l de medio R10/IL7+IL15 a una dilución inicial de 4 ng/ml, junto los 50 μ l del extracto de la vacuna correspondiente. Los resultados son similares a los de la medición con ELISPOT pero con mayor número de *spots* (y de *background*).

3.19.3. Problemas de la interpretación de la respuesta celular

Globalmente, los resultados que encontramos al analizar las respuestas celulares se interpretaron con precaución por varios motivos técnicos:

- Valores nulos: Con una frecuencia mayor de la esperada se obtuvieron respuestas nulas, sobre todo en el caso del AMPLISPOT y con determinados antígenos. Los motivos de los resultados nulos fueron:

- Ausencia de respuesta al control positivo, lo que normalmente indica problemas de viabilidad celular asociados a la criopreservación o a la falta de células presentadoras de antígeno.
- Respuesta generalizada de gran intensidad que hacía imposible la interpretación. Indican una producción generalizada de IFN- γ que puede proceder de células T activadas que segregan IFN- γ de forma espontánea o de otros tipos celulares (células NK,..).

- Valores cero: Cuando el *background* supera la respuesta obtenida con la estimulación del antígeno específico. Los motivos por los que se puede obtener un valor 0 son varios y de diferente implicación:

- *Background* anormalmente mayor que la respuesta al antígeno específico, reflejando una respuesta generalizada inespecífica.
- Falta de células específicas frente al antígeno específico que segreguen

IFN- γ .

- Porque la respuesta se hubiese dado precozmente y hubiese una contracción posterior, de forma que en el momento de la determinación (30 días después de la vacunación) no se detectaría.
 - Porque la respuesta celular no se vehiculizase mediante la producción de IFN- γ sino otras citocinas (770).
- Problemas con el antígeno utilizado:
- Toxicidad.
 - Antígeno no completo que no es reconocido con normalidad.

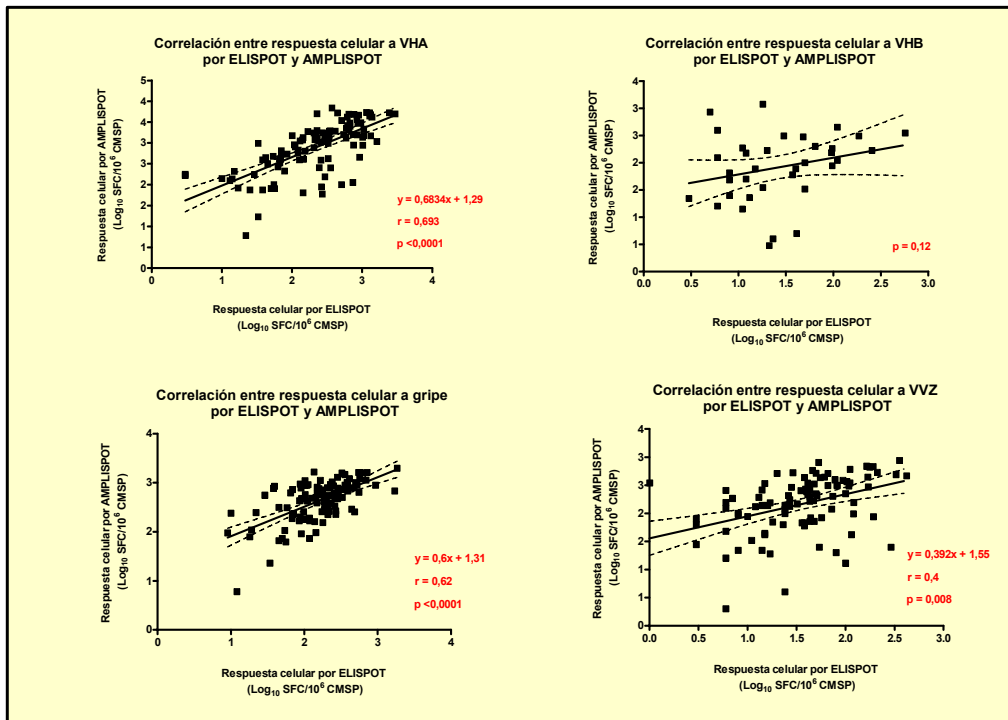


Figura M.3.6. Correlaciones entre la respuesta celular medida por ELISPOT y por AMPLISPOT a diferentes antígenos vacunales. Se muestra la correlación de todas las mediciones realizadas (VHA: Virus de la hepatitis A; VHB: Virus de la hepatitis B; VVZ: Virus Varicela Zoster; SFC: *Spot forming cells* (célula formadora de spots); CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

• Falta de correlación entre respuestas celulares: Aunque analizadas globalmente (todas las determinaciones durante el periodo de estudio) las respuestas para cada antígeno por ELISPOT y AMPLISPOT tuvieron una buena correlación (Figuras), para cada determinación puntual y en determinados antígenos se halló una baja correlación entre ellas, sugiriendo

problemas técnicos sobre todo con el AMPLISPOT, que presentó un gran número de valores nulos o ceros (**Figuras M.3.6. y M.3.7.**).

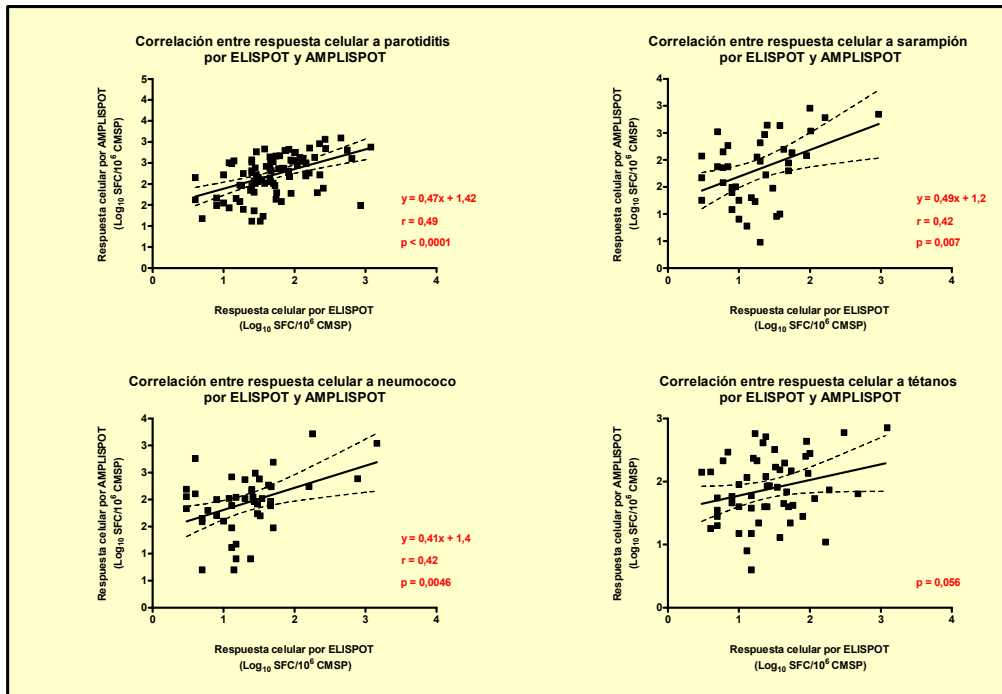


Figura M.3.7. Correlaciones entre la respuesta celular medida por ELISPOT y por AMPLISPOT a diferentes antígenos vacunales. Se muestra la correlación de todas las mediciones realizadas (SFC: *Spot forming cells* (célula formadora de spots); CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

3.20. TIPAJE HLA DE ALTA RESOLUCIÓN

Se realizó el tipaje HLA de clase I de cada paciente para poder seleccionar los distintos péptidos (HLA restrictos) del VIH capaces de ser reconocidos por las células CD8⁺ específicas siguiendo los protocolos estándar. Brevemente, se evalúa mediante PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotides, RELI Dynal, Madrid) el ADN genómico de células mononucleares o polinucleares de sangre periférica y/o de las líneas de células B transformadas por el virus de Epstein-Barr, extraído mediante el reactivo QIAmp Blood Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, EEUU). Empleando cebadores específicos de secuencia se determinan los distintos alelos de clase I. La definición de los alelos de los genes de clase I se realizó automáticamente mediante el software “RELI SSO Pattern Matching Software”, siendo posteriormente supervisado manualmente.

3.21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron los métodos necesarios de estadística descriptiva. Se comprobó la normalidad de cada una de las variables en cada una de las poblaciones mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov previamente a realizar cualquier análisis, utilizando en función de ello pruebas paramétricas o no paramétricas.

Las variables continuas se describieron con media y desviación típica, o con mediana y rango intercuartílico en caso de no presentar una distribución normal o con varianza diferente (fundamentalmente en el caso de las respuestas vacunales, tanto humorales como celulares). Para las variables cualitativas se presentaron las frecuencias y porcentajes en cada categoría.

Para comparar si existieron variaciones intragrupo, en las variables cuantitativas se utilizó la prueba de t de Student para medidas repetidas, o la prueba de Wilcoxon para datos apareados en caso de que las distribuciones no fuesen normales o las varianzas no fuesen similares. En el caso de variables cualitativas se utilizó la χ^2 (con corrección de Yates o test de Fisher cuando fue necesario), o el test de Mc Nemar para las distribuciones no normales.

Se compararon los valores de los diferentes grupos en el momento basal, y las diferencias que se obtuvieron en cada grupo en cada uno de los tiempos de medida de cada variable (p.ej. entre el mes 3 y el mes 0) mediante una t de Student, o la prueba de Mann-Whitney para comparar las variables en caso de que no fuesen normales o que las varianzas no fueran similares. En el caso de proporciones se utilizó una χ^2 (con corrección de Yates o test de Fisher cuando fue necesario) paramétrica o no paramétrica.

Para las variables cuantitativas que tenían 5 o más determinaciones por paciente en un periodo determinado de estudio, se calculó el área bajo la curva (AUC) neta para evaluar su evolución y comparar entre grupos mediante una t de Student, o la prueba de Mann-Whitney según la normalidad de la distribución.

Para valorar la correlación entre variables se utilizó el análisis de correlación del coeficiente de Pearson, o el de Spearman en el caso de pruebas no paramétricas.

Para valorar la llegada a los criterios de valoración se utilizó el método de Kaplan-Meier para el estudio de las curvas de aparición de los sucesos.

El umbral global de significación que se utilizó fue $\alpha = 5\%$.

Para realizar el análisis estadístico se utilizaron los Software SPSS 11 para Windows versión 11.0.1. (SPSS, Inc.), Prism 4 para Windows versión 4.0 (Graph Pad Software, Inc.), Statistica versión 6.1. (StatSoft, Inc, Tulsa OK) y Epi Info 6 versión 6.04a (CDC, Atlanta, EEUU y OMS, Suiza).

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE UN CALENDARIO VACUNAL SOBRE LA CARGA VIRAL Y EL SISTEMA INMUNITARIO EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH CON TARGA DURANTE EL TRATAMIENTO Y TRAS SU INTERRUPCIÓN

1.1. GENERALIDADES DEL ESTUDIO

La inclusión de los pacientes se inició el 2 de Abril del 2003 y finalizó el 1 de Octubre del 2003 con la inclusión del último paciente. Se incluyeron un total de 26 pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión.

Hubo una pérdida de seguimiento de un paciente (del GP) en el mes 9 por *exitus*, por motivos sin relación con el estudio ni con la infección por el VIH (muerte accidental), y que fue comunicada a las autoridades sanitarias pertinentes. El resto de los pacientes cumplieron el seguimiento y las intervenciones descritas en el estudio.

Ninguno de los pacientes presentó efectos secundarios notificables a la vacuna o al placebo. Como única incidencia adicional cabe comentar que uno de los pacientes en el GV presentó una infección aguda por el VHA en el mes 2, antes de recibir la vacuna, por lo que se retrasó temporalmente la aplicación del protocolo vacunal durante 3 meses, hasta la normalización de la función hepatocelular.

Los antecedentes vacunales de los pacientes, que no se encontraban entre los criterios de inclusión, no se pudieron recoger por anamnesis de forma correcta, ya que la mayoría de los pacientes no recordaban con exactitud si se habían vacunado con anterioridad ni qué tipo de vacuna habían recibido. La mayoría de pacientes tampoco tenía un carné vacunal de registro.

1.2. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES

1.2.1. Características demográficas y epidemiológicas

En general no existían diferencias en las características basales entre los GV y GP (Tabla R.1.1.).

Tabla R.1.1. Características basales de los pacientes globalmente y por grupos. Se presentan la media y la desviación típica para las variables cuantitativas y el número de pacientes y el porcentaje que supone respecto al grupo para las cualitativas (GP: Grupo placebo; GV: Grupo vacunado; VHC: Virus hepatitis C; ADVP: Adictos a drogas por vía parenteral; TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad; CV: Carga viral). * Test exacto de Fisher

Variable	Total	GP (n = 13)	GV (n = 13)	P
Edad (años)	39,81	43,09	36,53	0,06
Sexo (Varones:Mujeres)	21:5	10:3	11:2	1*
VHC +, n (%)	4 (15,38)	4 (30,77)	0 (0)	0,096*
Factor de riesgo, n (%)				
Homosexual	14 (53,85)	5 (38,46)	9 (69,23)	0,24
Heterosexual	9 (34,61)	5 (38,46)	4 (30,77)	1*
ADVP	3 (11,54)	3 (23,08)	0 (0)	0,22*
Duración conocida de la infección (días)	2321,6 ± 1743,77	2519,69 ± 1792,69	2107,0 ± 1741,22	0,56
Duración TARGA (días)	1336,6 ± 1044,92	1661,31 ± 1173,68	984,83 ± 787,33	0,107
Había recibido ≥ 3 pautas TARGA previas, n (%)	10 (38,46)	6 (46,15)	4 (30,77)	0,69*
Había recibido mono o biterapia previas, n (%)	4 (15,38)	2 (15,38)	2 (15,38)	1*
CV más alta (log ₁₀ copias/mL)	4,87	4,85	4,88	0,92

Los 26 pacientes incluidos tenían una media de edad de 39,81 años (rango 24,74-58,24). Si bien no existían diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a la edad entre los dos grupos, el GV tuvo una media de edad menor ($36,53 \pm 8,01$ años; mediana 37,98 años) que el GP ($43,09 \pm 8,94$ años; mediana 39,57 años) con tendencia a la significación estadística ($p = 0,06$) (Figura R.1.1.).

Se incluyeron un total de 21 varones y 5 mujeres, distribuidos de forma uniforme entre los grupos (10/3 en GP y 11/2 en GV respectivamente; $p = 1$) (Figura R.1.1.).

De los pacientes incluidos en el estudio, 4 tenían serología positiva para el VHC, todos incluidos en el GP (comparación con el GV, $p = 0,096$).

1.2.2. Características generales relacionadas con la infección por el VIH

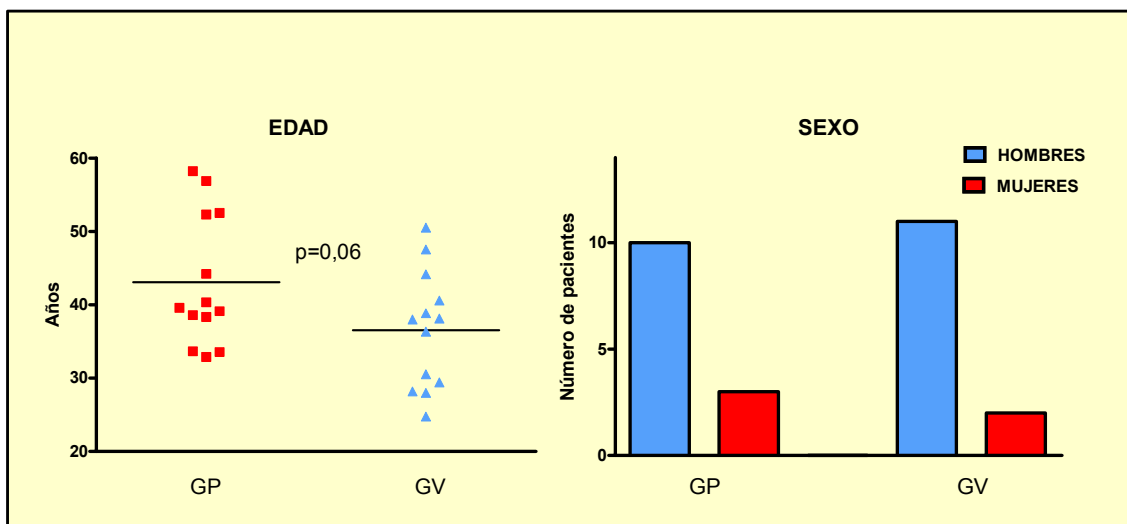


Figura R.1.1. Análisis de las variables edad y sexo en GP (Grupo Placebo) y GV (Grupo Vacunado). Como se observa, no existían diferencias significativas entre los grupos.

Por lo que respecta al factor de riesgo para la adquisición de la infección por VIH, fue mayoritariamente de transmisión sexual (23, 14 de forma homosexual y 9 heterosexual), distribuidos uniformemente entre los grupos. Otros tres pacientes eran ex-ADVP, que aleatoriamente todos fueron incluidos en el GP (Figura R.1.2.).

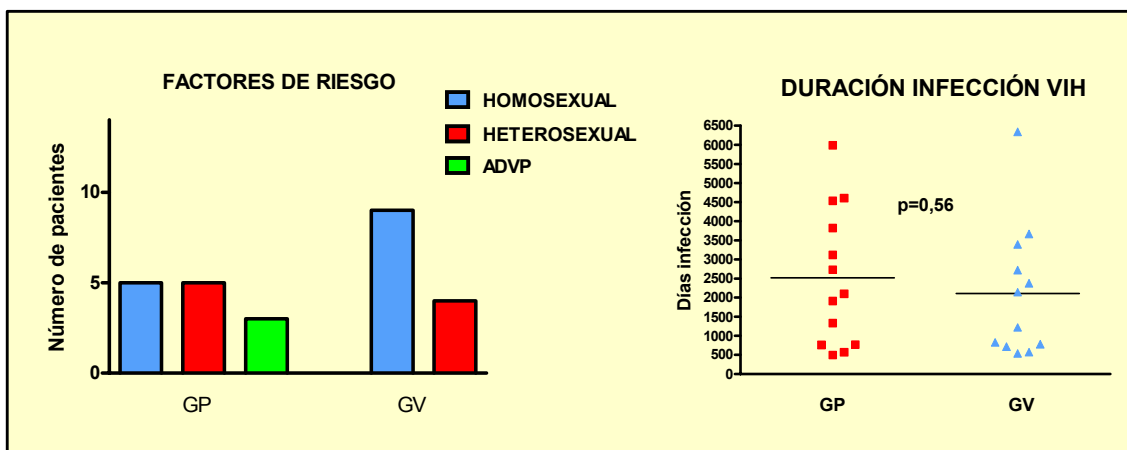


Figura R.1.2. Factores de riesgo para adquisición de la infección por el VIH y días de duración conocidos de la infección (en función de la fecha de la primera serología). Los pacientes estaban distribuidos uniformemente entre los grupos, excepto en el caso de los pacientes adictos a drogas por vías parenteral (ADVP), todos ($n = 3$) incluidos en el GP (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo vacunado)

El tiempo estimado de duración de la infección por el VIH, calculado a partir de la fecha de la primera serología positiva, era de $2321,6 \pm 1743,77$ días, sin diferencias entre los grupos ($2519,69 \pm 1792,69$ para GP (mediana 2100 días) y $2107,0 \pm 1741,22$ (mediana 1682,5 días) para GV respectivamente, $p = 0,56$) (**Figura R.1.2.**).

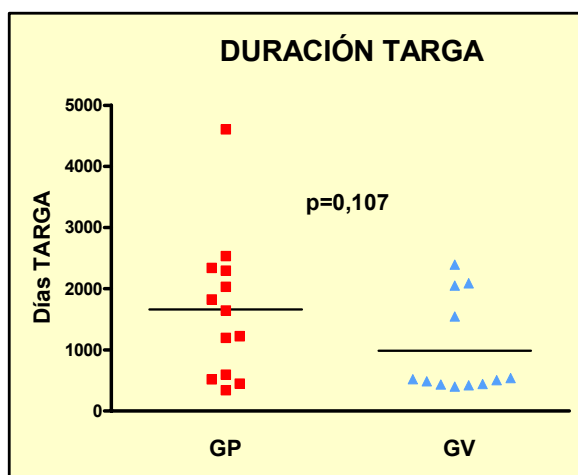


Figura R.1.3. Duración del TARGA previa a la inclusión en el estudio. Aunque la media de días de TARGA en el GP era más alta, las diferencias no fueron significativas (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo vacunado; TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad)

Como criterio de inclusión necesario, todos los pacientes estaban recibiendo TARGA en el momento del estudio. La media de duración del TARGA era de $1336,6 \pm 1044,92$ días ($1661,31$ días en el GP y $984,83$ días en el GV, $p = 0,107$) (**Figura R.1.3.**). Todos habían iniciado el tratamiento durante la fase crónica, no había ningún paciente que hubiese iniciado el TARGA durante la primoinfección. Todos los pacientes recibían 2 ITIAN + (1 ITINAN ó 1 IP), excepto uno en el GP que estaba en tratamiento con 3 ITIAN, aunque había un total de 12 pautas diferentes (**Figura R.1.4.**). Por lo que respecta al número de pautas previas a la actual en el momento de la inclusión, tenían un rango de 1 a 7 pautas. El número de pacientes que había recibido 3 pautas o más era de 10, distribuido uniformemente entre grupos (6 en GP y 4 en GV respectivamente, $p=0,69$). De los pacientes que habían recibido pautas previas, 2 en cada grupo habían recibido alguna pauta con mono o biterapia ($p = 1$), que fueron aquellos pacientes con mayor tiempo de infección conocido.

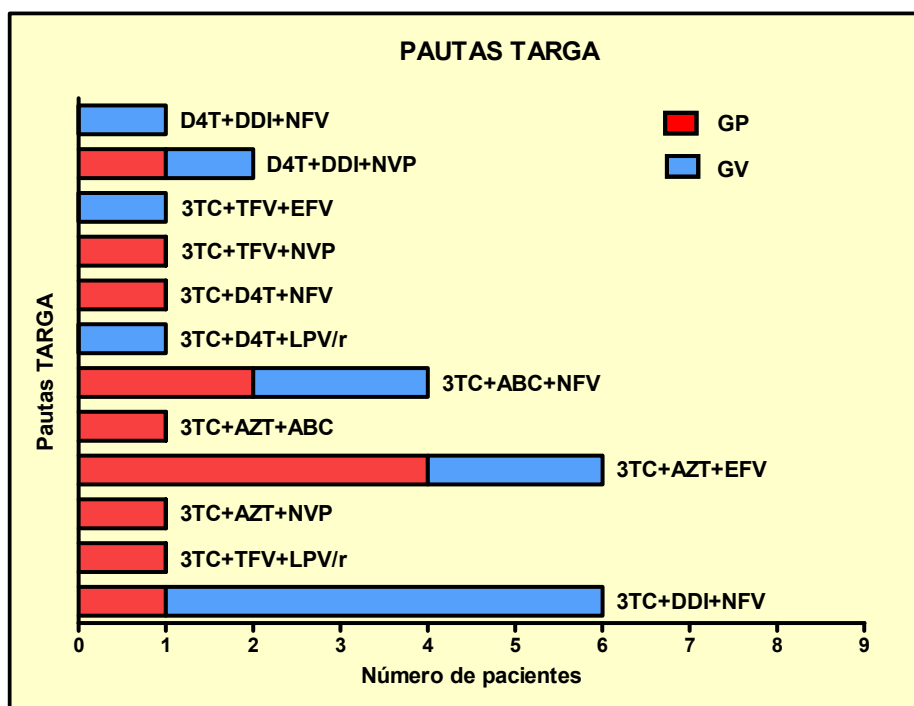


Figura R.1.4. Pautas de TARGA que realizaban los pacientes en el momento de la inclusión. Se contabilizaron hasta 12 pautas diferentes, sin diferencias significativas entre grupos (GP: Grupo placebo; GV: Grupo vacunado; D4T: Estavudina; DDI: Didanosina; NfV: Nelfinavir; NVP: Nevirapina; 3TC: Lamivudina; TFV: Tenofovir; EFV: Efavirenz; LPV/r: Lopinavir/ritonavir; ABC: Abacavir).

Los pacientes que tenían mayor tiempo de evolución de la infección presentaban una correlación positiva y significativa con el tiempo de duración del TARGA ($p < 0,001$), el número de pautas de TARGA ($p < 0,001$), y habían recibido mono o biterapia con más probabilidad ($p = 0,01$) (**Figura R.1.5.**).

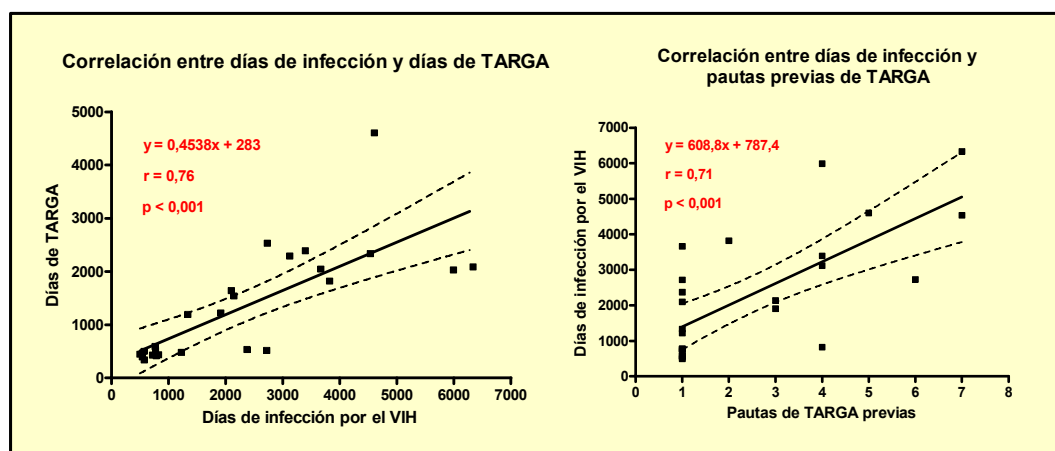


Figura R.1.5. Correlación entre los días de infección estimada por VIH y los días de TARGA y las pautas de TARGA previas recibidas (TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad)

1.2.3. Características virológicas

Todos los pacientes eran portadores de VIH tipo 1. La media de la CV más alta antes de cualquier tratamiento era de 4,87 log (4,85 y 4,88 para GP y GV respectivamente, $p = 0.92$). Sin embargo, cabe decir que existían pacientes que habían iniciado TARGA antes de disponer de las técnicas de cuantificación de ARN plasmático viral, por lo que se tomó el valor de CV más alta que tuviesen durante el TARGA o bien si se había suspendido temporalmente en algún momento.

Respecto a resistencias previas, sólo uno de los pacientes incluidos en el estudio, del GV, tenía realizado un genotipado con anterioridad, sin presentar mutaciones de resistencia, sino únicamente polimorfismos, tanto en el gen de la retrotranscriptasa (L214F) como el de la proteasa (L63P). Sin embargo, en los pacientes que tenían más de 1 pauta previa, aunque el principal motivo de cambio fue por efectos secundarios, en 3 casos fue por fracaso virológico y posible aparición de resistencias asociadas a monoterapia-biterapia previas. En cualquier caso, la pauta actual era una pauta que mantenía al paciente indetectable al menos en los últimos 6 meses, según los criterios de inclusión en el estudio.

1.2.4. Características inmunológicas

1.2.4.1. Subpoblaciones linfocitarias

La media de linfocitos T CD4⁺ nadir de los 26 pacientes incluidos en el estudio era de $450 \pm 111,65$ linfocitos T CD4⁺/mm³ o un $24,20 \pm 7,27\%$ del total de los linfocitos. Por grupos, el GP tenía un nadir de $456,38 \pm 119,79$ células/mm³ ($24,22 \pm 9,32\%$), mientras que en el GV era de $443,83 \pm 107,03$ células/mm³ ($24,17 \pm 4,52\%$), sin diferencias significativas ($p = 0,785$ y $0,985$ respectivamente para el número absoluto y el porcentaje).

Los pacientes del GV presentaban basalmente un mayor porcentaje de células CD4⁺ activadas (CD4⁺CD38⁺), CD28⁺ (CD4⁺CD28⁺) y *naïve* (CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻), y una menor proporción de células CD4⁺ memoria (CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺). El resto de subpoblaciones linfocitarias no fueron significativamente diferentes basalmente entre grupos (**Tabla R.1.2.**).

Tabla R.1.2. Subpoblaciones linfocitarias T basales en el momento de inclusión en el estudio. Se presentan los valores globales y por grupo, comparando estos dos últimos. Se expresa la media y la desviación típica de la proporción de cada subpoblación

Subpoblación linfocitaria	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
CD4 ⁺ nadir				
Absolutos	450,36 ± 111,65	456,38 ± 119,79	443,83 ± 107,03	0,785
Porcentaje	24,20 ± 7,27	24,22 ± 9,32	24,17 ± 4,52	0,985
CD3 ⁺	79,10 ± 7,33	79,48 ± 7,32	78,73 ± 7,62	0,8
CD4 ⁺	38,23 ± 8,29	37,50 ± 9,99	38,96 ± 6,50	0,66
CD8 ⁺	38,97 ± 7,46	40,04 ± 8,22	37,90 ± 6,76	0,47
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,03 ± 0,45	1,02 ± 0,57	1,04 ± 0,30	0,88
CD4 ⁺ CD28 ⁺	91,82 ± 8,82	88,84 ± 10,50	94,81 ± 5,72	0,08
CD4 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	6,65 ± 7,62	9,18 ± 8,90	4,12 ± 5,29	0,09
CD4 ⁺ CD38 ⁺	44,47 ± 11,20	39,82 ± 11,79	49,12 ± 8,69	0,03
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	2,39 ± 1,44	2,67 ± 1,57	2,10 ± 1,29	0,32
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	2,21 ± 4,23	1,67 ± 0,97	2,75 ± 5,98	0,53
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	33,12 ± 11,50	27,87 ± 11,86	38,36 ± 8,69	0,01
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	31,54 ± 12,61	28,05 ± 12,04	35,04 ± 12,29	0,16
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	50,05 ± 10,60	54,33 ± 11,11	45,77 ± 8,41	0,03
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	20,46 ± 21,54	14,40 ± 11,01	26,52 ± 27,68	0,16
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	2,96 ± 2,21	2,87 ± 2,02	3,05 ± 2,46	0,84
CD8 ⁺ CD28 ⁺	51,50 ± 12,12	50,49 ± 13,76	52,50 ± 10,70	0,68
CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	35,92 ± 11,68	37,50 ± 11,27	34,35 ± 12,32	0,5
CD8 ⁺ CD38 ⁺	29,16 ± 9,63	29,50 ± 10,37	28,82 ± 9,24	0,86
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	6,28 ± 3,06	6,77 ± 3,36	5,78 ± 2,77	0,42
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	3,74 ± 5,48	3,19 ± 3,99	4,29 ± 6,78	0,62
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	53,48 ± 12,75	50,76 ± 12,91	56,21 ± 12,48	0,28
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	27,06 ± 13,26	28,36 ± 15,09	25,77 ± 11,62	0,63
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	31,33 ± 10,78	32,91 ± 10,36	29,74 ± 11,37	0,46
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	15,53 ± 21,19	10,84 ± 7,17	20,23 ± 28,93	0,27
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	10,14 ± 5,26	8,99 ± 4,79	11,30 ± 5,64	0,27

1.2.4.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación

Tabla R.1.3. Subpoblaciones linfocitarias T basales en proliferación. Se expresa la media y la desviación típica de la proporción de cada población

Subpoblación linfocitaria en proliferación	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	1,10 ± 0,53	1,15 ± 0,58	1,05 ± 0,49	0,63
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	0,65 ± 0,43	0,63 ± 0,47	0,67 ± 0,42	0,84
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	0,57 ± 0,31	0,70 ± 0,38	0,44 ± 0,16	0,03
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	0,75 ± 0,58	0,84 ± 0,67	0,67 ± 0,49	0,48
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	1,21 ± 1,08	1,53 ± 1,11	0,92 ± 1	0,16

No se hallaron diferencias en el mes 0 entre grupos respecto a las subpoblaciones linfocitarias T en proliferación, con el marcador intracelular Ki-67, excepto en la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ total, menor en el GV (Tabla R.1.3.).

Resultados

1.2.4.3. Respuestas linfoproliferativas

El estudio de las respuestas proliferativas a diferentes antígenos (mitógenos, antígenos comunes o de recuerdo y antígenos del VIH) en el momento basal no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (**Tabla R.1.4.**).

Tabla R.1.4. Respuestas linfoproliferativas basales a diferentes estímulos. Se expresa la media y la desviación típica de los índices de estimulación a cada estímulo (SI: Índice de estimulación; PHA: Fitohemaglutinina; PWM: Mitógeno Pokeweed)

Respuestas linfoproliferativas (SI)	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Mitógenos				
PHA 0,5%	24,77 ± 29,06	16,75 ± 20,60	32,07 ± 34,40	0,23
PHA 1%	9,36 ± 10,71	9,71 ± 13,02	9,03 ± 8,76	0,89
Anti-CD3	13,24 ± 13,12	10,26 ± 8,95	15,94 ± 15,98	0,33
Anti-CD3 + Anti-CD28	26,62 ± 24,51	19,60 ± 16,55	33,0 ± 29,34	0,21
PWM	19,39 ± 10,87	17,68 ± 10,39	21,25 ± 11,57	0,44
Antígenos de recuerdo				
Toxoide tetánico	4,63 ± 8,41	6,83 ± 11,19	2,22 ± 2,43	0,19
Citomegalovirus	2,30 ± 1,14	2,62 ± 1,40	1,95 ± 0,67	0,16
Antígenos del VIH				
gp160	2,02 ± 1,85	2,32 ± 2,24	1,70 ± 1,34	0,43
p24	4,03 ± 5,46	5,53 ± 6,81	2,39 ± 2,98	0,17

1.2.4.4. Respuestas celulares CD8⁺ específicas frente al VIH

Tabla R.1.5. Respuestas celulares CD8⁺ específicas frente a VIH basales. Se expresa la media y la desviación típica de las respuestas (SFC: Células Formadoras de Spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; small: pool de péptidos de gag)

Respuestas CD8 ⁺ específicas anti-VIH	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Totales				
SFC/10 ⁶ CMSP	747,26 ± 917,72	955,64 ± 1120,80	556,25 ± 677,65	0,31
Número total de péptidos	2,83 ± 2,06	3,54 ± 2,46	2,17 ± 1,40	0,11
Cociente SFC/número péptidos	250,39 ± 249,83	260,1 ± 273,40	241,5 ± 238,11	0,86
Proteínas de gag				
p24 (SFC/10 ⁶ CMSP)	624,35 ± 904,67	728,64 ± 1103,05	528,75 ± 714,06	0,61
small (SFC/10 ⁶ CMSP)	174,70 ± 264,04	236,54 ± 340,24	118 ± 163,91	0,29
p17 (SFC/10 ⁶ CMSP)	319,22 ± 554,36	453,64 ± 751,27	196 ± 258,64	0,27
gag total (SFC/10 ⁶ CMSP)	1118,26 ± 1616	1418,73 ± 2136,26	842,83 ± 949,27	0,42

Tampoco se encontraron diferencias en el momento basal entre los GP y GV en las respuestas celulares CD8⁺ específicas contra el VIH (**Tabla R.1.5.**).

Se halló una correlación positiva entre las respuestas CD8⁺ específicas y las respuestas proliferativas (mayoritariamente CD4⁺) frente a p24 en el mes 0 ($r = 0,448$, $p = 0,048$).

1.2.5. Función tímica

La media del volumen tímico entre los pacientes incluidos en el estudio fue de $6,04 \pm 3,6 \text{ cm}^3$, con un índice medio de $2,08 \pm 1,51$. Aunque ambos valores eran superiores en el GV, las diferencias no fueron significativas, con un volumen tímico de $5,73 \pm 3,48$ vs $6,38 \pm 3,85 \text{ cm}^3$ para GP y GV respectivamente ($p = 0,66$) e índices tímicos de $1,92 \pm 1,11$ y $2,25 \pm 1,21$ para GP y GV respectivamente ($p = 0,49$).

Por otro lado, el número de copias de $TREC/10^6$ CMSP medio fue de $57.350,44 \pm 38.867,39$, y fue significativamente menor en el GP comparado con el GV ($42.528,03 \pm 31.327,46$ y $72.172,85 \pm 41.107,21$ respectivamente, $p = 0,05$). Las diferencias no fueron significativas por el contrario en el caso de las copias de $TREC/\mu\text{L}$ (Tabla R.1.6. y Figura R.1.6.).

Tabla R.1.6. Características basales de los parámetros de función tímica, globalmente y por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de los diferentes parámetros. En el caso de las subpoblaciones celulares, se expresa la proporción de cada población ($TRECs$: Círculos de escisión del receptor de la célula T; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Función tímica	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Volumen tímico (cm^3)	$6,04 \pm 3,6$	$5,73 \pm 3,48$	$6,38 \pm 3,85$	0,66
Índice tímico	$2,08 \pm 1,51$	$1,92 \pm 1,11$	$2,25 \pm 1,21$	0,49
Copias $TRECs/\mu\text{L}$	$137,80 \pm 103,73$	$110,34 \pm 90,81$	$165,25 \pm 111,96$	0,24
Copias $TRECs/10^6$ CMSP	$57350,44 \pm 38867,39$	$42528,03 \pm 31327,46$	$72172,85 \pm 41107,21$	0,05
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	$33,12 \pm 11,50$	$27,87 \pm 11,86$	$38,36 \pm 8,69$	0,01
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	$53,48 \pm 12,75$	$50,76 \pm 12,91$	$56,21 \pm 12,48$	0,28

Como se había comentado para las subpoblaciones linfocitarias, la subpoblación *naïve* CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ fue significativamente menor en el GV, no así la misma subpoblación CD8⁺ (Tabla R.1.6.).

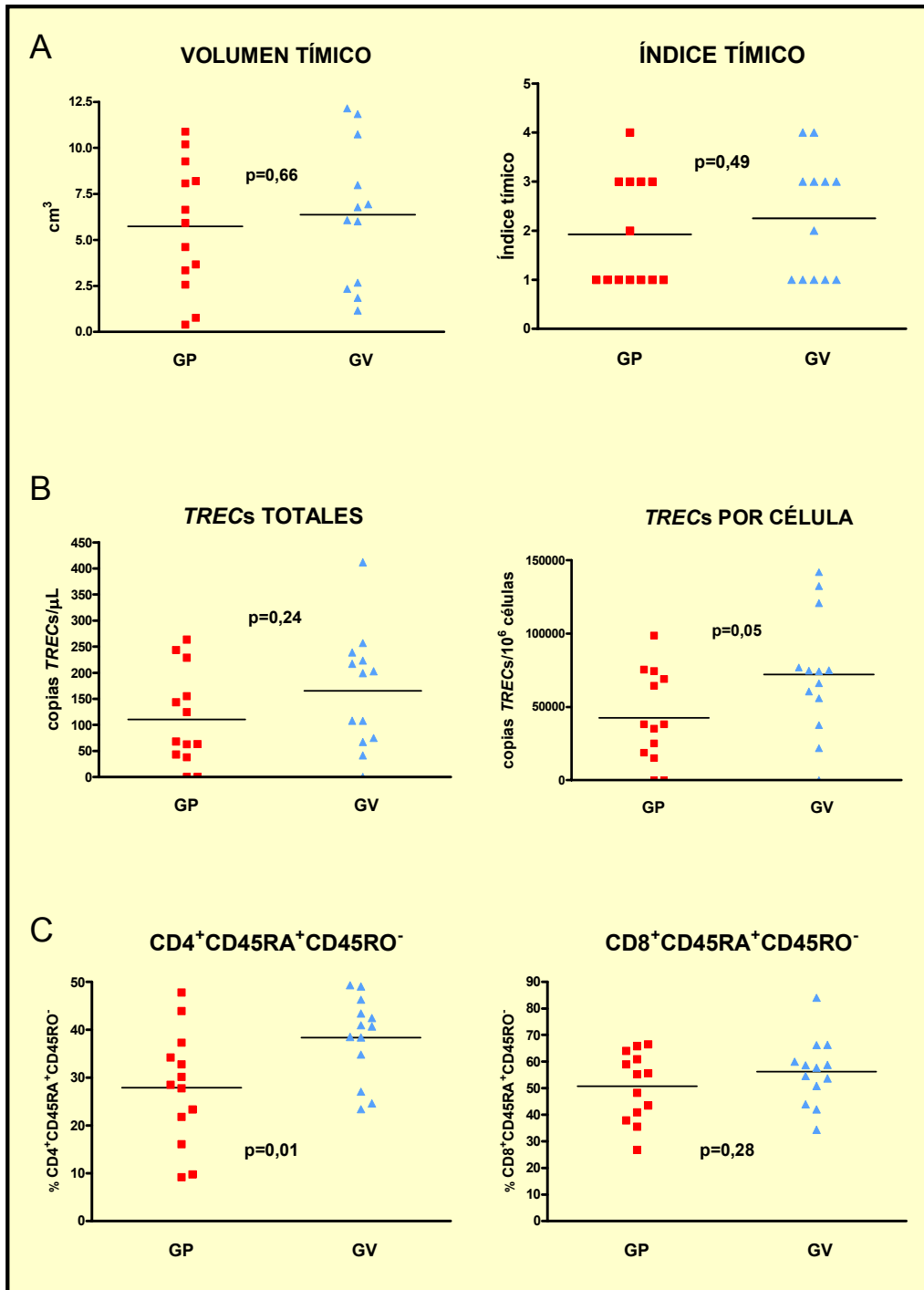


Figura R.1.6. Parámetros de función tímica basales. Los parámetros volumétricos (A), las copias de *TRECs* (B) y el marcaje fenotípico de células *naïve* (CD45RA⁺RO⁻) (C) fueron más elevados en el GV basalmente (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo vacunado; *TRECs*: Círculos de escisión del receptor de la célula T)

Al analizar la correlación entre los parámetros de función tímica y la edad en el mes 0, hallamos que el volumen en cm³ ($p < 0,001$), el índice tímico ($p = 0,002$), las copias de *TRECs*/10⁶ CMSP ($p = 0,037$) y los CD8⁺ *naïve* (CD45RA⁺CD45RO⁻ o CD45RA⁺CD62L⁺) ($p =$

0,054 y 0,026, respectivamente) presentaban correlaciones significativas. Por el contrario, las copias de *TRECs*/ μ L ($p = 0,28$) y los linfocitos $CD4^+$ *naïve* ($CD45RA^+CD45RO^-$ o $CD45RA^+CD62L^+$) ($p = 0,42$ y $0,17$, respectivamente) no presentaban correlación significativa con la edad (**Figura R.1.7.**).

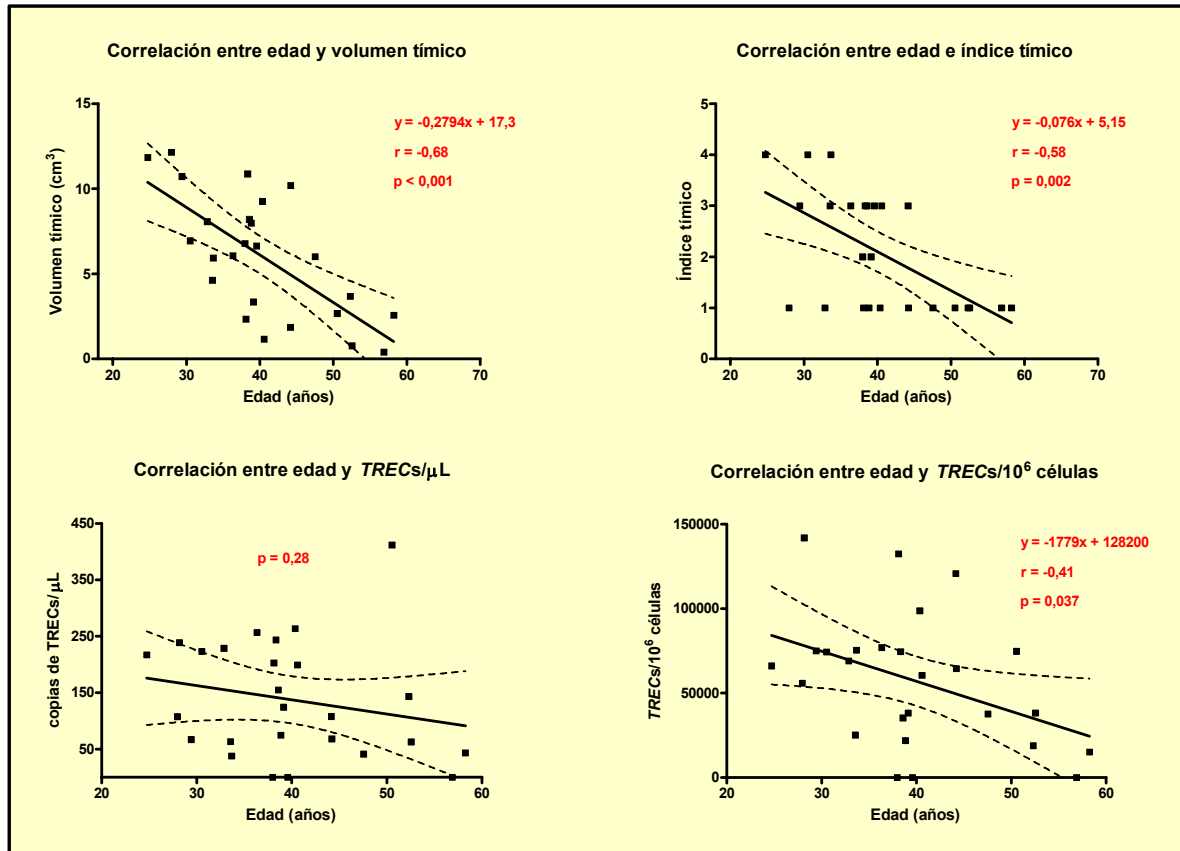


Figura R.1.7. Correlaciones basales entre parámetros de función tímica y edad (*TRECs*: Círculos de escisión del receptor celular T)

1.2.6. Sistema IL-7/IL-7R

Basalmente, la concentración sérica de IL-7 en los pacientes incluidos en el estudio fue de $10,51 \pm 4,33$ pg/mL, sin existir diferencias entre el GP y el GV ($10,63 \pm 3,79$ y $10,38 \pm 4,97$ respectivamente, $p = 0,89$). Por lo que respecta a la expresión de IL-7R, valorado mediante la proporción en células $CD4^+$ y $CD8^+$ *naïve* y memoria $CD127^+$, en el momento basal se halló que el porcentaje de células $CD4^+CD45RA^+CD127^+$ era menor en el GP (**Tabla R.1.7.**), no existiendo diferencias en el resto de subpoblaciones.

Resultados

Cuando se analizaron los niveles séricos de IL-7 por sexo no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,63$), así como tampoco se halló una correlación significativa de sus concentraciones con la edad ($p = 0,75$).

Tabla R.1.7. Características basales de los parámetros del sistema IL-7/IL-7R globalmente y por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de los diferentes parámetros. En el caso de las subpoblaciones celulares, se expresa la proporción de cada población (IL-7: Interleucina 7; IL-7R: Receptor de la IL-7 (CD127))

Sistema IL7/IL-7R	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Niveles séricos de IL-7 (pg/mL)	10,51 ± 4,33	10,63 ± 3,79	10,38 ± 4,97	0,89
Células CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	18,57 ± 8,52	16,20 ± 8,96	20,76 ± 7,8	0,05
Células CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	24,75 ± 11,21	28,66 ± 12,31	21,14 ± 9,10	0,09
Células CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	14,63 ± 10,17	13,83 ± 4,37	15,38 ± 13,72	0,7
Células CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	9,11 ± 5,24	10,44 ± 4,88	7,87 ± 5,44	0,23

1.2.7. Historia de exposición antigénica

Se interrogó a los pacientes sobre sus antecedentes vacunales, aunque éstos no eran determinantes a la hora de incluirlos en uno u otro grupo. La mayoría de los pacientes no recordaba con exactitud si se habían vacunado con anterioridad y qué tipo de vacuna habían recibido. La mayoría de pacientes tampoco tenía un carné vacunal de registro. Por ello no se muestran datos de la historia vacunal por anamnesis, sino únicamente la deducida de las respuesta humorales halladas de forma basal (**Tabla R.1.8.**).

Tabla R.1.8. Serologías basales. Se muestra el número de pacientes con serología positiva para los diferentes antígenos vacunales y el porcentaje (entre paréntesis) que suponen globalmente y por grupos

Serologías Basales	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Virus hepatitis A	19 (73,1)	10 (76,92)	9 (69,23)	1
Virus hepatitis B	11 (42,3)	6 (46,15)	5 (38,46)	1
Virus Varicela Zoster	24 (92,3)	11 (84,61)	13 (100)	0,48
Parotiditis	25 (96,2)	13 (100)	12 (92,31)	1
Rubéola	26 (100)	13 (100)	13 (100)	1
Sarampión	26 (100)	12 (100)	13 (100)	1
Neumococo	6 (23,08)	3 (23,08)	3 (23,08)	1
Tétanos	23 (88,5)	10 (76,92)	13 (100)	0,22
Difteria	4 (15,38)	13 (100)	13 (100)	1

1.2.7.1. Hepatitis A

El 73,1% de los pacientes incluidos tenían una serología basal positiva para el VHA, sin diferencias entre GP y GV. El título medio de anticuerpos (teniendo en cuenta un rango de sensibilidad de la técnica entre 0 y 100) fue de 71,99 mUI/mL (mediana 100 mUI/mL), sin tampoco existir diferencias entre los dos grupos.

Respecto a la respuesta celular, el porcentaje de positivos por ELISPOT y AMPLISPOT fue del 53,8% y del 73,1% respectivamente, sin diferencias entre grupos en las mediciones tanto cuantitativas como cualitativas (**Tabla R.1.9.**).

Tabla R.1.9. Respuestas basales humorales y celulares al virus hepatitis A. Se muestran los valores globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico; para los valores cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (VHA: Virus de la hepatitis A; SFC/10⁶ CMSP: Células Formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta basal a VHA	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	100 (8-100)	100 (27,05-100)	100 (6,50-100)	0,92
Humoral cualitativa	19 (73,1)	10 (76,9)	9 (69,2)	1
Celular por ELISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	144 (25-294)	144 (38-745)	66 (0-271)	0,26
Celular por AMPLISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	390 (75-935,75)	388 (75-881)	405 (153-1494)	0,61
Celular por ELISPOT cualitativa	14 (53,8)	8 (61,5)	6 (46,2)	1
Celular por AMPLISPOT cualitativa	19 (73,1)	10 (76,9)	9 (69,2)	1

El análisis de correlaciones entre los diferentes métodos de medida de la respuesta vacunal basal a VHA mostró que, en la valoración cuantitativa, la correlación entre la respuesta humoral y la medida por ELISPOT y AMPLISPOT no fue buena ($p = 0,12$ y $0,81$ respectivamente), mientras que las medidas celulares presentaron una buena correlación entre ellas ($r = 0,478$, $p = 0,025$). Por otro lado, en la valoración cualitativa, de los 19 pacientes con respuesta humoral positiva, 12 tenían una respuesta celular también positiva por ELISPOT (y 2 negativa), y 14 por AMPLISPOT (2 negativa), mientras que de los 7 negativos humoralmente, 4 lo fueron por ELISPOT (2 positivos) y 1 por AMPLISPOT (5 positivos).

1.2.7.2. Hepatitis B

El 42,3 % de los pacientes tenían una serología basal positiva para el VHB (anticuerpos contra el HBsAg con un nivel superior a 10 mUI/mL), sin diferencias entre GP y GV. De los

pacientes con serología positiva (11), el 90% (10) tenían anticuerpos contra el HBcAg, sugiriendo exposición natural al VHB, y el 36% (4) contra el antígeno e. Dos pacientes tenían anticuerpos detectables contra el HBcAg y no contra el HBsAg. El título medio de anticuerpos (teniendo en cuenta un rango de sensibilidad de la técnica entre 1 y 1000) fue de 266,76 mUI/mL (mediana 1 mUI/mL), sin tampoco existir diferencias entre los dos grupos.

A nivel celular, el porcentaje de positivos por ELISPOT y AMPLISPOT fue del 11,5% y del 15,4% respectivamente, sin diferencias entre grupos en las mediciones tanto cuantitativas como cualitativas (**Tabla R.1.10.**).

Tabla R.1.10. Respuestas basales humorales y celulares al virus hepatitis B. Se muestran los valores globales y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (VHB: Virus de la hepatitis B; Ac: Anticuerpos; HBcAg: Antígeno del core del VHB; HBeAg: Antígeno e del VHB; HBsAg: Antígeno de superficie del VHB; SFC/10⁶ CMSP: Células Formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta basal a VHB	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Ac Anti-HBcAg	12 (46,15)	6 (46,15)	6 (46,15)	1
Ac Anti-HBeAg	4 (15,4)	1 (7,69)	3 (23,08)	0,59
Humoral cuantitativa (Ac Anti- HBsAg) (mUI/mL)	1 (1-775,85)	5,65 (1-799,7)	1 (1-599,7)	0,78
Humoral cualitativa	11 (42,3)	6 (46,2)	5 (38,5)	1
Celular por ELISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-12)	4 (0-17,25)	0 (0-6)	0,21
Celular por AMPLISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-10)	0 (0-52)	0 (0-0)	0,36
Celular por ELISPOT cualitativa	3 (11,5)	2 (15,4)	1 (7,7)	1
Celular por AMPLISPOT cualitativa	4 (15,4)	3 (23,1)	1 (7,7)	0,59

El análisis de correlaciones entre los diferentes métodos de medida de la respuesta vacunal basal a VHB mostró que, en la valoración cuantitativa, la correlación entre la respuesta humoral y la medida por ELISPOT no fue buena ($p = 0,6$) pero sí por AMPLISPOT ($r = 0,42$, $p = 0,05$), mientras que las medidas celulares no presentaron una buena correlación entre ellas ($p = 0,88$). Por otro lado, en la valoración cualitativa, de los 11 pacientes con respuesta humoral positiva, 2 tenían una respuesta celular también positiva por ELISPOT (y 7 negativa), y 4 por AMPLISPOT (5 negativa), mientras que de los 15 negativos humoralmente, 13 lo fueron por ELISPOT (1 positivo) y 13 por AMPLISPOT (0 positivos).

1.2.7.3. Gripe

Sólo se evaluaron las respuestas celulares al virus influenza. El 65,4 y el 69,2 % de los pacientes por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente tenían respuestas positivas para el virus de la gripe, sin existir diferencias significativas entre GP y GV, excepto una tendencia en el valor cuantitativo de la respuesta celular por ELISPOT, siendo mayor en el GP que en el GV (Tabla R.1.11.).

Tabla R.1.11. Respuestas basales celulares al virus influenza. Se muestran los valores globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC/10⁶ CMSP: Células Formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta basal a virus influenza	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Celular por ELISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	92 (38-209)	195 (76,25-261,5)	67 (34-150)	0,079
Celular por AMPLISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	289 (168,75-639,5)	297 (225-526)	247 (23-770)	0,89
Celular por ELISPOT cualitativa	17 (65,4)	10 (76,9)	7 (53,8)	0,37
Celular por AMPLISPOT cualitativa	18 (69,2)	10 (76,9)	8 (61,5)	0,58

En la correlación entre las respuestas medidas por ELISPOT y AMPLISPOT, a nivel cualitativo, de los 17 pacientes positivos por ELISPOT 14 lo fueron por AMPLISPOT (2 negativos), y de los 9 negativos 2 los fueron por AMPLISPOT (4 positivos). Respecto a la valoración cuantitativa, la correlación fue buena ($r = 0,528$, $p = 0,012$).

1.2.7.4. Varicela

Tabla R.1.12. Respuestas basales humorales y celulares al VVZ. Se muestran globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (VVZ: Virus Varicela Zoster; SFC/10⁶ CMSP: Células Formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta basal a VVZ	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Humoral cualitativa	24 (92,3)	11 (84,6)	13 (100)	0,48
Celular por ELISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	8 (0-41)	17,5 (0-39,75)	8 (0-45)	0,83
Celular por AMPLISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	42,5 (0-170,5)	63 (0-214)	22 (0-156)	0,87
Celular por ELISPOT cualitativa	6 (23,1)	3 (23,1)	3 (23,1)	1
Celular por AMPLISPOT cualitativa	11 (42,3)	6 (46,2)	5 (38,5)	1

El 92,3% de los pacientes en estudio tenían anticuerpos contra el VVZ, el 100% del GV, sin diferencias entre grupos. Respecto a las respuestas celulares, en el 23,08 y el 42,3% de los

pacientes por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente se detectaron respuestas positivas, sin diferencias entre grupos (**Tabla R.1.12.**).

El análisis de correlaciones entre los diferentes métodos de medida de la respuesta vacunal basal a VVZ mostró que, en la valoración cuantitativa, la correlación entre las respuestas celulares medidas por ELISPOT y AMPLISPOT no fue buena ($p = 0,49$). Por otro lado, en la valoración cualitativa, de los 24 pacientes con respuesta humoral positiva, sólo 6 tenían una respuesta celular también positiva por ELISPOT (y hasta 15 la presentaron negativa), y 11 por AMPLISPOT (9 negativa), mientras que los 2 negativos humoralmente también lo fueron en el análisis de la respuesta celular.

1.2.7.5. Parotiditis

El 96,2% de los pacientes en estudio tenían anticuerpos contra el virus de la parotiditis, el 100% del GP, sin diferencias entre grupos. Respecto a las respuestas celulares, en el 15,38 y el 53,85% por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente se detectaron respuestas positivas, sin diferencias entre grupos (**Tabla R.1.13.**).

Tabla R.1.13. Respuestas basales humorales y celulares al virus parotiditis. Se muestran globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células Formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta basal a parotiditis	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Humoral cualitativa	25 (96,2)	13 (100)	12 (92,3)	1
Celular por ELISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	13 (0-31)	0 (0-31,75)	25 (0-31)	0,29
Celular por AMPLISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	71,5 (16-158,25)	72 (25-156)	71 (0-165)	0,72
Celular por ELISPOT cualitativa	4 (15,4)	2 (15,4)	2 (15,4)	1
Celular por AMPLISPOT cualitativa	14 (53,8)	7 (53,8)	7 (53,8)	1

El análisis de correlaciones entre los diferentes métodos de medida de la respuesta vacunal basal a parotiditis mostró que, en la valoración cuantitativa, la correlación entre las respuestas celulares medidas por ELISPOT y AMPLISPOT no fue buena ($p = 0,47$). Por otro lado, en la valoración cualitativa, de los 25 pacientes con respuesta humoral positiva, sólo 4 tenían una respuesta celular también positiva por ELISPOT (y hasta 18 la presentaron negativa),

y 14 por AMPLISPOT (7 negativa), mientras que el paciente que tenía serología negativa basalmente también la tuvo en el análisis de la respuesta celular.

1.2.7.6. Rubéola

En el caso de la rubéola sólo se exploró la respuesta humoral. El 100% de los pacientes tenían anticuerpos protectores contra el virus de la rubéola, con un nivel medio de 130,46 (mediana 78,5) UI/mL, sin diferencias entre grupos (**Tabla R.1.14.**).

Tabla R.1.14. Respuestas basales humorales al virus rubéola. Se muestran globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo.

Respuesta basal a rubéola	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Humoral cuantitativa (UI/mL)	78,5 (28,75-128)	102 (28-183)	66 (35-103,5)	0,59
Humoral cualitativa	26 (100)	13 (100)	13 (100)	1

1.2.7.7. Sarampión

El 100% de los pacientes en estudio tenían anticuerpos contra el virus del sarampión. Respecto a las respuestas celulares, en el 7,7 y el 15,4% por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente se detectaron respuestas positivas, sin diferencias entre grupos (**Tabla R.1.15.**).

Tabla R.1.15. Respuestas basales humorales y celulares al virus sarampión. Se muestran globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células Formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta basal a sarampión	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Humoral cualitativa	26 (100)	13 (100)	13 (100)	1
Celular por ELISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	1,5 (0-9)	3 (0-13)	0 (0-8)	0,48
Celular por AMPLISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-30)	3 (0-43)	0 (0-6)	0,25
Celular por ELISPOT cualitativa	2 (7,7)	2 (15,4)	0 (0)	0,48
Celular por AMPLISPOT cualitativa	4 (15,4)	3 (23,1)	1 (7,7)	0,59

El análisis de correlaciones entre los diferentes métodos de medida de la respuesta vacunal basal a sarampión mostró que, en la valoración cuantitativa, la correlación entre las respuestas celulares medidas por ELISPOT y AMPLISPOT no fue buena ($p = 0,91$). Por otro lado, en la valoración cualitativa, de los 26 pacientes con respuesta humoral positiva, sólo 2

tenían una respuesta celular también positiva por ELISPOT (y hasta 21 la presentaron negativa), y 4 por AMPLISPOT (18 negativa).

1.2.7.8. *Neumococo*

El 23,08% de los pacientes incluidos tenían una serología basal positiva para neumococo, sin diferencias entre GP y GV. El título medio y mediano de anticuerpos fue de 441,27 y 306,5 U/mL respectivamente, sin tampoco existir diferencias entre los dos grupos.

En la respuesta celular, el porcentaje de positivos por ELISPOT y AMPLISPOT fue del 15,38% y del 19,2% respectivamente, sin diferencias entre grupos en las mediciones tanto cuantitativas como cualitativas (**Tabla R.1.16.**).

Tabla R.1.16. Respuestas basales humorales y celulares a neumococo. Se muestran globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células Formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta basal a neumococo	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Humoral cuantitativa (U/mL)	306,5 (81,5-642,25)	317 (104-655,5)	252 (71,5-551)	0,59
Humoral cualitativa	6 (23,1)	3 (23,1)	3 (23,1)	1
Celular por ELISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	5 (0-15)	7 (0-22,75)	0 (0-15)	0,47
Celular por AMPLISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	2,5 (0-54,25)	13 (0-100)	0 (-39)	0,7
Celular por ELISPOT cualitativa	4 (15,4)	2 (15,4)	2 (15,4)	1
Celular por AMPLISPOT cualitativa	5 (19,2)	3 (23,1)	2 (15,4)	1

El análisis de correlaciones entre los diferentes métodos de medida de la respuesta vacunal basal a neumococo mostró que, en la valoración cuantitativa, ni las correlaciones entre la respuesta humoral y la medida por ELISPOT y AMPLISPOT ($p = 0,48$ y $0,86$, respectivamente), ni entre las medidas celulares ($p = 0,5$) fueron buenas. Por otro lado, en la valoración cualitativa, de los 6 pacientes con respuesta humoral positiva, 1 tenía una respuesta celular también positiva por ELISPOT y AMPLISPOT (y hasta 4 negativa), mientras que de los 20 negativos humoralmente, 15 lo fueron por ELISPOT (3 positivos) y 13 por AMPLISPOT (4 positivos).

1.2.7.9. *Tétanos*

El 88,5% de los pacientes tenía una serología basal positiva para tétanos, sin diferencias entre GP y GV. El título medio y mediano de anticuerpos fue de 1,18 y 0,16 UI/mL respectivamente, sin tampoco existir diferencias entre los dos grupos.

Respecto a la respuesta celular, el 11,5% de los pacientes tanto por ELISPOT como por AMPLISPOT presentó una respuesta positiva, sin diferencias significativas entre grupos en las mediciones tanto cuantitativas como cualitativas (**Tabla R.1.17.**).

El análisis de correlaciones entre los diferentes métodos de medida de la respuesta vacunal basal a tétanos mostró que, en la valoración cuantitativa, ni las correlaciones entre la respuesta humoral y la celular medida por ELISPOT y AMPLISPOT ($p = 0,11$ y $0,23$, respectivamente), ni entre las medidas celulares ($p = 0,65$) fueron buenas. Por otro lado, en la valoración cualitativa, de los 23 pacientes con respuesta humoral positiva, sólo 3 tenían una respuesta celular también positiva por ELISPOT y AMPLISPOT (y 17 negativa), mientras que de los 3 negativos humoralmente, los 3 lo fueron por ELISPOT y 2 por AMPLISPOT (0 positivos).

Tabla R.1.17. Respuestas basales humorales y celulares a tétanos. Se muestran globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células Formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta basal a tétanos	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Humoral cuantitativa (UI/mL)	0,16 (0,03-1,9)	0,09 (0,01-1,97)	0,65 (0,04-2,18)	0,37
Humoral cualitativa	23 (88,5)	10 (76,9)	13 (100)	0,22
Celular por ELISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-10)	0 (0-47,5)	0 (0-6)	0,63
Celular por AMPLISPOT cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-19)	0 (0-19)	0 (0-19)	0,62
Celular por ELISPOT cualitativa	3 (11,5)	3 (23,1)	0 (0)	0,22
Celular por AMPLISPOT cualitativa	3 (11,5)	1 (7,7)	2 (15,4)	1

Cuando se analizaron la correlación de las respuestas vacunales con los valores basales de las respuestas proliferativas a toxoide tetánico, tampoco se hallaron correlaciones significativas ni cuantitativamente ($p = 0,63$, $0,12$ y $0,79$ para las comparaciones entre las respuestas proliferativas a toxoide tetánico y las respuestas basales humoral y celular por

ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente), ni cualitativamente (de los 20 pacientes positivos humoralmente para tétanos, sólo 5 presentaron una respuesta proliferativa positiva para el toxoide tetánico y hasta 15 la presentaron negativa).

1.2.7.10. *Difteria*

En el caso de la difteria sólo se exploró la respuesta humoral. Basalmente, el 7,7% de los pacientes tenían anticuerpos protectores contra difteria, con un nivel medio y mediano de 0,062 y 0,01 UI/mL, sin diferencias entre grupos (**Tabla R.1.18.**).

Tabla R.1.18. Respuestas basales humorales a difteria. Se muestran globalmente y por grupos. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo.

Respuesta basal a difteria	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Humoral cuantitativa (UI/mL)	0,01 (0,01-0,01)	0,01 (0,01-0,01)	0,01 (0,01-0,05)	0,27
Humoral cualitativa	4 (15,38)	1 (7,7)	3 (23,1)	1

1.3. CAMBIOS DURANTE EL PERIODO VACUNAL

1.3.1. Efectos sistémicos o locales asociados al calendario vacunal

No se recogió ningún efecto secundario ni local ni sistémico tras ninguna de las 12 inyecciones/paciente de vacuna o placebo que se realizaron durante el periodo de tratamiento.

Un paciente del GP fue *exitus* durante el mes 9 del protocolo por muerte accidental, sin relación con el estudio ni con la infección por el VIH, lo que fue comunicado a las autoridades sanitarias pertinentes.

Un paciente del GV fue diagnosticado de una infección aguda por el VHA en el mes 2 a raíz de un cuadro de astenia, fiebre e ictericia, con elevación de las transaminasas y la bilirrubina, disminución de la tasa de protrombina y la determinación de IgM frente a VHA positiva (el paciente era seronegativo al inicio del estudio). El paciente refirió actividades de riesgo previas. Se retrasó temporalmente la aplicación del protocolo vacunal durante 3 meses hasta la normalización de la función hepatocelular.

1.3.2. Efectos del calendario vacunal sobre la carga viral

1.3.2.1. Generalidades

Se obtuvieron durante los 12 meses que los pacientes recibieron tratamiento y vacunas o tratamiento y placebo un total de 314 determinaciones de carga viral, inicialmente con un límite de detección inferior de 200 copias/mL, y posteriormente se repitieron con una técnica con un límite de sensibilidad de 20 copias/mL. Se deberían haber obtenido 338, no teniendo muestra de CV por tanto en 24 determinaciones por los siguientes motivos:

- GP: No se pudo obtener la CV en 16 determinaciones por:
 - Olvido del paciente a la hora de la extracción, n = 13 (1 en mes 1, 5 en mes 3, 6 en mes 5, 1 en mes 6).
 - *Exitus* de un paciente tras el mes 9, faltando sus determinaciones en los meses 10, 11 y 12 (n = 3).

- GV: No se pudo obtener la CV en 8 determinaciones por

- Olvido del paciente a la hora de la extracción, n = 8 (1 en mes 6, 1 en mes 7, 1 en mes 10, 2 en mes 11, 3 en mes 12).

1.3.2.2. Cargas virales detectables con límite de detectabilidad de 200 copias/mL

De las 314 determinaciones, se obtuvo una CV \geq 200 copias/mL en 22 determinaciones, 14 en GP y 8 en GV. Estas determinaciones positivas se repartieron de la siguiente manera (Figura R.1.8.):

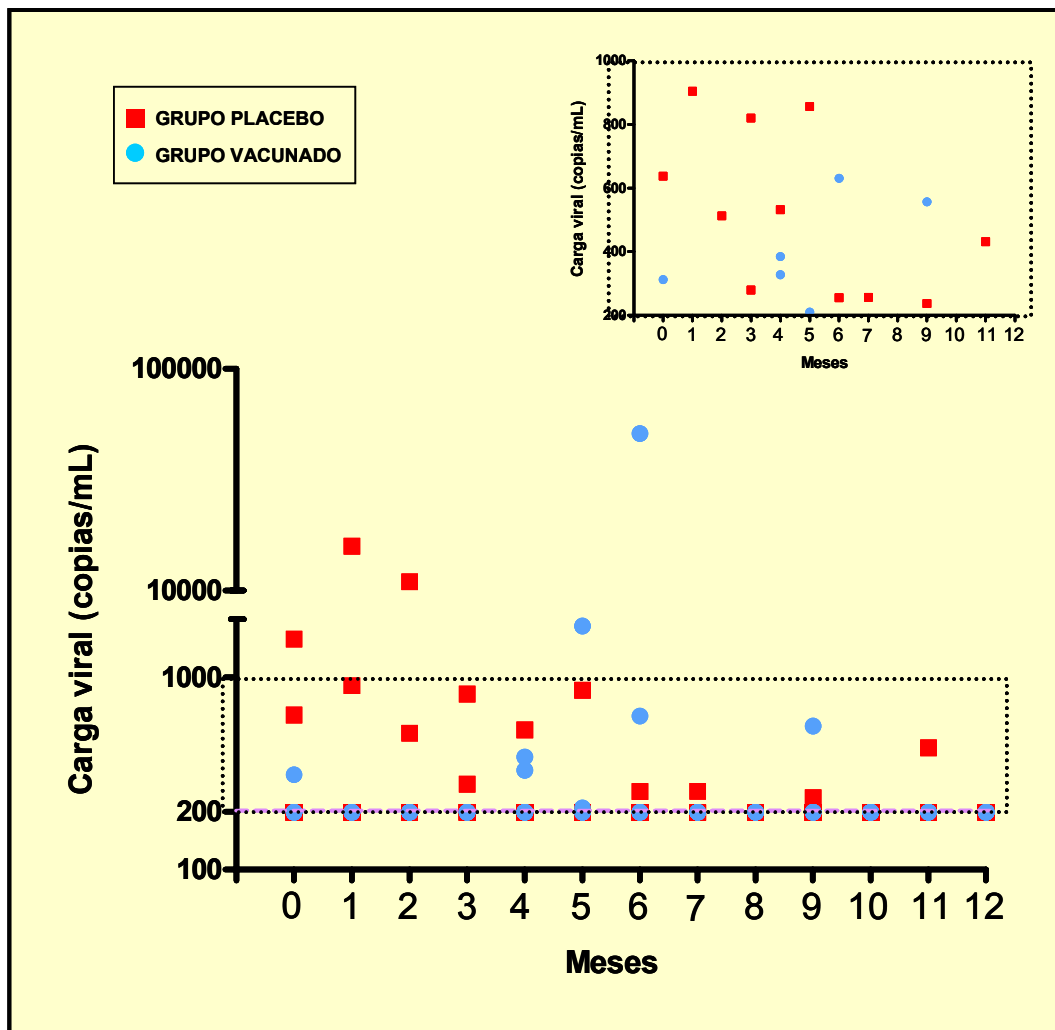


Figura R.1.8. Determinaciones de carga viral con un ensayo con límite inferior de detectabilidad de 200 copias/mL durante el periodo de tratamiento + vacuna o tratamiento + placebo. En el margen superior derecho se muestra el detalle de las cargas virales entre 200 y 1000 copias/mL

- GP (Figura R.1.9.):

- El paciente con código de randomización número 4 presentó CV detectables de forma consecutiva en los meses 0, 1, 2, 3, 4 y 5. Posteriormente presentó una nueva determinación > 200 copias/mL en el mes 7.
- El paciente con código de randomización número 5 abandonó de forma voluntaria el TARGA durante los 3 primeros meses, presentando CV detectables de forma consecutiva en los meses 0, 1, 2 y 3.
- El paciente con código de randomización número 9 presentó una CV detectable en el mes 6.
- El paciente con código de randomización número 10 presentó una CV detectable en el mes 9.
- El paciente con código de randomización número 19 presentó una CV detectable en el mes 11.

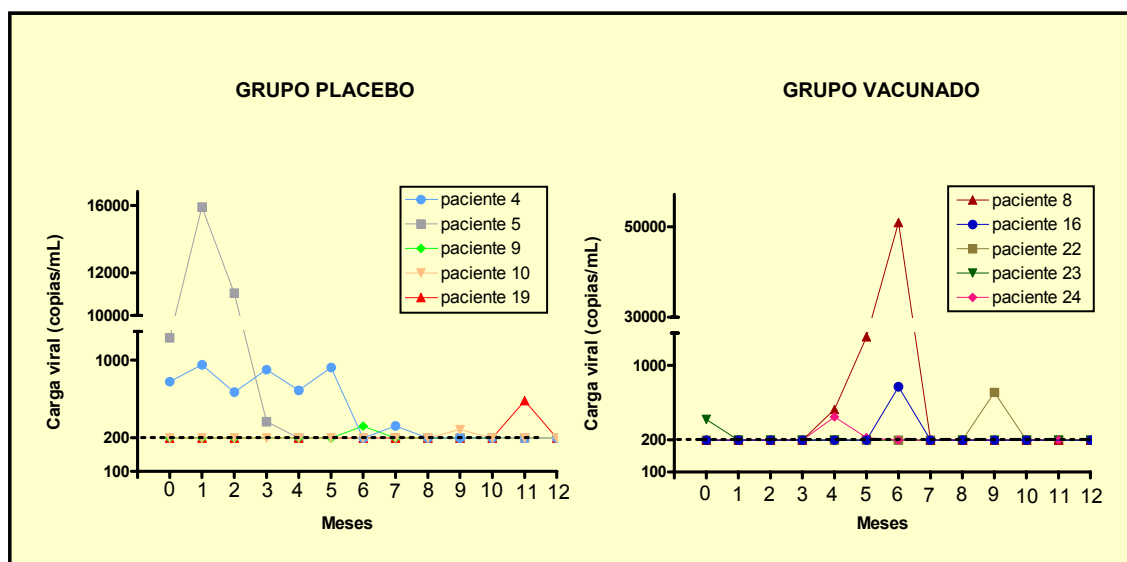


Figura R.1.9. Evolución de la carga viral en los pacientes con CV detectables ≥ 200 copias/mL en grupo placebo y grupo vacunado durante el periodo de tratamiento

- GV (Figura R.1.9.):

- El paciente con código de randomización número 8 presentó CV detectables de forma consecutiva en los meses 4, 5 y 6.
- El paciente con código de randomización 16 presentó una CV detectable en el mes 6.
- El paciente con código de randomización número 22 presentó una CV detectable en el mes 9.
- El paciente con código de randomización 23 presentó una CV detectable en el mes 0.
- El paciente con código de randomización 24 presentó CV detectables de forma consecutiva en los meses 4 y 5.

La incidencia de CV detectables/determinación fue, globalmente, de 0,07 (22/314) (95% intervalo de confianza (IC): 0,044-0,104). Por grupos, en GP fue 14/153 (0,091; 95% IC: 0,051-0,15), y en GV, que recibió un total de 195 estímulos inmunológicos, 8/161 (0,050; 95% IC: 0,022-0,095) ($p = 0,22$, χ^2 con corrección de Yates; riesgo relativo (RR) 0,54 [95% IC 0,23-1,26]). Por tanto no se hallaron diferencias significativas en la presencia de CV detectables entre grupos, y en cualquier caso fueron más frecuentes en el GP que en el GV.

Cuando se repitió el análisis sin aquellas CV que fueron detectables por falta de tratamiento (4 de un paciente en GP) y las que hubiesen en el mes 0, antes de iniciar el periodo vacunal (1 en un paciente de GV y 1 en un paciente del GP), se encontró una incidencia global de 16/309 (0,052; 95% IC: 0,03-0,82), 9/149 (0,060; 95% IC: 0,028-0,112) en GP y 7/160 (0,044; 0,018-0,09) en GV ($p = 0,69$, χ^2 con corrección de Yates; RR 0,72 [95% IC: 0,28-1,9]).

En un análisis por intención de tratar en función de los pacientes en lugar de las determinaciones, fueron 5 pacientes en GP y 5 pacientes en GV los que presentaron una CV \geq 200 copias/mL (el 38,46% de los pacientes de cada grupo, 95% IC: 13,85-68,4%), sin diferencias significativas entre los grupos (χ^2 , $p = 0,69$, χ^2 con corrección de Yates; RR 1 [95% IC: 0,38-2,64]).

Cuando se repitió el análisis eliminando los pacientes detectables por no haber mantenido el TARGA (1), encontramos 4 pacientes en GP y 5 en GV con $CV \geq 200$ copias/mL, tampoco con diferencias significativas ($p = 1$, χ^2 con test exacto de Fisher; RR 1,15 [95% IC: 0,40-3,31]). Cuando en el análisis se eliminaron aquellos pacientes cuya única determinación detectable fue en el mes 0 y por tanto no pudiera ser atribuible a la vacunación, encontramos 4 pacientes por grupo, también sin diferencias significativas ($p = 1$, χ^2 con test exacto de Fisher; RR 1 [0,32-3,10]).

Por meses, las CV detectables se distribuyeron de la siguiente forma (**Figura R.1.8.**):

- Mes 0: 2 (GP) y 1 (GV).
- Mes 1: 2 (GP) y 0 (GV).
- Mes 2: 2 (GP) y 0 (GV).
- Mes 3: 2 (GP) y 0 (GV).
- Mes 4: 1 (GP) y 2 (GV).
- Mes 5: 1 (GP) y 2 (GV).
- Mes 6: 1 (GP) y 2 (GV).
- Mes 7: 1 (GP) y 0 (GV).
- Mes 8: 0 (GP) y 0 (GV).
- Mes 9: 1 (GP) y 1 (GV).
- Mes 10: 0 (GP) y 0 (GV).
- Mes 11: 1 (GP) y 0 (GV).
- Mes 12: 0 (GP) y 0 (GV).

Por tanto en el GV presentaron CV detectable un mes tras alguna vacunación en 3 ocasiones, mientras que las 5 restantes no iban precedidas de vacunación alguna.

Las características de las CV detectables que se presentaron durante el estudio fueron las siguientes (**Figura R.1.9.**):

- 4 series de CV detectables consecutivas:

- 1 serie de 6 determinaciones, en el paciente n° 4 (GP), de bajo nivel, con un máximo de 904 copias/mL, un mínimo de 513 copias/mL y una media de 710,3 copias/mL.
- 1 serie de 4 determinaciones, en el paciente n° 5 (GP), sin tratamiento, con un máximo de 15.900 copias/mL, un mínimo de 279 copias/mL y una media de 7189,75 copias/mL.
- 1 serie de 3 determinaciones, en el paciente n° 8 (GV), ascendente, con un máximo de 51.200 copias, un mínimo de 385 copias/mL y una media de 17.811,67 copias/mL.
- 1 serie de 2 determinaciones, en el paciente n° 24 (GV), de bajo nivel, de 328 y 210 copias/mL (media 269 copias/mL).

- 6 episodios aislados, con las determinaciones previa y posterior inferiores a 200 copias/mL. Éstos se dieron en 3 pacientes en el GP y en 3 pacientes en el GV. El rango fue de 237 a 631 copias/mL, con una media de 381,4 copias/mL.

Globalmente, el rango de CV detectables fue de 210 a 51.200 copias/mL, con una media de 4076,04 copias/mL y una mediana de 544,5 copias/mL. Por grupos, los rangos, media y mediana fueron de 237-15.900, 2442,86 y 584,5 copias/mL, y 210-51.200, 6934,12 y 471 copias/mL en el GP y el GV respectivamente.

Si únicamente valoramos los episodios de viremia aislados, es decir, los que fueron precedidos y seguidos de una siguiente determinación indetectable, y a partir del mes 1 (para valorar el impacto real de las vacunaciones), encontramos que el número total de eventos detectables fue de 5 episodios (3 en GP, y 2 en GV, en los meses 6 y 9), rango 237-631 copias/mL (237-431 en GP, 557-631 en GV), media 450,8 copias/mL (307,7 y 594 copias/mL en GP y GV respectivamente) y mediana de 431 copias/mL (255 y 594 copias/mL para GP y GV respectivamente).

Finalmente, cuando se valoraron únicamente los episodios que cumplían la definición de EVI, con una elevación de la CV por encima del límite de sensibilidad de forma transitoria,

es decir, precedida y seguida de otra determinación de CV indetectable, sin haber realizado cambios en el TARGA, teniendo en cuenta que un EVI podía incluir varias CV detectables consecutivas, se hallaron 7 episodios (0,26 episodios/paciente/año, 7 de 292 determinaciones valorables), 3/141 en el GP (0,021, 95% IC 0,004-0,061) y 4/157 (0,025, 95% IC 0,007-0,064) en el GV ($p = 1$, χ^2 con test exacto de Fisher; RR 1,20 [95% IC 0,27-5,26]). Todos consistieron en una única determinación de CV detectable (duración máxima por tanto de 60 días) excepto uno (en GV) que constó de dos determinaciones. La media, mediana y el rango de los EVI fue de 370,12, 320 y 210-631 copias/mL globalmente (307,67, 255 y 237-431 copias/mL para el GP y 407,6, 328 y 210-631 copias/mL para GV respectivamente).

No se halló relación en el GV entre las determinaciones de CV detectables y la administración de una vacuna frente a la cual el paciente presentase una serología negativa. En uno de los casos, el paciente con código de randomización número 10, que basalmente era negativo para VHA, y que en el mes 4 (el de la administración de la primera dosis de vacuna frente a VHA) presentaba una CV detectable (385 copias/mL), en la determinación del mes 5 (un mes tras la vacuna) presentó una CV de 1850 copias/mL. Como se ha comentado anteriormente, el paciente refirió una disminución de la adherencia, aunque no se puede descartar un papel de la vacunación. Ese mismo paciente presentaba una serología negativa para VHB basalmente, y se administró la 4ª dosis de vacuna anti-VHB en el mes 6, cuando tenía una CV de 51200 copias/mL. El mes siguiente (mes 7) la CV fue negativa.

1.3.2.3. *Cargas virales detectables con límite de detectabilidad de 20 copias/mL*

Con las muestras congeladas en las que se habían obtenido valores de CV inferiores a 200 copias/mL, se determinó con posterioridad la CV mediante un ensayo con un límite inferior de sensibilidad de 20 copias/mL. Se realizó por tanto en 293 muestras en total, 140 en el GP y 153 en el GV.

De las 314 determinaciones, se obtuvo una CV ≥ 20 copias/mL en 49 casos, 31 en GP y 18 en GV. Por tanto, se detectaron 28 CV detectables que no se habían detectado con la técnica

menos sensible. En 4 de las determinaciones el valor obtenido fue > 200 copias/mL, a pesar que con el ensayo anterior había resultado indetectable. Las 24 determinaciones restantes estaban entre las 20 y las 200 copias/mL.

Las determinaciones ≥ 20 copias/mL se repartieron de la siguiente forma (Figura R.1.10.):

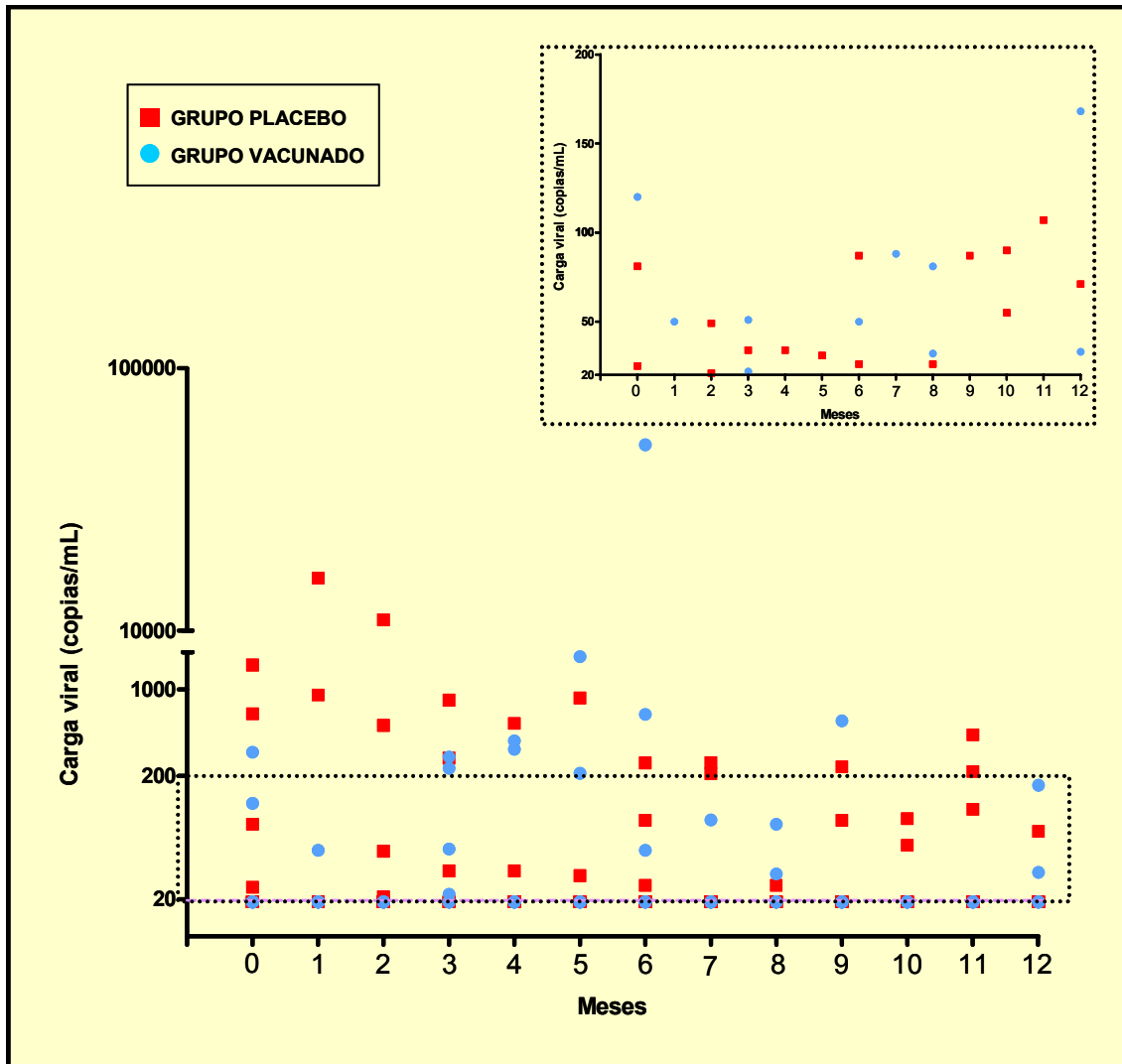


Figura R.1.10. Determinaciones de carga viral con un ensayo con límite inferior de detectabilidad de 20 copias/mL durante el periodo de tratamiento + vacuna o tratamiento + placebo. En el margen superior derecho se muestra el detalle entre 20 y 200 copias/mL

- GP (Figura R.1.11.):

- El paciente con código de randomización número 4 presentó CV detectables de forma consecutiva en los meses 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.
- El paciente con código de randomización número 5 abandonó de forma voluntaria el TARGA durante los 3 primeros meses, presentando CV detectables de forma consecutiva en los meses 0, 1, 2, 3 y 4.
- El paciente con código de randomización número 7 presentó CV detectables en los meses 3, 5, 6, 9 y 11.
- El paciente con código de randomización número 9 presentó una CV detectable en los meses 2, 6, 7, 8, 10, 11 y 12.
- El paciente con código de randomización número 10 presentó CV detectable en los meses 0 y 9.
- El paciente con código de randomización número 11 presentó una CV detectable en el mes 0.
- El paciente con código de randomización número 19 presentó una CV detectable en el mes 2 y otra en el 11.

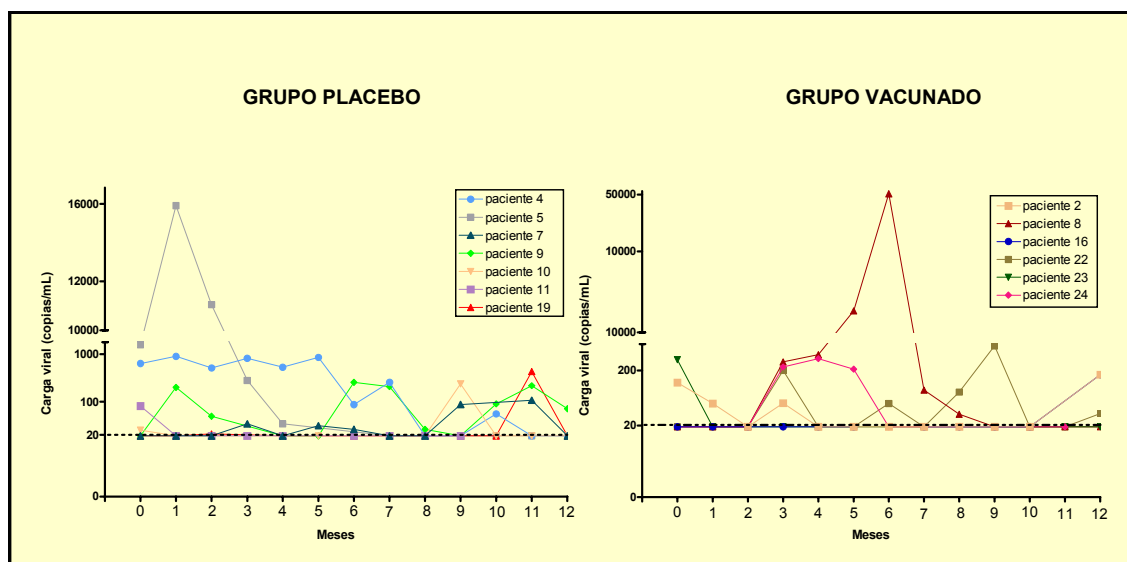


Figura R.1.11. Evolución de la carga viral en los pacientes con CV detectables ≥ 20 copias/mL en grupo placebo y grupo vacunado durante el periodo de tratamiento

- GV (Figura R.1.11.):
 - o El paciente con código de randomización número 2 presentó CV detectables en los meses 0 y 1.
 - o El paciente con código de randomización número 8 presentó CV detectables de forma consecutiva en los meses 3, 4, 5, 6, 7 y 8.
 - o El paciente con código de randomización 16 presentó CV detectables en los meses 6 y 12.
 - o El paciente con código de randomización número 22 presentó CV detectables en los meses 6, 8, 9 y 12.
 - o El paciente con código de randomización 23 presentó una CV detectable en el mes 0.
 - o El paciente con código de randomización 24 presentó CV detectables de forma consecutiva en los meses 3, 4 y 5.

La incidencia de CV detectables/determinación fue, globalmente, de 0,156 (49/314, 95% IC 0,12-0,2). Por grupos, en GP fue 31/153 (0,20, 95% IC 0,14-0,27), y en GV 18/161 (0,11, 0,068-0,17) ($p = 0,04$, χ^2 con corrección de Yates, riesgo relativo 0,55 [95% IC 0,32-0,94]), es decir, que el GP presentó significativamente más CV detectables ≥ 20 copias/mL que el GV.

Cuando el análisis se realizó sin las CV detectables por falta de tratamiento (5 de un paciente en GP) y las detectables en el mes 0, antes de iniciar el periodo vacunal (3 en pacientes del GP y 2 en pacientes del GV), se halló una incidencia global de 39/304 (0,13, 95% IC 0,09-0,17), 23/145 (0,16, 95% IC 0,1-0,23) en GP y 16/159 (0,1, 95% IC 0,06-0,16) en GV ($p = 0,18$, χ^2 con corrección de Yates; RR 0,63 [95% IC 0,35-1,15]).

Globalmente, el rango de CV detectables fue de 21 a 51.200 copias/mL, con una media de 1878,77 copias/mL y una mediana de 210 copias/mL. Por grupos, los rangos, media y mediana fueron de 21-15.900, 1143,52 y 208 copias/mL, y 32-51.200, 3145,05 y 220,5 copias/mL en el GP y el GV respectivamente.

En un análisis por intención de tratar referido al número de pacientes con CV detectables ≥ 20 copias/mL, se hallaron 7 pacientes en GP (0,53, 95% IC 0,25-0,81) y 6 pacientes en GV (0,46, 95% IC 0,19-0,75), sin diferencias significativas entre los grupos ($p = 1$, χ^2 con corrección de Yates; RR 0,86 [95% IC 0,4-1,86]).

Cuando el análisis se limitó a los pacientes que mantuvieron tratamiento, encontramos 6 pacientes en GP (0,5, 95% IC 0,21-0,79) y 6 en GV (0,46, 95% IC 0,19-0,75) con CV > 20 copias/mL, tampoco con diferencia significativa ($p = 0,83$, χ^2 con corrección de Yates; RR 0,92 [95% IC 0,41-2,09]). Cuando se realizó sin las determinaciones en el mes 0 y sólo se incluyeron las determinaciones a partir de haber recibido la primera vacuna, encontramos 5/12 pacientes en GP (0,42, 95% IC 0,15-0,72) y 6/13 pacientes en GV (0,46, 95% IC 0,19-0,75), también sin diferencias significativas ($p = 0,85$, χ^2 con corrección de Yates; RR 1,11 [95% IC 0,45-2,7]).

Por meses, las CV detectables se distribuyeron de la siguiente forma (**Figura R.1.10.**):

- Mes 0: 4 (GP) y 2 (GV).
- Mes 1: 2 (GP) y 1 (GV).
- Mes 2: 4 (GP) y 0 (GV).
- Mes 3: 3 (GP) y 2 (GV).
- Mes 4: 2 (GP) y 2 (GV).
- Mes 5: 2 (GP) y 2 (GV).
- Mes 6: 3 (GP) y 3 (GV).
- Mes 7: 2 (GP) y 1 (GV).
- Mes 8: 1 (GP) y 2 (GV).
- Mes 9: 2 (GP) y 1 (GV).
- Mes 10: 2 (GP) y 0 (GV).
- Mes 11: 3 (GP) y 0 (GV).
- Mes 12: 1 (GP) y 2 (GV).

Por tanto en el GV presentaron CV detectable un mes tras alguna vacunación en 7 ocasiones, mientras que las 11 restantes no iban precedidas de vacunación en el mes previo.

Las características de las CV detectables que se presentaron durante el estudio fueron las siguientes:

- 8 series de CV detectables consecutivas (**Figura R.1.11.**):

- 1 serie de 2 determinaciones, en el paciente nº 2 (GV), de 50 y 120 copias/mL.
- 1 serie de 8 determinaciones, en el paciente nº 4 (GP) (meses 0-7), con rango 87-856 copias/mL, y media y mediana de 576,62 y 584,5 copias/mL respectivamente.
- 1 serie de 5 determinaciones, en el paciente nº 5 (GP) (meses 0-4), con un máximo de 15.900 copias/mL, un mínimo de 34 copias/mL, una media de 5758,6 y una mediana de 1580 copias/mL.
- 1 serie de 2 determinaciones, en el paciente nº 7 (GP) (meses 5-6), de 26 y 31 copias/mL.
- 1 serie de 6 determinaciones, en el paciente nº 8 (GV), con rango de 32 a 51.200 copias/mL, y media y medianas de 8973,33 y 335 respectivamente.
- 2 series de 3 determinaciones, en el paciente nº 9 (GP) (meses 6-8 y 10-12). La primera con máximo de 255 copias/mL, mínimo de 26, media de 163, y mediana de 208 copias/mL; y la segunda con mínimo de 71, máximo de 217, media de 209 copias/mL y mediana de 90 copias/mL.
- 1 serie de 2 determinaciones, en el paciente nº 22 (GV) (meses 8 y 9), de 81 y 557 copias/mL.
- 1 serie de 3 determinaciones, en el paciente nº 24 (GV), con rango de 210-328 copias/mL, y media y mediana de 256,33 y 231 copias/mL respectivamente.

- 15 episodios aislados (10 GP, 5 GV), con las determinaciones previa y posterior inferiores a 20 copias/mL. Éstos se dieron en 5 pacientes en el GP y en 3 pacientes en el GV. El rango fue de 21 a 631 copias/mL (21-431 en GP, 33-631 en GV), con una media y una mediana de 154,73 y 81 copias/mL respectivamente (112,7 y 68 copias/mL en GP y 238,8 y 168 en GV).

Finalmente, cuando se valoraron únicamente los episodios que cumplían la definición de EVI se hallaron 21 episodios, 12 en el GP (12/140 determinaciones valorables, 0,086 [95% IC 0,045-0,14]) y 9 en el GV (9/155 determinaciones valorables, 0,058 [95% IC 0,027-0,11]) ($p = 0,49$, χ^2 con corrección de Yates; RR 0,68 [95% IC 0,29-1,56]), que se repartieron en 12 pacientes, 6 en cada grupo (0,46, 95% IC 0,18-0,75; $p = 0,69$, χ^2 con corrección de Yates; RR 1 [95% IC 0,44-2.29]). Seis pacientes presentaron un único EVI, 3 dos EVI y 3 tres episodios. La duración mediana fue de 1 determinación (rango 1-3), con 14 episodios de 1 determinación, 4 de dos determinaciones y 3 de tres determinaciones. La media, mediana y el rango de los EVI fue de 156,26, 87 y 21-631 copias/mL globalmente (113,94, 76 y 21-431 copias/mL para el GP y 214,85, 168 y 22-631 copias/mL para el GV).

No se halló relación en el GV entre las determinaciones de CV detectables y la administración de una vacuna frente a la cual el paciente presentase una serología negativa.

Los cambios en las CV hallados se resumen en la **Tabla R.1.19**.

1.3.2.4. *Cambios de tratamiento antirretroviral*

Durante el periodo inicial de los 12 meses se consideró indicado cambiar la pauta de TARGA en 2 pacientes:

- El paciente nº 4 (GP) se consideró que estaba presentando VPBN, con 5 determinaciones consecutivas detectables. Refería una adherencia del 85-90%. Se intentó genotipar el virus para determinar posibles resistencias, pero no fue posible. Finalmente se cambió el TARGA que recibía Lamivudina+Abacavir+Nelfinavir por una nueva pauta para

Resultados

aumentar la adherencia Efavirenz+Didanosina+Tenofovir en el mes 5, con la resolución de la VPBN consiguiendo la indetectabilidad < 20 copias/mL.

- El paciente nº 8 (GV) presentó CV detectables en los meses 4, 5 y 6, bajo tratamiento con Lamivudina+Didanosina+Nelfinavir. El genotipado realizado en el mes 5 objetivó únicamente polimorfismos en el gen de la proteasa y una mutación M184V, confiriendo resistencia a 3TC. El paciente refería una adherencia del 75% en esos meses por “relajación”. Se sustituyó el tratamiento en el mes 7 a Tenofovir+Didanosina+Nelfinavir. La determinación de la CV del mismo día del cambio fue < 200 copias/mL (88 copias/mL) y posteriormente < 20 copias/mL.

Tabla R.1.19. Características de las determinaciones de las CV realizadas durante el periodo de tratamiento. Se muestran las realizadas con los ensayos con límites inferior de detección de 200 y 20 copias/mL (CV: Carga viral; * Test exacto de Fisher)

Características	Total	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Número de determinaciones previstas	338	169	169	1
Número de determinaciones realizadas	314	153	161	0,14
CV ≥ 200 copias/mL				
Número de determinaciones CV>200 copias/mL	22	14	8	0,22
Incidencia de CV detectables	0,07	0,091	0,05	0,22
Número de pacientes con CV detectables	10	5	5	1*
Serie >1 determinación detectable consecutiva	4	2	2	1*
Episodios aislados	6	3	3	0,72*
Rango CV detectables (copias/mL)	210-51200	237-15900	210-51200	
Media CV detectables (copias/mL)	4076,04	2442,86	6934,12	
Mediana CV detectables (copias/mL)	544,5	584,5	471	
CV ≥ 20 copias/mL				
Número de determinaciones CV>20 copias/mL	49	31	18	0,04
Incidencia de CV detectables	0,156	0,2	0,11	0,04
Número de pacientes con CV detectables	13	7	6	1
Serie >1 determinación detectable consecutiva	9	5	4	1*
Episodios aislados	15	10	5	0,25
Rango CV detectables (copias/mL)	21-51200	21-15900	32-51200	
Media CV detectables (copias/mL)	1878,77	1143,52	3145,05	
Mediana CV detectables (copias/mL)	210	208	220,5	

1.3.3. Efectos del calendario vacunal sobre el sistema inmune

1.3.3.1. Subpoblaciones linfocitarias

Los cambios experimentados por las diferentes subpoblaciones linfocitarias durante el periodo de tratamiento y vacuna o tratamiento y placebo se pueden observar en las **Tablas R.1.20.-R.1.21.** o en las **Figuras R.1.12.-R.1.18.**

Tabla R.1.20. Evolución de las subpoblaciones linfocitarias durante el periodo de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de la proporción de cada población (P*: P de la diferencia 0-12 entre grupos)

Subpoblaciones linfocitarias (%)	Grupo Placebo			Grupo Vacunado			P*
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 0	Mes 12	P	
Linfocitos totales (células/mm ³)	2436,15 ± 798,94	1950 ± 410,83	0,01	2320 ± 799,01	2073,85 ± 880,83	0,04	0,35
CD4 ⁺	37,5 ± 9,98	39,83 ± 9,28	0,34	38,96 ± 6,5	35,09 ± 7,55	0,07	0,04
CD8 ⁺	40,04 ± 8,22	34,31 ± 6,46	0,01	37,90 ± 6,76	33,22 ± 8,6	0,02	0,77
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,02 ± 0,57	1,2 ± 0,42	0,17	1,05 ± 0,3	1,13 ± 0,44	0,39	0,7
CD4 ⁺ CD28 ⁺	88,84 ± 10,5	92,03 ± 6,77	0,14	94,81 ± 5,72	95,41 ± 5	0,5	0,57
CD4 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	9,18 ± 8,9	7 ± 6,05	0,38	4,12 ± 5,29	3,52 ± 4,37	0,56	0,88
CD4 ⁺ CD38 ⁺	39,82 ± 11,8	40,66 ± 12,51	0,8	49,12 ± 8,69	55,23 ± 10,95	0,02	0,07
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	2,67 ± 1,57	2,04 ± 1,3	0,36	2,10 ± 1,28	3,15 ± 1,91	0,07	0,06
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	1,67 ± 0,97	1,9 ± 0,98	0,65	2,75 ± 5,97	6,8 ± 6,64	0,16	0,02
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	27,87 ± 11,86	30,27 ± 12,31	0,22	38,36 ± 8,69	39,89 ± 11,68	0,44	0,66
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	54,33 ± 11,11	62,59 ± 11,36	0,008	45,77 ± 8,41	49,07 ± 13,66	0,17	0,15
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	28,05 ± 12,40	31,35 ± 13,47	0,31	35,04 ± 12,29	40,25 ± 16,46	0,24	0,54
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	14,4 ± 11	27,63 ± 17,52	0,07	26,52 ± 27,68	42,89 ± 30,26	0,25	0,8
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	2,87 ± 2,01	2,68 ± 2,16	0,6	3,05 ± 2,46	4,62 ± 3,45	0,23	0,2
CD8 ⁺ CD28 ⁺	50,49 ± 13,76	54,46 ± 12,35	0,07	52,5 ± 10,7	57,59 ± 14,29	0,04	0,45
CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	37,5 ± 11,27	35,22 ± 11,26	0,33	34,35 ± 12,32	33,42 ± 12,08	0,58	0,73
CD8 ⁺ CD38 ⁺	29,5 ± 10,37	32,77 ± 12,34	0,35	28,82 ± 9,24	39,13 ± 10,8	0,002	0,06
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	6,77 ± 3,36	8,21 ± 4,62	0,27	5,78 ± 2,77	11,03 ± 5,94	0,001	0,09
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	3,19 ± 3,99	7,64 ± 4,89	0,05	4,3 ± 6,78	14,39 ± 8,44	0,01	0,17
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	50,76 ± 12,91	54,26 ± 11,03	0,08**	56,21 ± 12,48	51,65 ± 14,65	0,07	0,02
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	28,36 ± 15,09	33,16 ± 15,29	0,08	25,77 ± 11,62	31,59 ± 13,68	0,34	0,64
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	32,91 ± 10,36	35,12 ± 10,73	0,04	29,74 ± 11,37	31,52 ± 11,84	0,18	0,33
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	10,84 ± 7,17	28,09 ± 13,56	0,005	20,23 ± 28,92	34,55 ± 22,48	0,26	0,87
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	8,99 ± 4,79	9,39 ± 7,13	0,9	11,3 ± 5,64	14,6 ± 6,99	0,06	0,22
CD4 ⁺ CD25 ⁺	3,69	4,11 ± 2,24	0,1	2,04 ± 0,69	4,65 ± 3,04	0,1	0,2

- Linfocitos totales: Durante los 12 meses de tratamiento ambos grupos de pacientes experimentaron una tendencia al descenso en el número total de linfocitos, de forma significativa en ambos grupos entre el mes 0 y el mes 12 (p = 0,017 y 0,042 para GP y GV respectivamente) pero sin diferencias entre ambos (p = 0,56 para las AUC).

Resultados

Tabla R.1.21. Áreas netas bajo la curva de las diferentes subpoblaciones linfocitarias durante el periodo de tratamiento + vacuna o tratamiento + placebo (meses 0-12). . Se expresa la media y la desviación típica

Subpoblaciones linfocitarias	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Linfocitos totales	-1766,38 ± 5110,33	-768,35 ± 3202,04	0,56
CD4 ⁺	9,54 ± 71,59	-26,79 ± 33,73	0,11
CD8 ⁺	-33,44 ± 39,54	-31,02 ± 29,21	0,86
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2,01 ± 1,41	1,93 ± 1,07	0,11
CD4 ⁺ CD28 ⁺	0,94 ± 17,68	-3,52 ± 23,41	0,11
CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	0,60 ± 14,80	1,22 ± 25,42	0,59
CD4 ⁺ CD38 ⁺	-0,94 ± 61,88	10,38 ± 54,06	0,62
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	-3,9 ± 17,84	3,35 ± 19,28	0,33
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	13,12 ± 22,98	7,26 ± 75,91	0,79
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	98,70 ± 67,99	66,95 ± 36,35	0,92
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	0,61 ± 83,83	20,51 ± 149,64	0,68
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	91,39 ± 89,13	87,03 ± 42,83	0,97
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	91,67 ± 195,22	44,03 ± 328,67	0,65
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	17,58 ± 36,25	2,73 ± 38,1	0,32
CD8 ⁺ CD28 ⁺	-3,02 ± 44,41	-3,12 ± 54,15	0,54
CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	-13,35 ± 44,13	4,93 ± 59,69	0,79
CD8 ⁺ CD38 ⁺	29,5 ± 10,37	28,82 ± 9,24	0,67
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	7,45 ± 34,78	29,07 ± 44,12	0,17
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	40,47 ± 52,23	48,25 ± 102,54	0,11
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	13,49 ± 96,83	-20,69 ± 42,85	0,08
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	-3,08 ± 75,9	57,09 ± 176,10	0,27
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	30,87 ± 57,15	38,77 ± 43,55	0,9
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	159,25 ± 96,54	80,43 ± 346,45	0,44
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	35,69 ± 73,36	-1,14 ± 40	0,12
CD4 ⁺ CD25 ⁺	4,33 ± 7,05	3,82 ± 9,61	0,89

- Linfocitos CD4⁺: Mientras que el GP experimentó una tendencia al ascenso, el GV presentó una tendencia a disminuir el porcentaje de linfocitos CD4⁺, aunque cuando se compararon las AUC no hubo diferencias significativas entre grupos. Cuando lo que se valoró fue la diferencia neta entre los valores en el mes 0 y el mes 12, sí se llegaron a establecer diferencias entre grupos: mientras que el GP presentó un aumento del 5,2% (± 14,6 %) de los linfocitos T CD4⁺, el porcentaje del GV disminuyó un 9,1% (±18,9%) (p = 0,046).

La evolución de los linfocitos T CD4⁺ durante el periodo de tratamiento presentó una correlación significativa en sentido negativo con la evolución de las subpoblaciones con marcadores de activación como CD4⁺CD38⁺ (p = 0,044, r = -0,397 para la correlación entre las AUC entre los meses 0-12 de CD4⁺ y CD4⁺CD38⁺) o CD8⁺CD28⁻CD57⁺ (p

= 0,004, $r = -0,55$), pero no otras como $CD4^+CD38^+HLADR^+$ ($p = 0,58$), $CD8^+CD28^+$ ($p = 0,081$), $CD8^+CD38^+HLADR^+$ ($p = 0,397$) o las respuestas proliferativas ($p > 0,1$).

- Linfocitos $CD8^+$: En ambos grupos se observó un descenso significativo del porcentaje de linfocitos $CD8^+$ durante el periodo de tratamiento, si bien no existieron diferencias entre ambos grupos.
- Cociente $CD4^+/CD8^+$: En ambos grupos se pudo objetivar un ascenso no significativo del cociente $CD4/CD8$, sin existir diferencias entre ambos grupos.

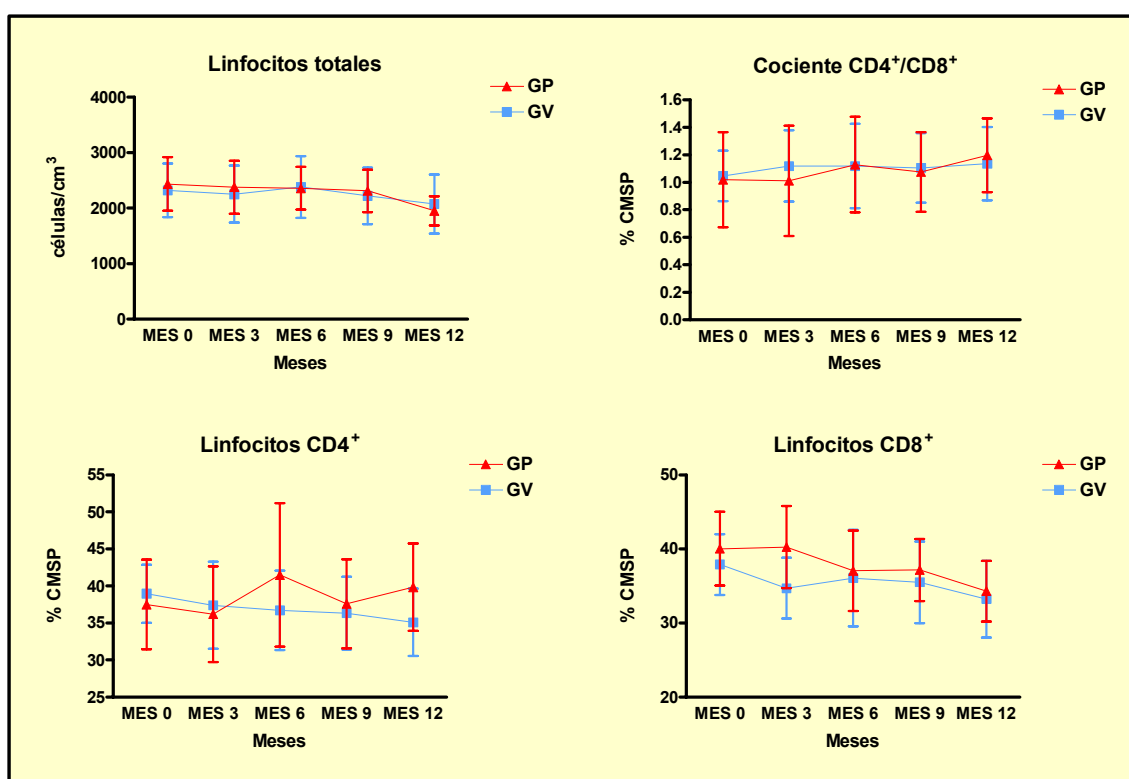


Figura R.1.12. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de los linfocitos totales y las subpoblaciones celulares de $CD4^+$ y $CD8^+$ y sus cocientes. Se representan la media y el 95% del IC en cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

- Linfocitos $CD4^+CD28^+$: En ambos grupos esta población se mantuvo estable durante el periodo de tratamiento, con un pequeño ascenso entre el mes 9 y el mes 12, no siendo significativos los cambios ni intra ni intergrupos.

- Linfocitos $CD4^+CD28^-CD57^+$: En ambos grupos esta población se mantuvo estable durante el periodo de tratamiento con un pequeño descenso entre el mes 9 y el mes 12, no siendo significativos los cambios ni intra ni intergrupos.

- Linfocitos $CD4^+CD38^+$: Se produjeron aumentos significativos en esta población en los meses 3 y 12 respecto al basal en el GV ($p = 0,04$ y $0,028$ respectivamente), cambios que no se observaron en el GP. Aunque cuando se analizó el área bajo la curva no se establecieron diferencias significativas entre los grupos, las diferencias entre los meses 0-3 y 0-12 entre grupos tenían una marcada tendencia a la significación estadística ($p = 0,069$ y $p = 0,07$ respectivamente).

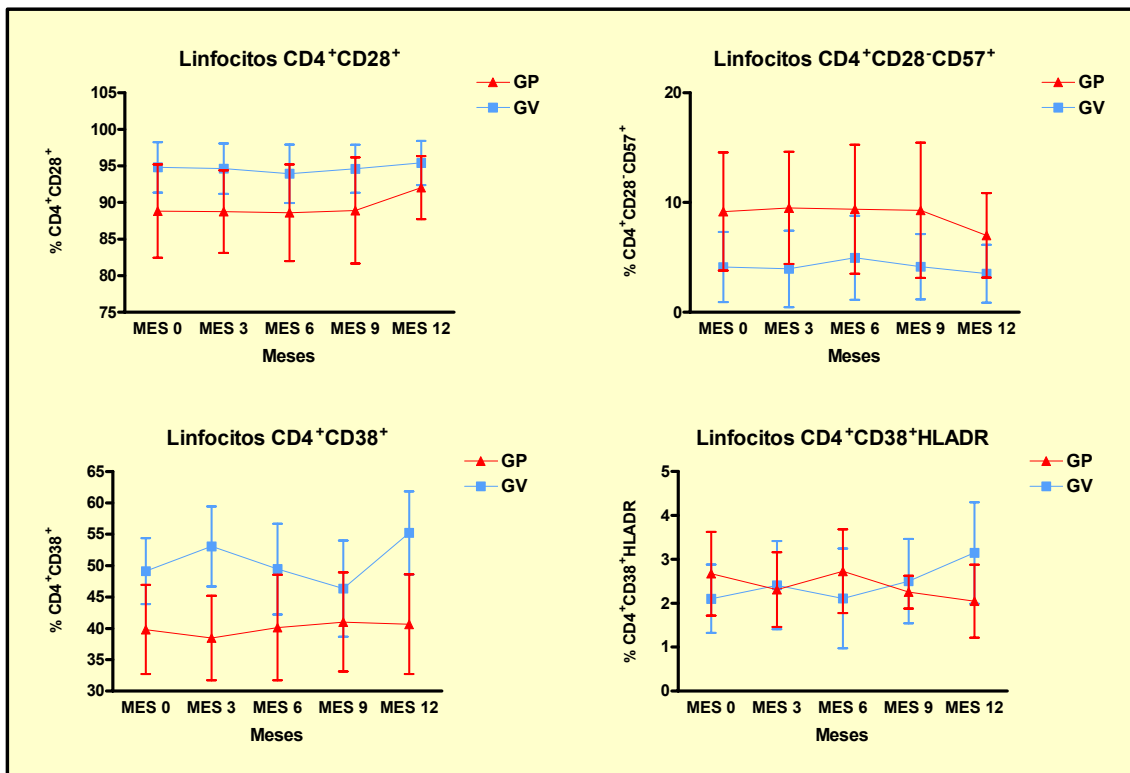


Figura R.1.13. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de las subpoblaciones celulares de $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CD28^-CD57^+$, $CD4^+CD38^+$ y $CD4^+CD38^+HLADR^+$. Se representan la media y el 95% del IC en cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos $CD4^+CD38^+HLADR^+$: Al igual que la subpoblación anterior, mientras que en el GP había una estabilidad durante el periodo de tratamiento, con cierta

tendencia global a la disminución (no significativa), en el GV se observó un aumento de esta población en el mes 3 y, sobre todo en el mes 12, creando diferencias intra e intergrupos, aunque sin llegar a alcanzar la significación estadística ($p = 0,075$ entre mes 0-12 y $p = 0,06$ para la comparación intergrupos).

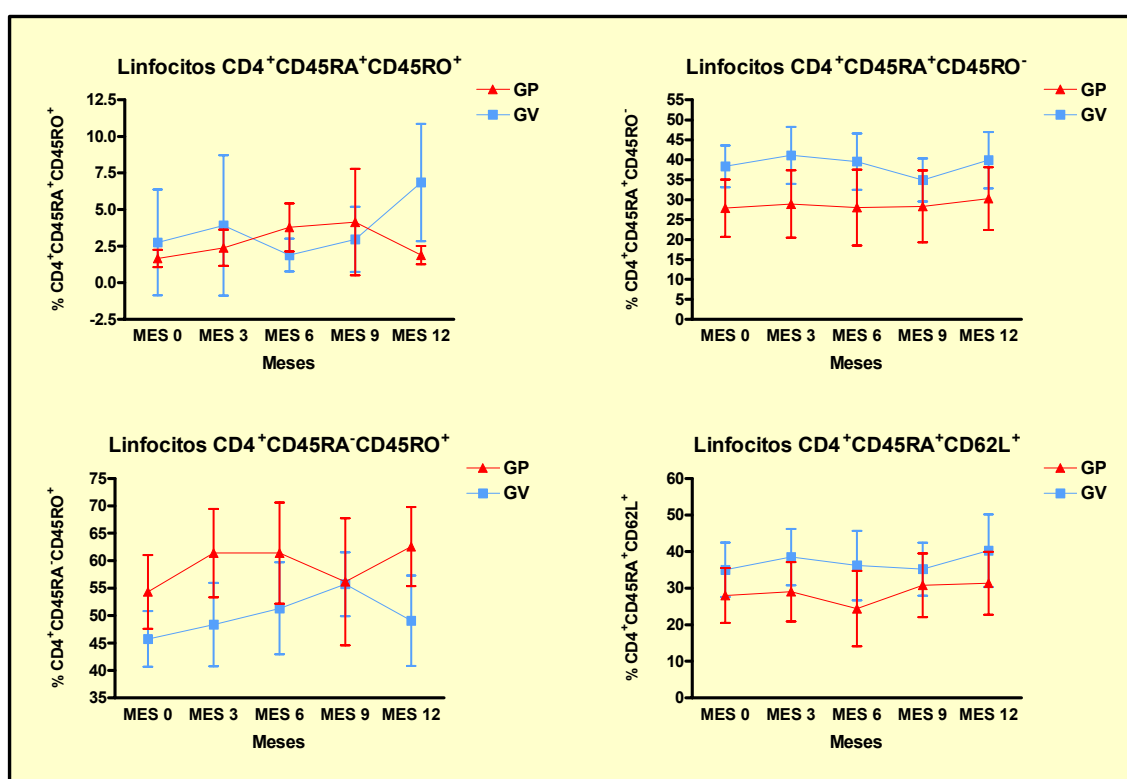


Figura R.1.14. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de subpoblaciones celulares de $CD4^+CD45RA^+CD45RO^+$, $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$, $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$ y $CD4^+CD45RA^+CD62L^+$. Se representan la media y el 95% del IC en cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos $CD4^+CD45RA^+CD45RO^+$: El comportamiento de esta población durante el periodo de tratamiento difirió en el GV y GP a partir del mes 3, de forma que en el GV se produjo un descenso en mes 6 y un ascenso en mes 12, mientras que en el GP se produjo un ascenso en mes 6 y un descenso en mes 12. Estos cambios a nivel intragrupo fueron significativos en el GP para las diferencias 0-6 y 6-12 ($p = 0,007$ y $p = 0,02$ respectivamente), y en el GV sólo para las diferencias 6-12 ($p = 0,01$). En la comparación entre grupos, los cambios entre los meses 6-12 y 9-12 fueron significativos ($p = 0,007$ y $0,006$, respectivamente).

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: En el GV se observó un aumento en el mes 12 con tendencia a la significación estadística ($p = 0,07$ entre mes 9 y mes 12) que no se observó en el GP, aunque no existieron diferencias significativas en los cambios entre grupos.
- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺: Esta población experimentó en ambos grupos un aumento progresivo significativo (diferencia entre 0-12 en GP $p = 0,008$, diferencia entre 0-9 en GV $p = 0,001$), que en el caso de GV se vió interrumpido por un descenso en el mes 12 (con tendencia a la significación estadística, diferencia 9-12 $p = 0,062$). El aumento entre grupos no fue diferente, pero sí el cambio producido entre los meses 9-12, creciente en GP y decreciente en GV ($p = 0,008$).
- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺: Se produjo un discreto aumento similar en los dos grupos, sin cambios significativos intra o intergrupos en esta subpoblación.
- Linfocitos CD8⁺CD28⁺: La tendencia en ambos grupos fue a un mantenimiento de esta población con una tendencia al aumento que se hizo significativa en el mes 12 en el GV ($p = 0,046$), y con tendencia en el GP ($p = 0,07$). No se hallaron diferencias en la evolución entre grupos.
- Linfocitos CD8⁺CD28⁻CD57⁺: Esta población se mantuvo relativamente estable durante el periodo de tratamiento sin cambios significativos intra o intergrupos.
- Linfocitos CD8⁺CD38⁺: Los niveles de estos linfocitos aumentaron de forma significativa en el GV hasta el mes 12 ($p = 0,002$ en GV para diferencia 0-12), presentando tendencia a la significación estadística comparado con el GP.
- Linfocitos CD8⁺CD38⁺HLADR⁺: De forma paralela a la población de CD8⁺CD38⁺, esta población aumentó durante el periodo de tratamiento en ambos grupos. En el caso del GV se produjeron aumentos significativos respecto a la determinación anterior en los meses 3 y 12 ($p = 0,005$ y $0,02$ para las diferencias entre los meses 0-3 y 9-12, respectivamente). Por el contrario, estas diferencias no fueron significativas en el GP. Sin embargo, las comparaciones entre grupos no mostraron diferencias significativas entre estos cambios, únicamente una tendencia en la diferencia 0-12 ($p = 0,09$).

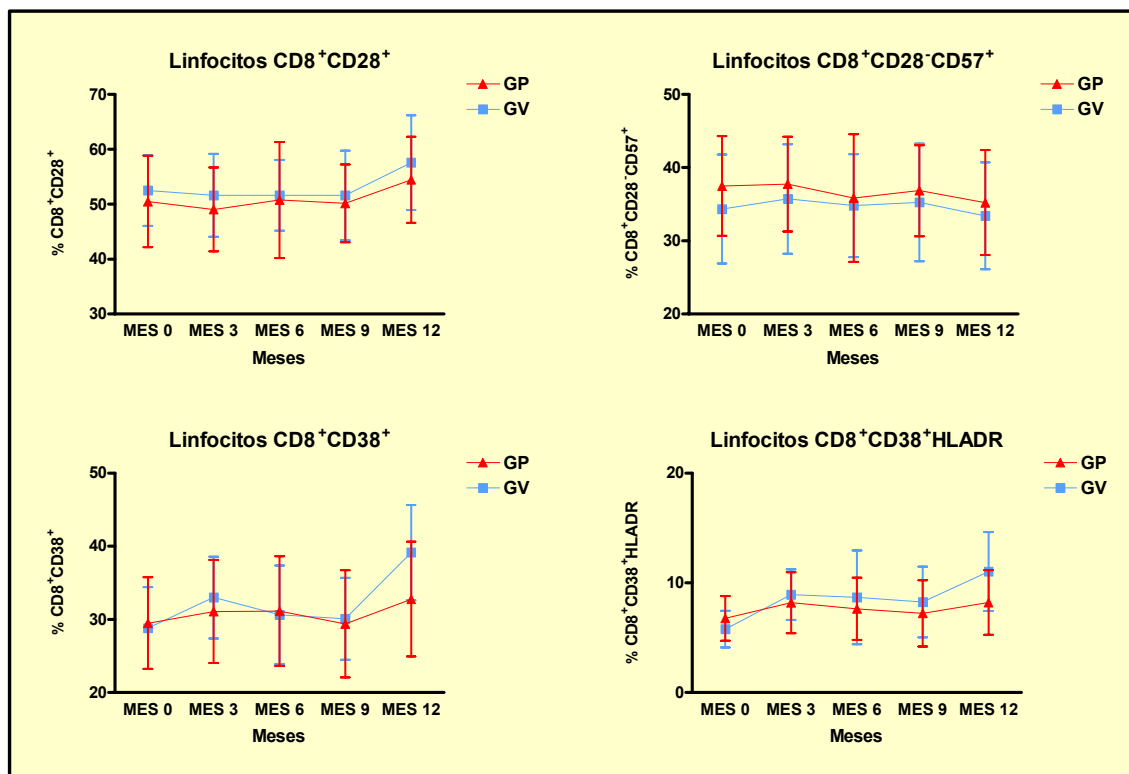


Figura R.1.15. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de las subpoblaciones celulares de CD8⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁻CD57⁺, CD8⁺CD38⁺ y CD8⁺CD38⁺HLADR⁺. Se representan la media y el 95% del IC en cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺: En ambos grupos esta subpoblación presentó un aumento importante significativo durante el periodo de tratamiento, sobre todo entre el mes 9-12 en el GV ($p = 0,016$), aunque la comparación de los cambios entre grupos no fue significativa.

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: Esta población presentó un comportamiento diferente entre los grupos. Así, mientras que en el GV se produjo un descenso, en el GP la población se mantuvo o aumentó, presentando los cambios entre grupos tendencia a la significación estadística en las AUC ($p = 0,08$) y significación estadística en las diferencias 0-12 ($p = 0,02$).

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺: En ambos grupos estas poblaciones aumentaron hasta el mes 6-9 durante todo el tratamiento, significativamente en el GP en las diferencias 0-3 ($p = 0,04$) y en el GV en las diferencias 0-9 ($p = 0,009$). Sin embargo, en el GV

se produjo un descenso significativo entre los meses 9-12 ($p = 0,031$) que no se vió en el GP. Esta caída final presentó tendencia a la significación estadística cuando se comparó intergrupos ($p = 0,067$ para las diferencias 6-12 entre grupos).

- Linfocitos $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$: En esta subpoblación no se produjeron cambios significativos destacables ni intra ni intergrupos.

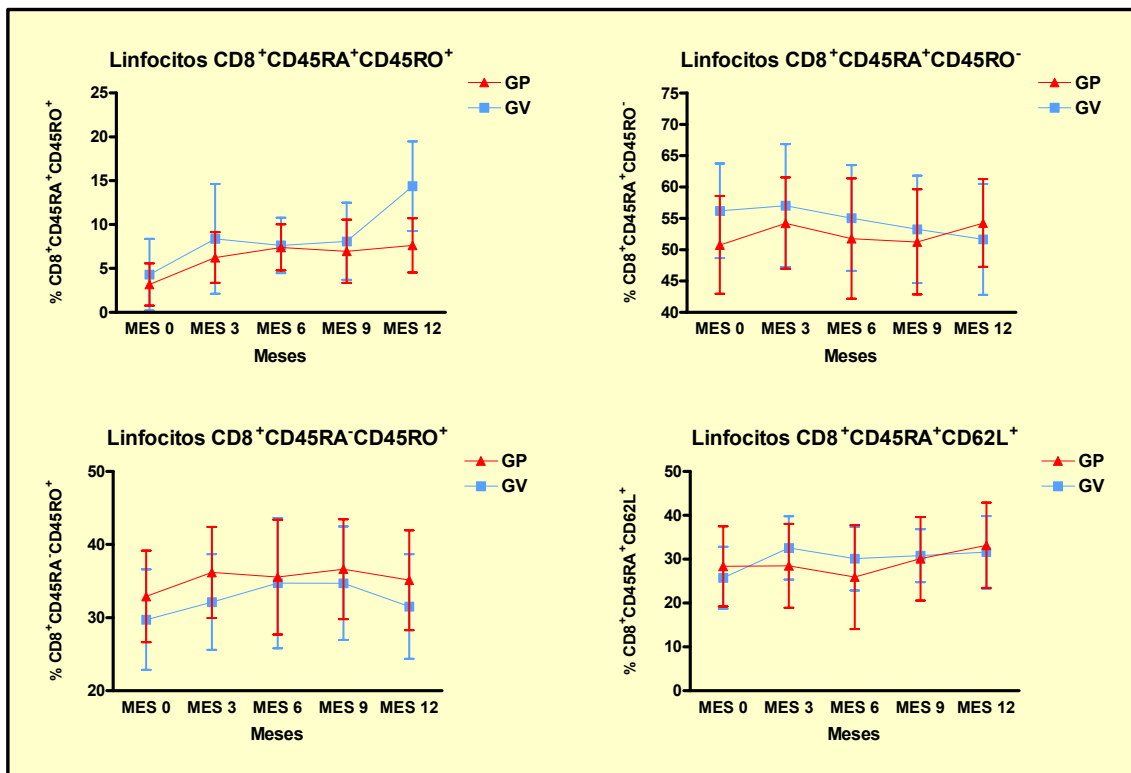


Figura R.1.16. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de subpoblaciones celulares de $CD8^+CD45RA^+CD45RO^+$, $CD8^+CD45RA^+CD45RO^-$, $CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$ y $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$. Se representan la media y el 95% del IC en cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos $CD4^+CXCR4^+$: En el GP se produjo un aumento progresivo de esta población con picos en los meses 3 ($p = 0,016$ para diferencia 0-3) y 9 ($p = 0,016$ para diferencia 0-9) que no se observaron en el GV. Las diferencias entre grupos no fueron significativas.

- Linfocitos $CD4^+CCR5^+$: En general se produjo un aumento en esta población, que en el GP fue sobre todo hasta el mes 9 ($p = 0,023$ entre mes 3 y 6), y en el GV entre el mes

9 y 12 ($p = 0,028$). La evolución diferente entre el mes 9 y 12 presentó tendencia a la significación ($p = 0,07$).

- Linfocitos $CD8^+CXCR4^+$: En ambos grupos aumentó esta población durante el tratamiento, de forma más significativa en el caso del GP ($p = 0,005$ entre mes 0-12 para GP y $p = 0,027$ entre mes 6-12 para GV).
- Linfocitos $CD8^+CCR5^+$: En el GP se produjo un aumento progresivo hasta el mes 9 ($p = 0,06$ entre mes 0 y 6). Por el contrario, el GV presentó descensos en los meses 3 y 9 con subidas significativas posteriores ($p = 0,056$ entre mes 3 y 6 y $p = 0,01$ entre mes 9 y 12). Sin embargo sólo los cambios entre mes 9 y 12 fueron significativamente diferentes entre grupos ($p = 0,047$).

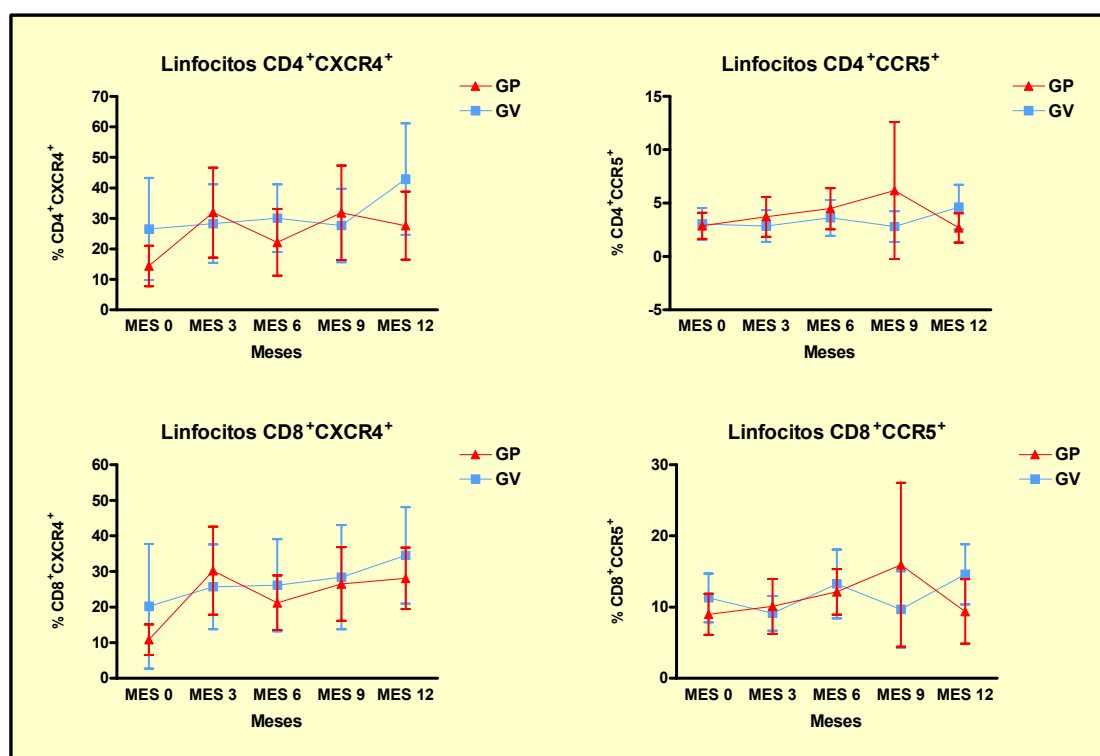


Figura R.1.17. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de las subpoblaciones celulares de $CD4^+CXCR4^+$, $CD4^+CCR5^+$, $CD8^+CXCR4^+$ y $CD8^+CCR5^+$. Se representan la media y el 95% del IC en cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos $CD4^+CD25^+$: En el GV se observó un aumento en el mes 3 (no significativo) y en el mes 12, significativo ($p = 0,039$). Por otro lado, en el GP también se

produjo un aumento entre el mes 6 y 9-12 ($p = 0,01$ entre 6 y 12). Las diferencias entre grupos no fueron significativas.

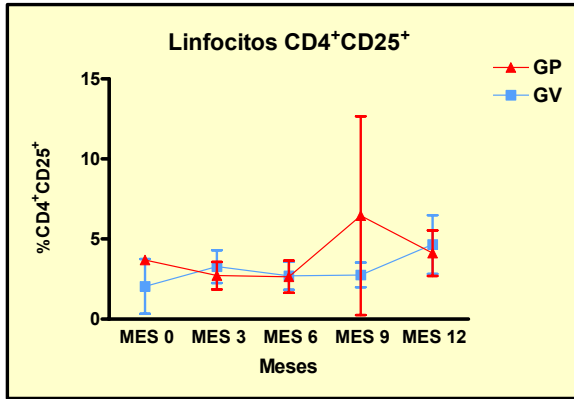


Figura R.1.18. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de la subpoblación linfocitaria CD4⁺CD25⁺. Se representan la media y el 95% del IC en cada determinación (GP Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

1.3.3.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación

Tabla R.1.22. Evolución de las subpoblaciones linfocitarias en proliferación durante el periodo de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de la proporción de cada población (P*: P de la diferencia 0-12 entre grupos)

Subpoblaciones linfocitarias en proliferación (%)	Grupo Placebo			Grupo Vacunado			P*
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 0	Mes 12	P	
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	1,15 ± 0,58	2,05 ± 0,52	<0,001	1,05 ± 0,49	1,97 ± 1,01	0,006	0,79
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	0,63 ± 0,47	1,59 ± 0,89	0,013	0,67 ± 0,42	1,87 ± 1,67	0,033	0,65
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	0,7 ± 0,38	1,52 ± 1,12	0,017	0,44 ± 0,16	1,56 ± 1,59	0,027	0,72
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	0,84 ± 0,67	1,56 ± 0,82	0,028	0,67 ± 0,49	1,15 ± 0,77	0,13	0,4
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	1,53 ± 1,11	2,70 ± 2,05	0,054	0,92 ± 1	2,12 ± 1,39	0,043	0,94

Los cambios experimentados en la proliferación de las subpoblaciones linfocitarias T CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo *naïve* durante el periodo de tratamiento y vacuna o tratamiento y placebo se monitorizaron mediante el marcaje con el marcador intracelular Ki-67, y se pueden observar en la Figura R.1.19. o en las Tablas R.1.22.-R.1.23.. En general, tanto las poblaciones CD4⁺ como CD8⁺ *naïve* en proliferación experimentaron en ambos grupos (GP y GV) un aumento significativo a lo largo del periodo de tratamiento, sin hallarse diferencias entre los grupos en ninguno de los cambios a lo largo de los primeros 12 meses.

Tabla R.1.23. Áreas bajo la curva neta de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en proliferación durante el periodo de tratamiento + vacuna o tratamiento + placebo. Se expresa la media y la desviación típica (meses 0-12).

Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	6,83 ± 6,43	9,93 ± 12,24	0,43
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	4,08 ± 6,31	6,7 ± 8,52	0,26
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	4,49 ± 7,93	8,39 ± 6,92	0,19
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	3,32 ± 11,57	5,71 ± 7,7	0,54
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	2,03 ± 12,73	7,77 ± 7,35	0,17

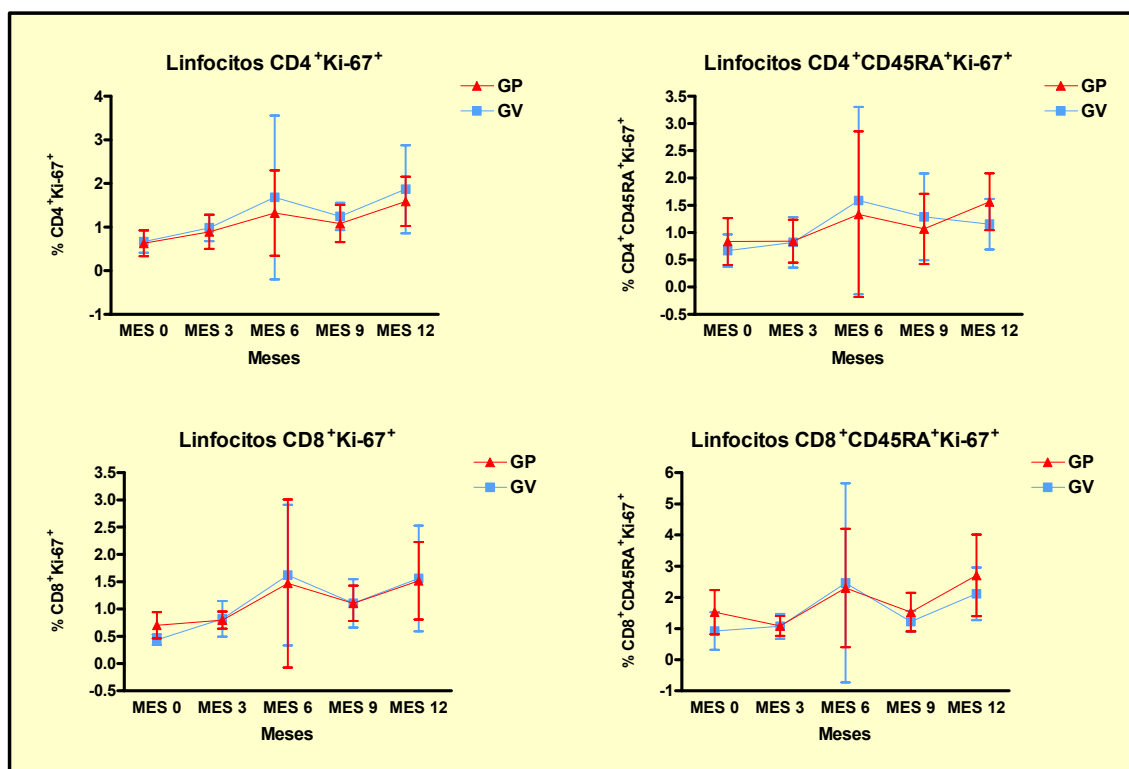


Figura R.1.19. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de subpoblaciones linfocitarias en proliferación (con el marcaje Ki-67⁺) de CD4⁺, CD4⁺CD45RA⁺, CD8⁺ y CD8⁺CD45RA⁺. Se representan la media y el 95% del IC en cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

1.3.3.3. Respuestas linfoproliferativas

Los cambios experimentados en las respuestas proliferativas frente a diferentes activadores durante el periodo de tratamiento y vacuna o tratamiento y placebo se pueden observar en las **Figuras R.1.20.-R.1.22.** o en las **Tablas R.1.24-R.1.25.**

- Respuestas linfoproliferativas a mitógenos (**Figura R.1.20.**):

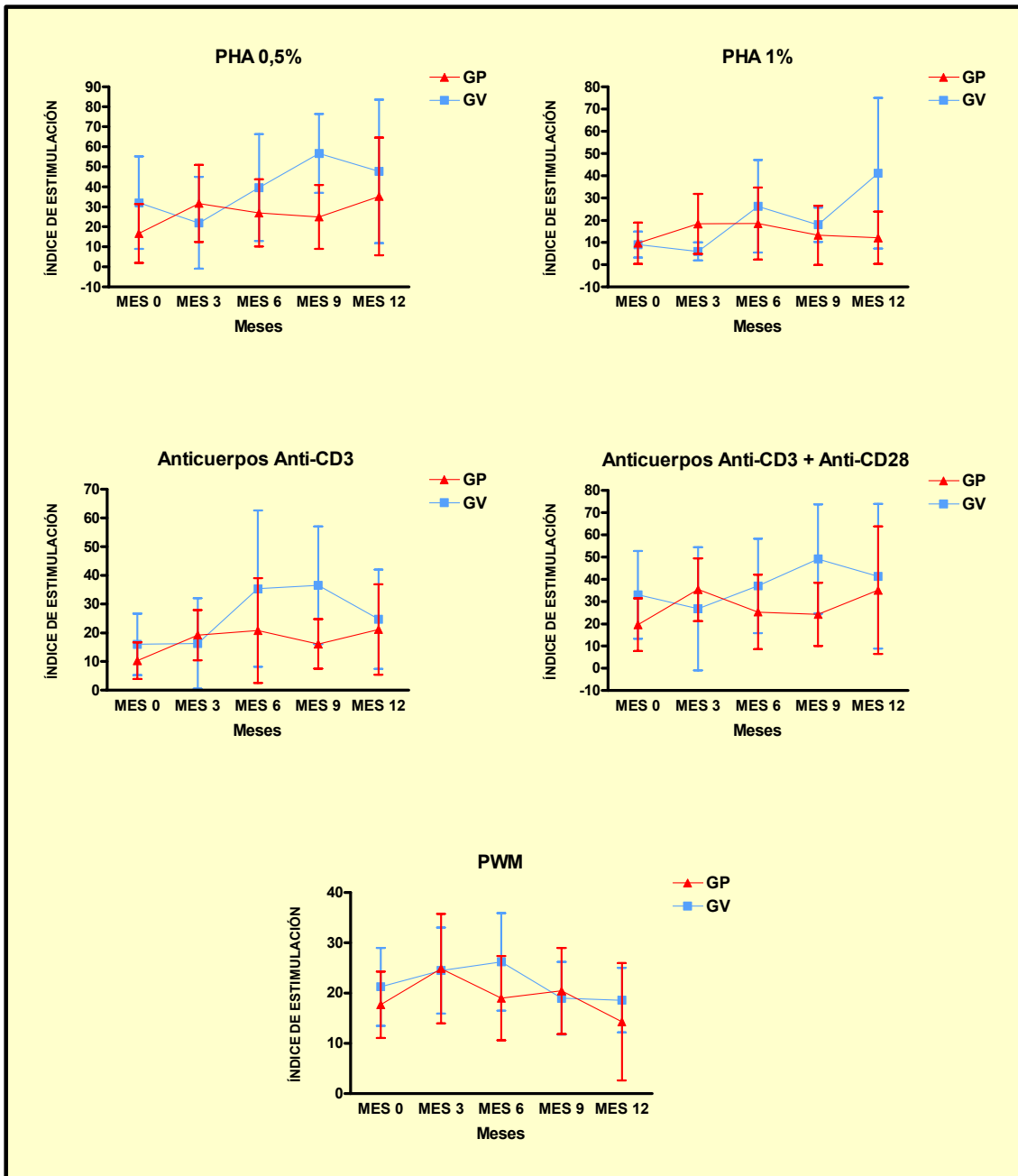


Figura R.1.20. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de las respuestas linfoproliferativas a mitógenos. Se representa la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado PHA: Fitohemaglutinina; PWM: Mitógeno Pokeweed)

- Fitohemaglutinina al 0,5%: Se produjo un aumento en el GV del SI significativo entre el mes 0 y el mes 9 ($p = 0,01$) con tendencia a la significación estadística en la diferencia entre grupos ($p = 0,055$).
- Fitohemaglutinina al 1%: En el GV se produjo un aumento del SI durante el periodo de tratamiento, sobre todo entre mes 3 y mes 9 ($p = 0,03$) que no se observó

en el GP, siendo significativo el cambio producido entre grupos ($p = 0.009$ entre mes 3 y 12) (aunque las diferencias entre mes 0-12 o el AUC entre grupos no fueron significativamente diferentes).

- Anticuerpos anti-CD3: Al igual que con los otros mitógenos, se observó un aumento progresivo del SI durante el periodo de tratamiento en el GV, fundamentalmente significativo hasta el mes 9 ($p = 0,04$ para la diferencia 0-9), que no ocurrió en el GP (aunque las diferencias entre los grupos no fueron significativas).

- Anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28: Se produjo un efecto similar al mitógeno anterior, pero en este caso la diferencia 0-9 en el GV no alcanzó la significación estadística ($p = 0,08$). Igualmente, las diferencias entre grupos no llegaron a ser significativas.

- Mitógeno Pokeweed: Es el mitógeno que en general sufrió menos influencia en el GV. Su SI aumentó en este grupo también hasta el mes 6 para posteriormente disminuir, aunque los cambios no fueron significativos intragrupo. En el GP se produjo un descenso que en el mes 12 alcanzó la significación estadística ($p = 0,032$ para la diferencia 0-12). Los cambios intergrupos no fueron significativos.

- Respuestas linfoproliferativas a antígenos comunes (**Figura R.1.21.**):

- Toxoide tetánico: Mientras que el SI en el GP no presentó modificaciones e incluso descendió en el mes 3 ($p = 0,006$), en el GV aumentó, sobre todo en los meses 3 y 9 ($p = 0,008$ entre el mes 0 y 3), aunque la vacunación antitetánica no se produjo hasta el mes 10. Las diferencias intergrupos no fueron significativas.

- Antígenos del CMV: En general las respuestas proliferativas a los antígenos del CMV se mantuvieron estables durante el periodo de tratamiento, sin diferencias ni inter ni intragrupos.

Tabla R.1.24. Evolución de las respuestas linfoproliferativas durante el periodo de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica (P* de la diferencia 0-12 intragrupo; P de la diferencia 0-12 intergrupos; SI: índice de estimulación; PHA: Fitonemaglutinina; PWM: Mitógeno Pokeweed; TT: Toxide tetánico; CMV: Citomegalovirus)**

SI	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						P**
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	P*	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	P*	
PHA 0,5	16,75 ± 20,6	31,72 ± 30,35	26,94 ± 23,38	24,97 ± 23,74	35,23 ± 46,27	0,2	32,07 ± 34,4	21,99 ± 32,08	39,63 ± 41,95	56,72 ± 31	47,75 ± 50,15	0,6	0,79
PHA 1%	9,71 ± 13,02	18,35 ± 21,34	18,49 ± 22,65	13,26 ± 19,8	12,07 ± 18,45	0,5	9,03 ± 8,76	5,94 ± 5,7	26,28 ± 32,7	18 ± 12,71	41,12 ± 47,38	0,03	0,13
Anti-CD3	10,26 ± 8,95	19,21 ± 13,8	20,79 ± 25,56	16,1 ± 12,81	21,14 ± 24,82	0,11	15,94 ± 15,98	16,27 ± 22,03	35,34 ± 42,82	36,57 ± 33,94	24,72 ± 24,15	0,57	0,68
AntiCD3- antiCD28	19,6 ± 16,55	35,37 ± 22,26	25,31 ± 23,42	24,21 ± 21,21	35,1 ± 42,66	0,22	33 ± 29,34	26,78 ± 38,73	37,03 ± 33,44	49,15 ± 40,68	41,36 ± 45,55	0,83	0,64
PWM	17,68 ± 10,39	24,87 ± 17,18	18,97 ± 11,71	20,4 ± 13,53	14,3 ± 18,38	0,032	21,25 ± 11,57	24,47 ± 12,74	26,2 ± 15,27	18,97 ± 11,94	18,58 ± 8,96	0,67	0,46
TT	6,83 ± 11,18	1,86 ± 1,81	2,15 ± 1,62	1,96 ± 1,64	1,72 ± 1,24	0,19	2,22 ± 2,43	4,47 ± 7,16	2,58 ± 3,44	4,29 ± 5,07	2,16 ± 1,51	0,44	0,17
CMV	2,62 ± 1,4	7,18 ± 11,95	2,79 ± 2,34	2,6 ± 3,2	2,18 ± 2	0,61	1,95 ± 0,67	2,79 ± 2,53	3,06 ± 4,5	2,42 ± 2,63	1,98 ± 1,59	0,58	0,84
gp160	2,32 ± 2,24	2,3 ± 0,94	1,3 ± 0,58	1,76 ± 1,18	1,59 ± 0,94	0,36	1,7 ± 1,34	2,99 ± 4,63	3,32 ± 4,25	3,97 ± 5,97	1,73 ± 1,39	0,46	0,24
p24	5,53 ± 6,81	3,96 ± 5,92	1,7 ± 0,75	2,1 ± 0,92	2,19 ± 1,72	0,15	2,39 ± 2,98	4,41 ± 8,85	2,63 ± 3,37	3,85 ± 6,17	1,37 ± 0,41	0,65	0,18

Tabla R.1.25. Áreas bajo la curva neta (AUC) de las diferentes respuestas linfoproliferativas durante el periodo de tratamiento + vacuna o tratamiento + placebo (meses 0-12). Se expresan las medias y las desviaciones típicas

AUC índices de estimulación	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Fitohemaglutinina 0,5%	25,72 ± 202,62	83,86 ± 352,12	0,61
Fitohemaglutinina 1%	71,83 ± 168,93	90,15 ± 168,04	0,78
Anticuerpo anti-CD3	84,6 ± 134,85	113,02 ± 211,22	0,69
Anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28	95,7 ± 179	50,18 ± 310,69	0,65
Mitógeno Pokeweed	19,49 ± 129,84	13,94 ± 121,35	0,91
Toxoide Tetánico	-45,23 ± 112,88	11,14 ± 38,43	0,1
Antígenos de Citomegalovirus	-5,43 ± 44,08	4 ± 23,04	0,5
gp160 del VIH	-4,88 ± 23,36	8,11 ± 25,08	0,15
p24 del VIH	-29,42 ± 67,75	8,05 ± 42,07	0,04

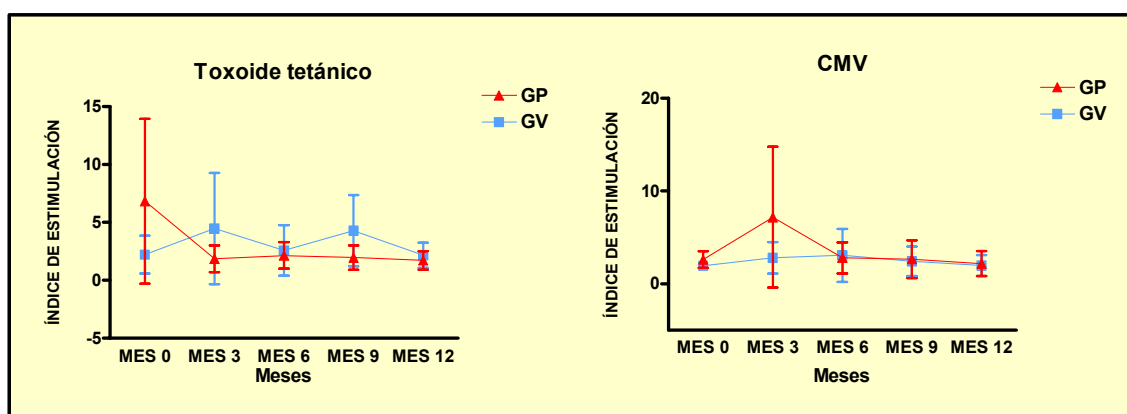


Figura R.1.21. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de las respuestas linfoproliferativas a antígenos comunes. Se representa la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; CMV: Citomegalovirus)

- Respuestas linfoproliferativas a proteínas del VIH (**Figura R.1.22.**):

- gp160: Las tendencias que presentaron ambos grupos fueron invertidas.

Así, el GP presentó una tendencia a disminuir las respuestas proliferativas frente al VIH, mientras que en el GV se observó una tendencia a aumentarlas, aunque sin lograr la significación estadística. Así mismo, tampoco las diferencias entre grupos lograron la significación estadística.

- p24: Se comportaron de forma similar a las anteriores, de forma que en

el GV hubo una tendencia a aumentar las respuestas proliferativas frente a p24, mientras que en

el GP se mantuvieron e incluso disminuyeron. En este caso, las diferencias entre los meses 0 y 9 intergrupos tuvieron tendencia a la significación estadística ($p = 0,059$), y, sobre todo, el AUC fue significativamente mayor en el GV que en el GP ($p = 0,04$).

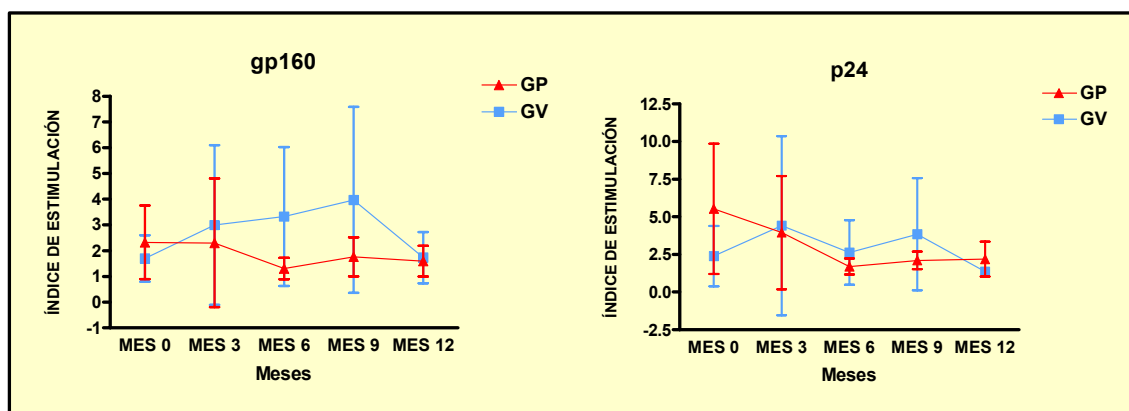


Figura R.1.22. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de las respuestas linfoproliferativas a antígenos del VIH. Se representa la media y el 95% del IC para cada determinación (Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

1.3.3.4. Respuestas $CD8^+$ específicas frente al VIH

Los cambios experimentados en las respuestas $CD8^+$ específicas frente al VIH durante el periodo de tratamiento y vacuna o tratamiento y placebo se pueden observar en la **Figura R.1.23.** o en las **Tablas R.1.26-27.**

Tabla R.1.26. Áreas bajo la curva neta (AUC) de las respuestas específicas $CD8^+$ a diferentes antígenos del VIH durante el periodo de tratamiento + vacuna o tratamiento + placebo (meses 0-12). Se expone la media y la desviación típica de cada variable

AUC respuestas $CD8^+$ anti-VIH	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Respuestas $CD8^+$ anti-VIH totales	3127,78 ± 8497,42	3018,54 ± 5832,76	0,97
Nº péptidos	-1,41 ± 12,48	2,42 ± 16,86	0,53
Respuestas totales/péptidos	1052,46 ± 1386,9	344,11 ± 1727,31	0,27
P24	1295,44 ± 3252,8	1015 ± 4055,1	0,85
Small	915,42 ± 2649,48	639,54 ± 1328,22	0,74
P 17	762,25 ± 3993,76	737,97 ± 1682,48	0,98
Gag total	3330,96 ± 7617,87	2820,92 ± 5854,64	0,85

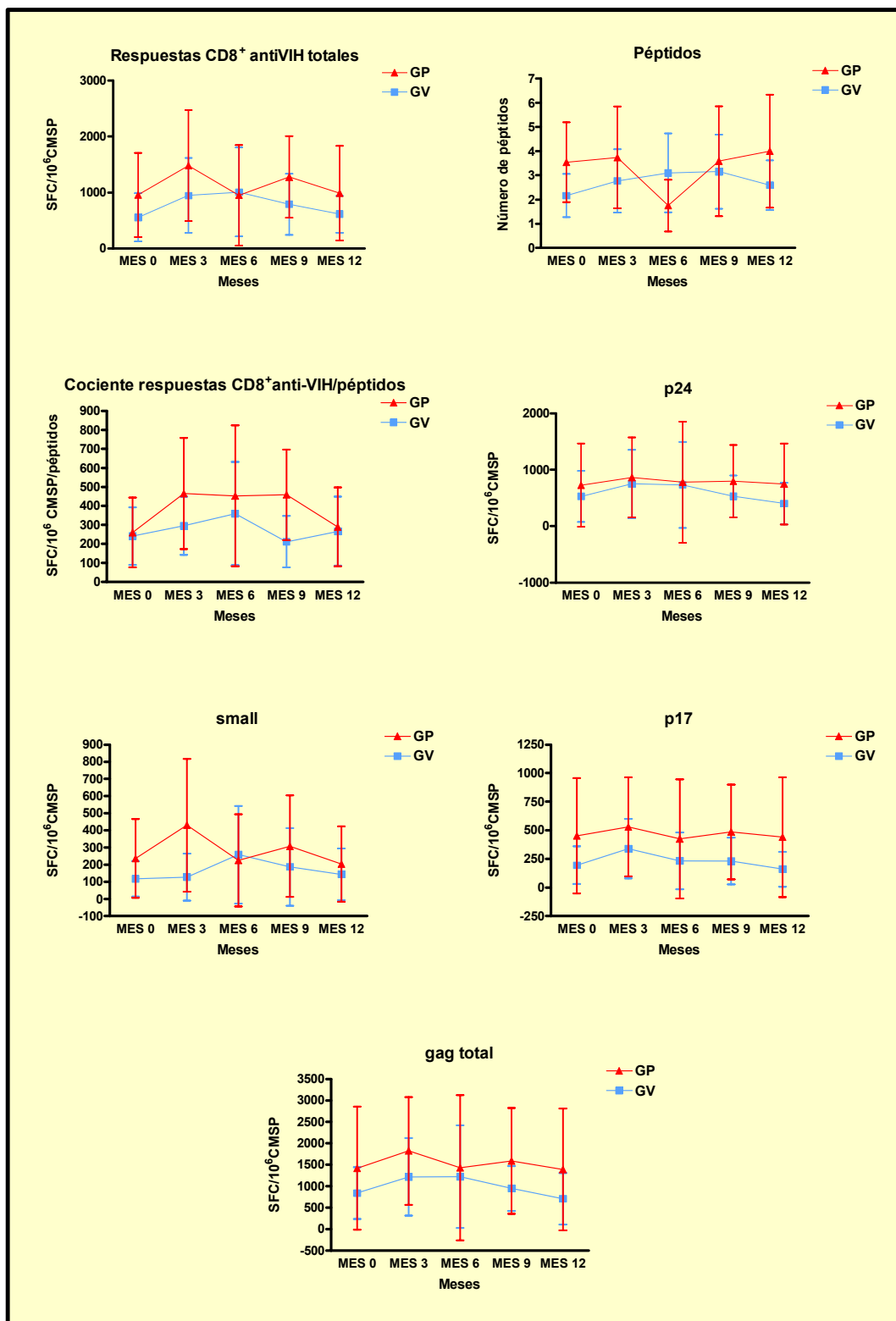


Figura R.1.23. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de las respuestas específicas CD8⁺ frente a diferentes antígenos del VIH. Se muestra la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de Spots (*Spots forming cells*); CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; small: pool de péptidos de gag)

Tabla R.1.27. Evolución de respuestas CD8⁺ específicas frente al VIH durante el período de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica (resp/pep: cociente de la respuesta total CD8⁺ específica anti-VIH/número de péptidos; smali: pool de péptidos de gag; P*: P de la diferencia 0-12 dentro de cada grupo; P de la diferencia 0-12 intergrupos)**

Respuestas CD8 ⁺	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						P**
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	P*	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	P*	
Respuesta CD8 ⁺ total	955,64 ± 1120,8	1480,25 ± 1559,53	951,5 ± 1072,61	1278,83 ± 1148,76	988,2 ± 1182,29	0,77	556,25 ± 677,65	948,23 ± 1105,62	1009,5 ± 1108,94	790,23 ± 904,4	613,4 ± 462,73	0,85	0,86
Nº péptidos	3,54 ± 2,46	3,75 ± 3,31	1,75 ± 1,28	3,58 ± 3,58	4 ± 3,26	0,3	2,17 ± 1,4	2,77 ± 2,17	3,1 ± 2,28	3,15 ± 2,54	2,6 ± 1,43	0,86	0,55
Cociente resp/pep	260,09 ± 273,4	465,25 ± 459,55	453,5 ± 443,98	458,83 ± 374,26	289,4 ± 289,57	0,32	241,5 ± 238,11	295 ± 254,81	359,5 ± 380,36	211,69 ± 224,68	266,7 ± 253,11	0,87	0,61
P24	728,64 ± 1103,05	863,33 ± 1120,28	783,12 ± 1287,62	799,92 ± 1012,83	747,3 ± 1008,08	0,82	528,75 ± 714,0	750,46 ± 1006,66	732,5 ± 1064,87	530,23 ± 609,53	403,8 ± 512,89	0,51	0,79
Small	236,54 ± 340,24	430,17 ± 609,15	225,25 ± 321,88	308,08 ± 466,43	207,1 ± 306,15	0,4	118 ± 163,91	127,61 ± 228,24	258,5 ± 398,13	187,23 ± 375,36	144 ± 211,87	0,89	0,55
p17	453,64 ± 751,27	531 ± 681,35	425 ± 624,85	486,25 ± 652,06	440,4 ± 732,02	0,83	196 ± 258,64	340,46 ± 427,92	233,8 ± 347,03	232,31 ± 339,21	160,1 ± 214,42	0,69	0,73
Gag total	1418,73 ± 2136,26	1825,42 ± 1979,54	1433,37 ± 2025,03	1593,92 ± 1942,93	1391,6 ± 1986,66	0,78	842,83 ± 949,27	1218,46 ± 1489,87	1224,7 ± 1672,44	949,69 ± 868,56	707,9 ± 840,87	0,72	0,97

- Respuestas CD8⁺ específicas antiVIH totales (magnitud de la respuesta): Presentaron a lo largo del periodo de tratamiento una cierta estabilidad, sin grandes cambios entre los meses estudiados, excepto un ascenso significativo entre el mes 0 y 3 en el GV ($p = 0,026$), con un descenso posterior entre los meses 6 y 12 ($p = 0,06$). No se hallaron diferencias en los cambios entre los grupos.

- Número de péptidos reconocidos (amplitud de la respuesta): Al igual que con las respuestas CD8⁺ anti-VIH totales, existió una tendencia en el GV a aumentar en los 6 primeros meses y luego a disminuir. En este caso hubo significación estadística en el cambio entre los meses 6 y 12 ($p = 0,041$). Por otro lado, en el GP se produjo un descenso significativo entre los meses 3 y 6 ($p = 0,039$). De hecho, las tendencias invertidas en ambos grupos entre los meses 6 y 12 (aumento en el GP y descenso en el GV) fueron significativamente diferentes ($p = 0,022$).

- Cociente respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH totales/número de péptidos: Al igual que las dos variables anteriores, aumentaron hasta el mes 6 y luego descendieron en el GV. El GP presentó una evolución similar, pero el ascenso se produjo hasta el mes 9 ($p = 0,029$ para la diferencia 0-9 en GP y $p = 0,072$ para la diferencia 0-6 en GV; $p = 0,046$ para la diferencia 9-12 en GP y $0,025$ para la diferencia 6-9 en GV). Nuevamente, las diferentes tendencias entre los meses 9 y 12 en los 2 grupos tuvieron tendencia a la significación estadística ($p = 0,06$).

- Respuestas específicas anti-p24: Como el resto de respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH, en el GV aumentaron ligeramente hasta el mes 6 para luego descender, siendo únicamente significativo el ascenso entre los meses 0 y 3 ($p = 0,04$). Los cambios entre los grupos no fueron significativamente diferentes.

- Respuestas específicas anti-small: Al igual que las demás, presentaron una tendencia a aumentar en el GV hasta el mes 6 ($p = 0,09$ en la diferencia 3-6), y posteriormente disminuyeron ($p = 0,043$ diferencia 6-12). En el GP, se produjo un aumento significativo en el

mes 3 ($p = 0,038$) que luego descendió. Entre grupos, el descenso entre los meses 3 y 6 en GP y el ascenso en GV fueron significativamente diferentes ($p = 0,03$).

- Respuestas específicas anti-p17: También en este caso se produjo una tendencia al aumento en el GV hasta el mes 3 ($p = 0,017$), con un descenso posterior, sobre todo a partir del mes 6 ($p = 0,068$ para la diferencia 6-12). Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

- Respuestas específicas anti-gag: Se repitió el patrón de ascenso en el GV entre los meses 0 y 6 ($p = 0,041$ para la diferencia 0-3) y el descenso posterior ($p = 0,043$ para la diferencia 6-12). En el GP se produjo un aumento con tendencia a la significación estadística entre los meses 0 y 3 ($p = 0,062$). Las diferencias entre grupos no fueron significativas.

1.3.4. Efectos del calendario vacunal sobre la función tímica

Los cambios experimentados en los parámetros de función tímica en los pacientes durante el periodo de tratamiento se pueden ver en la **Figura R.1.24.** y en la **Tabla R.1.28.**

1.3.4.1. Copias de TRECs

- *TRECs*/ μ L: En ambos grupos se produjo una tendencia al aumento en el número de *TRECs*/ μ L, aunque sólo alcanzó la significación estadística en el GP ($p = 0,05$ para la diferencia 0-12). No se detectaron diferencias significativas en los cambios entre los grupos.

- *TRECs* por célula: Mientras que la tendencia del GP fue también a aumentar durante el periodo de tratamiento, a diferencia de los *TRECs*/ μ L en el GV se observó una disminución progresiva durante los primeros 12 meses. Sin embargo, ni los cambios intra ni intergrupos alcanzaron la significación estadística.

1.3.4.2. Tejido tímico

- Índice tímico: El índice tímico se mantuvo estable en ambos grupos a lo largo del periodo de tratamiento, sin diferencias ni dentro de cada grupo ni entre ellos.

- Volumen tímico: Ambos grupos presentaron una tendencia al aumento del volumen tímico medido en cm^3 , alcanzando la significación estadística en el GV ($p = 0,035$). No se hallaron diferencias entre grupos.

1.3.4.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo naïve

Ya se ha comentado su evolución durante el periodo de tratamiento en los apartados

1.3.3.1 y 1.3.3.2.

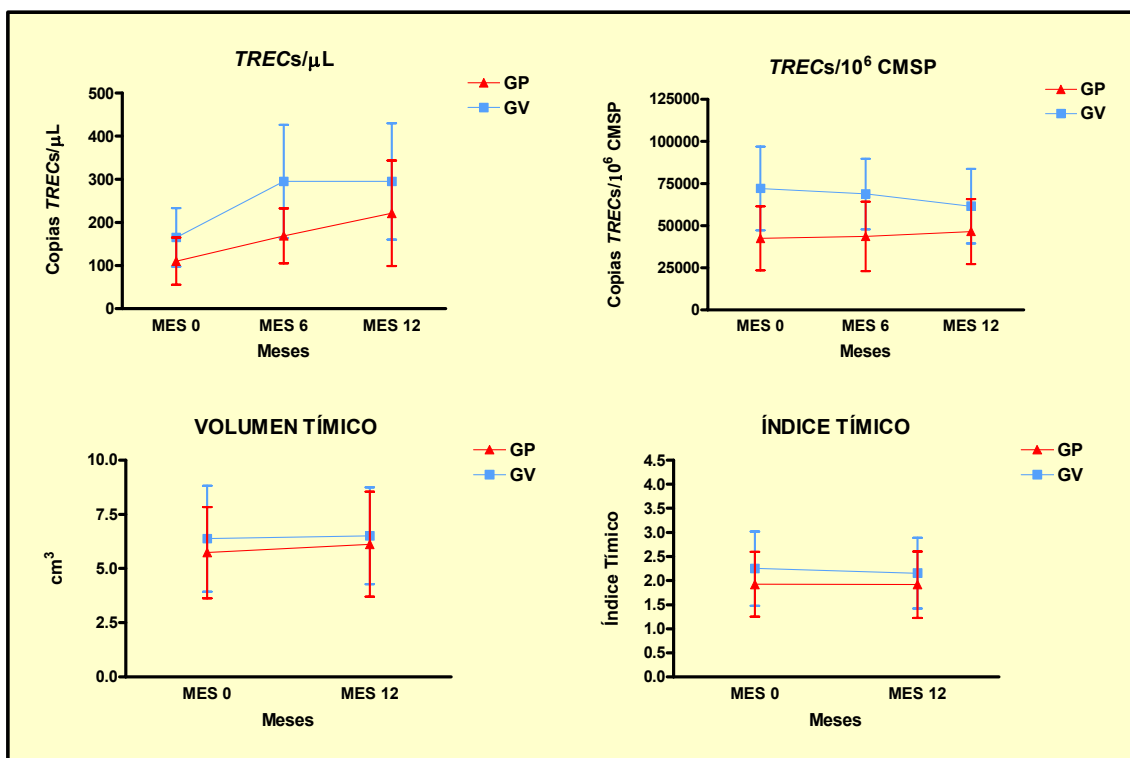


Figura R.1.24. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) de los parámetros de función tímica.

Se muestra la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; TRECs: Círculos de escisión del receptor celular T; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

Tabla R.1.28. Evolución de los parámetros de función tímica durante el periodo de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable (P*: P de la diferencia 6-12 intragrupos; P de la diferencia 0-12 intragrupos; P*** de la diferencia 0-12 intergrupos; TREC_s: Círculos de esesión del receptor celular T; CMSP: Células madres de sangre periférica)**

Parámetros de función tímica	Grupo Placebo						Grupo Vacunado					
	Mes 0	Mes 6	P	Mes 12	P*	P***	Mes 0	Mes 6	P	Mes 12	P*	P***
Copias TREC _s /μL	110,34 ± 90,81	168,91 ± 105,37	0,16	221,39 ± 202,4	0,34	0,05	165,25 ± 111,96	295,21 ± 217,29	0,12	295,13 ± 223,28	0,99	0,11
Copias TREC _s /10 ⁶ CMSP	42528,03 ± 31327,46	43745,36 ± 34246,33	0,89	46573,05 ± 31951,94	0,6	0,52	72172,85 ± 41107,2	68877,97 ± 34711,65	0,8	61607,58 ± 36782,87	0,4	0,51
Volumen tímico (cm ³)	5,73 ± 3,48			6,12 ± 3,81		0,18	6,38 ± 3,85			6,51 ± 3,7		0,035
Índice tímico	1,92 ± 1,11			1,92 ± 1,08		0,34	2,25 ± 1,21			2,15 ± 1,21		1
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ (%)	27,87 ± 11,86	28,03 ± 15,71	0,97	30,27 ± 12,31	0,9	0,22	38,36 ± 8,69	39,53 ± 11,71	0,62	39,89 ± 11,68	0,86	0,44
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	28,05 ± 12,40	24,45 ± 17,03	0,43	31,35 ± 13,47	0,16	0,31	35,04 ± 12,29	36,24 ± 15,73	0,82	40,25 ± 16,46	0,37	0,24
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺ (%)	50,76 ± 12,91	51,76 ± 15,88	0,83	54,26 ± 11,03	0,78	0,08	56,21 ± 12,48	55,04 ± 13,97	0,5	51,65 ± 14,65	0,24	0,02
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺ (%)	28,36 ± 15,09	25,92 ± 19,53	0,5	33,16 ± 15,29	0,11	0,08	25,77 ± 11,62	30,12 ± 11,98	0,44	31,59 ± 13,68	0,77	0,34
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	0,84 ± 0,67	1,34 ± 2,51	0,48	1,56 ± 0,82	0,82	0,028	0,67 ± 0,49	1,59 ± 2,84	0,22	1,15 ± 0,77	0,63	0,08
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	1,53 ± 1,11	2,3 ± 3,15	0,36	2,70 ± 2,05	0,83	0,04	0,92 ± 1	2,46 ± 5,28	0,22	2,12 ± 1,39	0,03	0,02

1.3.5. Efectos del calendario vacunal sobre el sistema IL-7/IL-7R

1.3.5.1. Niveles séricos de IL-7

Aunque presentó una tendencia similar en ambos grupos a aumentar durante el periodo de tratamiento, no se establecieron diferencias significativas entre las muestras en los diferentes meses ni dentro de cada grupo ni entre los GP y GV.

1.3.5.2. Expresión de IL-7R

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD127⁺: Se produjo en ambos grupos un aumento durante el periodo de tratamiento hasta el mes 6, momento en el que las tendencias parecieron invertirse, de modo que el GP presentó una tendencia al descenso, mientras que el GV siguió aumentando, con un descenso transitorio en el mes 9. El aumento en el GV tuvo una tendencia a la significación estadística ($p = 0,077$ para la diferencia 0-12). No se hallaron diferencias en los cambios entre los grupos.

- Linfocitos CD4⁺CD45RO⁺CD127⁺: De igual manera que la población *naïve*, aumentó durante todo el periodo de tratamiento en el GV y sólo hasta el mes 6 en el GP. El aumento en GV fue significativo ($p = 0,01$ para la diferencia 0-12), siéndolo prácticamente también los cambios globales entre grupos ($p = 0,05$ para las diferencias 0-12 entre grupos).

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺: La evolución de esta población fue superponible a la anterior, pero en esta ocasión no se hallaron diferencias significativas en los cambios ni intra ni intergrupos.

- Linfocitos CD8⁺CD45RO⁺CD127⁺: Al igual que el resto de poblaciones con el receptor CD127, se observó un aumento en el GV durante el tratamiento, sobre todo entre los meses 3 y 6 ($p = 0,046$), con una tendencia al descenso en el GP. Sin embargo, no se alcanzó la significación estadística en las diferencias entre grupos.

Los cambios producidos en este sistema se pueden observar en la **Figura R.1.25.** y las **Tablas R.1.29-R.1.30.**

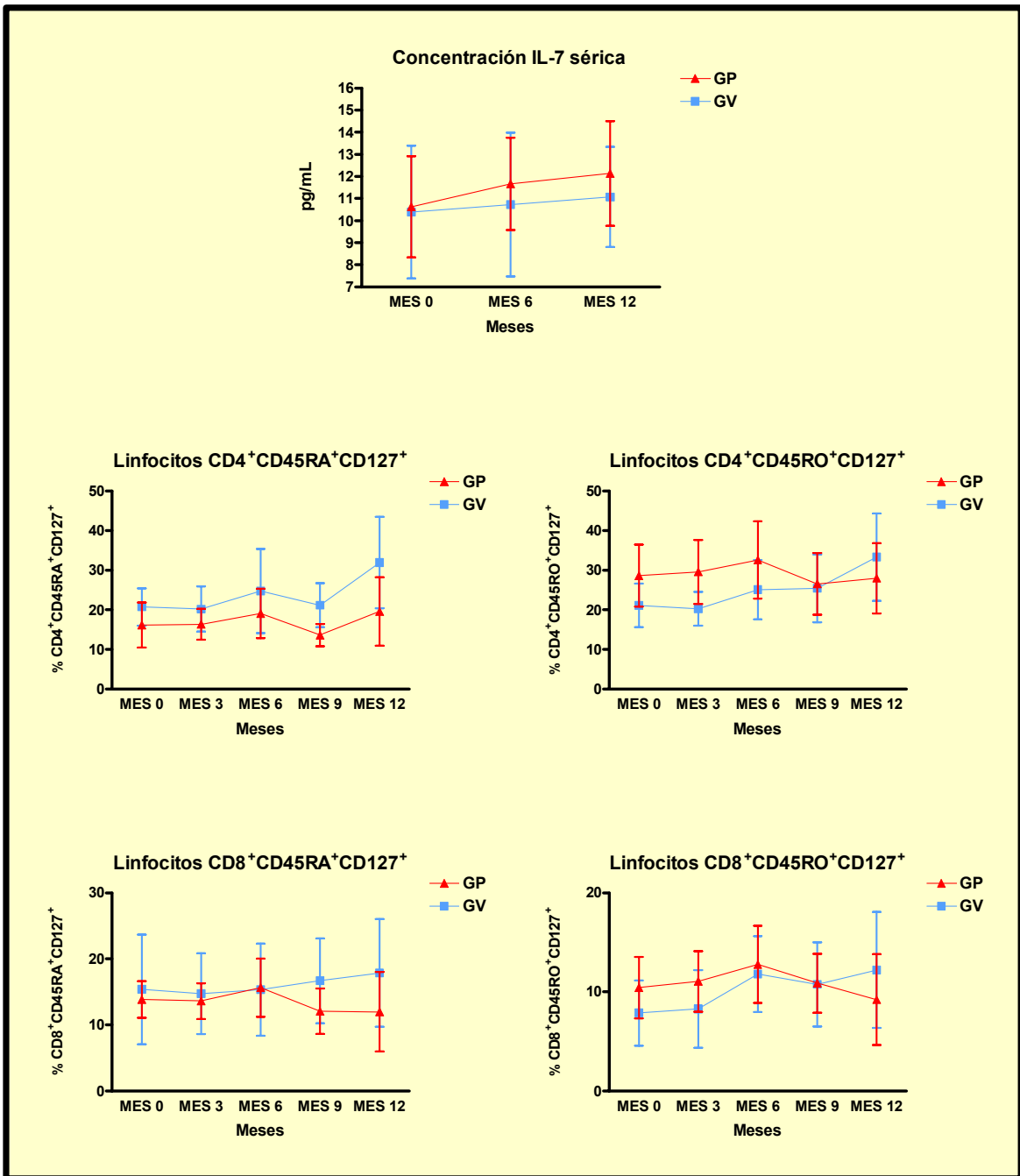


Figura R.1.25. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) del sistema IL-7/IL-7R. Se muestra la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

Tabla R.1.29. Evolución del sistema IL-7/IL-7R durante el período de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de la proporción de cada variable (P*: P de la diferencia 6-12 intragrupo; P de la diferencia 0-12 intragrupo; P*** de la diferencia 0-12 entre grupos)**

Sistema IL-7/ Receptor de IL-7	Grupo Placebo					Grupo Vacunado					
	Mes 0	Mes 6	Mes 12	P*	P***	Mes 0	Mes 6	Mes 12	P*	P**	P***
Concentración IL-7 (pg/mL)	10,63 ± 3,79	11,66 ± 3,46	12,13 ± 3,92	0,22	0,6	10,38 ± 4,97	10,72 ± 5,38	11,07 ± 3,75	0,75	0,42	0,57
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	16,20 ± 8,96	19,1 ± 10,31	19,59 ± 13,56	0,52	0,38	20,76 ± 7,8	24,79 ± 17,64	31,98 ± 19,11	0,17	0,077	0,38
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	28,66 ± 12,31	32,64 ± 16,16	28 ± 14,02	0,5	0,88	21,14 ± 9,1	25,11 ± 12,42	33,33 ± 18,24	0,086	0,01	0,05
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	13,83 ± 4,37	15,64 ± 7,27	11,97 ± 9,46	0,26	0,53	15,38 ± 13,72	15,34 ± 11,54	17,85 ± 13,49	0,63	0,59	0,49
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	10,44 ± 4,88	12,78 ± 6,43	9,21 ± 7,2	0,19	0,58	7,87 ± 5,44	11,80 ± 6,33	12,21 ± 9,7	0,89	0,21	0,17

Tabla R.1.30. Áreas bajo la curva neta de las diferentes subpoblaciones linfocitarias que expresan el CD127 durante el período de tratamiento + vacuna o tratamiento + placebo (meses 0-12). Se expresa la media y la desviación típica

AUC netas CTL	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺	4,42 ± 72,11	24,62 ± 85,48	0,52
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺	9,65 ± 134,26	40,60 ± 66,03	0,46
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺	1,58 ± 32,48	2,59 ± 109,69	0,97
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺	6,92 ± 26,13	24,65 ± 53,3	0,29

1.3.6. Efectos del calendario vacunal sobre las respuestas a los antígenos vacunales

1.3.6.1. Respuesta a VHA

Se administraron dos dosis de VHA en el GV y dos dosis de placebo en el GP en los meses 4 y 10. Las respuestas humoral y celular en los diferentes meses en el GP y el GV se pueden ver en las **Figuras R.1.26-R.1.27** y en las **Tablas R.1.31.-R.1.32**.

- Respuesta humoral

Como se comentó con anterioridad, básicamente un gran número de pacientes (76,9% del GP y 69,2% del GV) ya estaban inmunizados para el VHA, y lo estaban con títulos de anticuerpos situados en el límite superior del rango de detección del ensayo utilizado (100 mUI/mL). A pesar de ello se observó que, desde el punto de vista cualitativo, los 4 pacientes que no tenían anticuerpos protectores contra VHA en el grupo vacunado positivizaron su serología durante el periodo de tratamiento. Concretamente, uno de ellos presentó una hepatitis A clínica en el mes 2, antes de recibir la vacuna (mes 4 la primera dosis), teniendo ya serología positiva en el mes 3. De los otros tres pacientes, dos positivizaron con la primera dosis y el restante lo hizo tras la segunda (3/3, 100% de eficacia [95% IC: 29,24-100%]). Ninguno de los pacientes en el GP cambió su seroestatus respecto al VHA.

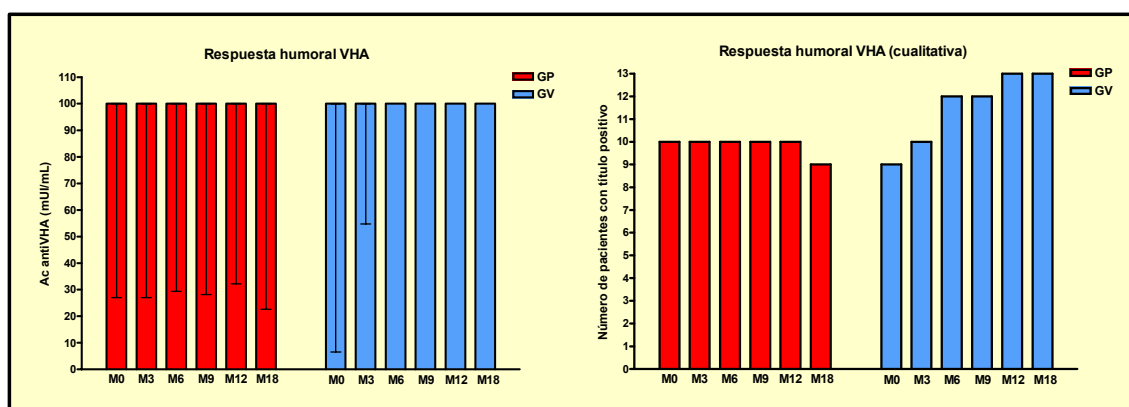


Figura R.1.26. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa al virus de la hepatitis A durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VHA: Virus de la hepatitis A, Ac: Anticuerpos; GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

Globalmente, el título de anticuerpos aumentó en el GV con tendencia a la significación estadística ($p = 0,066$) y no se modificó en el GP. Sin embargo, y recordando que el límite superior de detección era de 100 mUI/mL, los títulos obtenidos en el mes 12 no difirieron entre grupos ($p = 0,17$), ni tampoco los cocientes (que ejemplifica el aumento de los títulos entre dos determinaciones) entre los meses 3-6 ni 9-12 ($p = 0,88$ y $0,98$ respectivamente).

Se halló una correlación negativa entre el aumento de la respuesta humoral entre los meses 0-12 y la edad ($r = -0,511$, $p = 0,009$).

- Respuesta celular

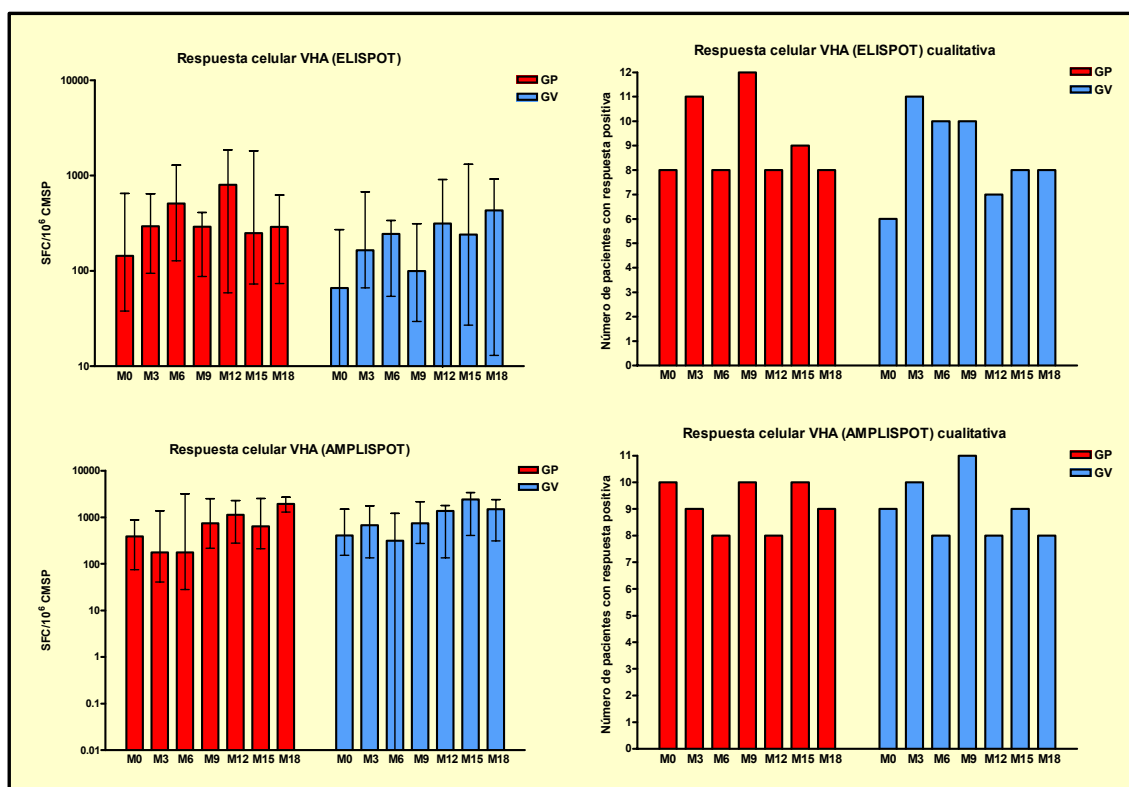


Figura R.1.27. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al virus de la hepatitis A durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VHA: Virus de la hepatitis A, GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de *spots*; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.1.31. Respuesta inmune frente a virus hepatitis A humoral y celular, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

	Grupo Placebo						Grupo Vacunado					
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12		Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	100 (27,05-100)	100 (27,05-100)	100 (29,35-100)	100 (28,15-100)	100 (21,02-100)		100 (6,50-100)	100 (54,75-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	
Humoral cualitativa	10 (76,9)	10 (76,9)	10 (76,9)	10 (76,9)	10 (76,9)		9 (69,2)	10 (76,9)	12 (92,3)	12 (92,3)	13 (100)	
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	144 (38-745)	294 (86,25-690,50)	508 (127,5-1293,5)	292 (87,5-411)	801 (72-1855,25)		66 (0-271)	165 (66,50-677,50)	245 (54-338)	99,5 (23,25-342)	315 (11,25-856,25)	
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	388 (75-881)	176,5 (20,25-1489,75)	176,5 (42-2361,75)	740 (158,25-2785,5)	1122 (409,25-1917,75)		405 (153-1494)	678 (134-1767,5)	315 (0-1215)	743 (205,5-2386,25)	1365 (134-1797)	
Celular (ELISPOT) cualitativa	8 (61,5)	11 (84,6)	8 (61,5)	12 (92,3)	8 (61,5)		6 (46,2)	11 (84,6)	10 (76,9)	10 (76,9)	7 (53,8)	
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	10 (76,9)	9 (69,2)	8 (61,5)	10 (76,9)	8 (61,5)		9 (69,2)	10 (76,9)	8 (61,5)	11 (84,6)	8 (61,5)	

Tabla R.1.32. Valores de las P de los análisis estadísticos al comparar la respuesta inmune frente a virus hepatitis A en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

	Grupo placebo						Grupo vacunado					
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12		meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	P meses 0-12 intergrupos*
Humoral cuantitativa	1	0,14	0,14	0,18	0,11		0,32	0,28	0,32	0,18	0,066	0,57
Humoral cualitativa	1	1	1	1	1		1	0,5	1	1	0,125	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa	0,72	0,89	0,086	0,028	0,44		0,059	0,44	0,37	0,12	0,26	0,86
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa	0,51	1	0,4	0,96	0,26		0,65	0,21	0,14	0,57	0,67	0,96
Celular (ELISPOT) cualitativa	0,62	1	1	1	1		0,37	1	1	0,5	1	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1	1	1	1	1		1	1	0,5	1	1	-

Durante el periodo de tratamiento se determinó un aumento significativo de la respuesta celular para el VHA medida por ELISPOT entre los meses 9 y 12 ($p = 0,028$) en el GP, mientras que en el GV se observó una tendencia estadística a aumentar dicha respuesta entre los meses 0 y 3 ($p = 0,059$).

No se observaron otras diferencias significativas ni intra ni intergrupos en la respuesta celular por ELISPOT o AMPLISPOT, ni cuantitativa ni cualitativa.

Por lo que respecta a los valores nulos/cero, éstos fueron el 26,4% / 7,7% y el 29,12% / 9,3% para las respuestas por ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente.

Las correlación global entre la respuesta celular medida por ELISPOT y AMPLISPOT para VHA fue buena ($p < 0,001$), y para cada determinación también fue significativa ($p < 0,05$), excepto para los meses 6 ($p = 0,54$) y 12 ($p = 0,5$).

No existió correlación entre las respuestas celular y humoral cuantitativas ($p = 0,25$ y $0,5$ para ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente).

1.3.6.2. Respuesta a VHB

Se administraron cuatro dosis de VHB en el GV y cuatro dosis de placebo en el GP en los meses 0, 1, 2 y 6. Las respuestas humoral y celular en los diferentes meses en el GP y el GV se pueden ver en las **Figuras R.1.28-R.1.29** y en las **Tablas R.1.33.-R.1.34**.

- Respuesta humoral

Desde el punto de vista cuantitativo, en el GP el nivel de título de anticuerpos se mantuvo estable durante el periodo de tratamiento. Por el contrario, en el GV hubo un aumento significativo ($p = 0,012$) entre los niveles basales y el mes 3 (tras las tres primeras dosis vacunales) y un nuevo aumento, aunque sin llegar a la significación estadística ($p = 0,093$), entre los meses 6 y 9, tras la cuarta dosis vacunal de VHB, seguido de un descenso significativo posterior hasta el mes 12 ($p = 0,008$). Las razones de los títulos de anticuerpos entre los meses 0-3, 6-9 y 0-12, es decir, los aumentos en el título de anticuerpos, fueron significativamente mayores en el GV que el GP ($p = 0,011$, $0,031$ y $0,011$ respectivamente).

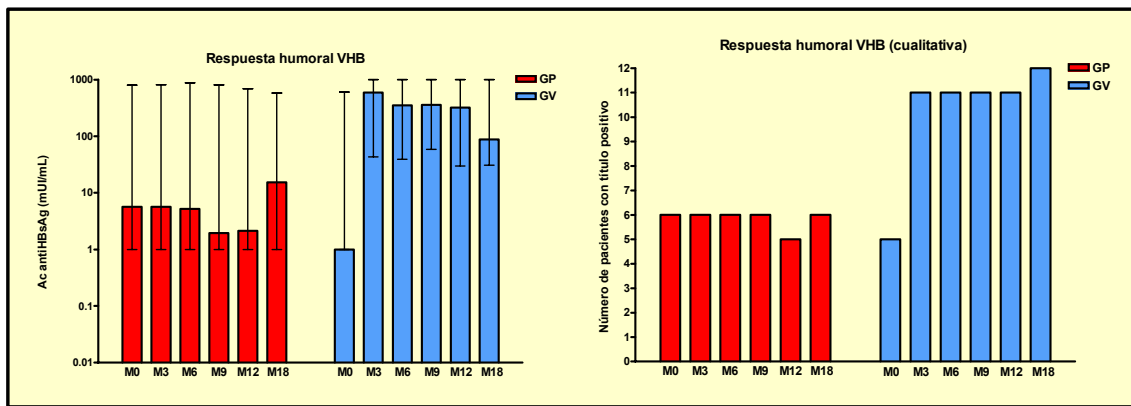


Figura R.1.28. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa al virus de la hepatitis B durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VHB: Virus de la hepatitis B, Ac: Anticuerpos; HBsAg: Antígeno de superficie del VHB; GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

Cualitativamente, la proporción de pacientes con serología VHB positiva en el GP se mantuvo estable durante el periodo de tratamiento, mientras que en el GV, tras los tres primeros meses, el número de pacientes positivos pasó de 5 a 11 (aumento estadísticamente significativo, $p = 0,031$), manteniéndose dos pacientes negativos hasta el final de este periodo (respondieron 6/8). La tasa de respondedores fue por tanto del 75% (95% IC: 34,9-96,82%).

Se halló una correlación negativa entre el aumento de la respuesta vacunal humoral entre los meses 6 y 9 y la edad en el GV ($r = -0,436$, $p = 0,026$).

- Respuesta celular

Se detectó una tendencia a aumentar las respuestas celulares a VHB tras la vacunación en el GV (entre los meses 0 y 3), aunque estos aumentos no llegaron a ser significativos dentro del grupo y tampoco mostraron diferencias significativas con las tendencias observadas en el GP. Únicamente hallamos significación estadística en el aumento en la respuesta celular medida por ELISPOT entre los meses 0 y 6 ($p = 0,036$). El resto de variaciones no fueron significativas, ni cuantitativas ni cualitativas, incluyendo las razones entre las respuestas en los meses 0 y 3 ($p = 0,3$ y $0,83$ para esas razones medias por ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente).

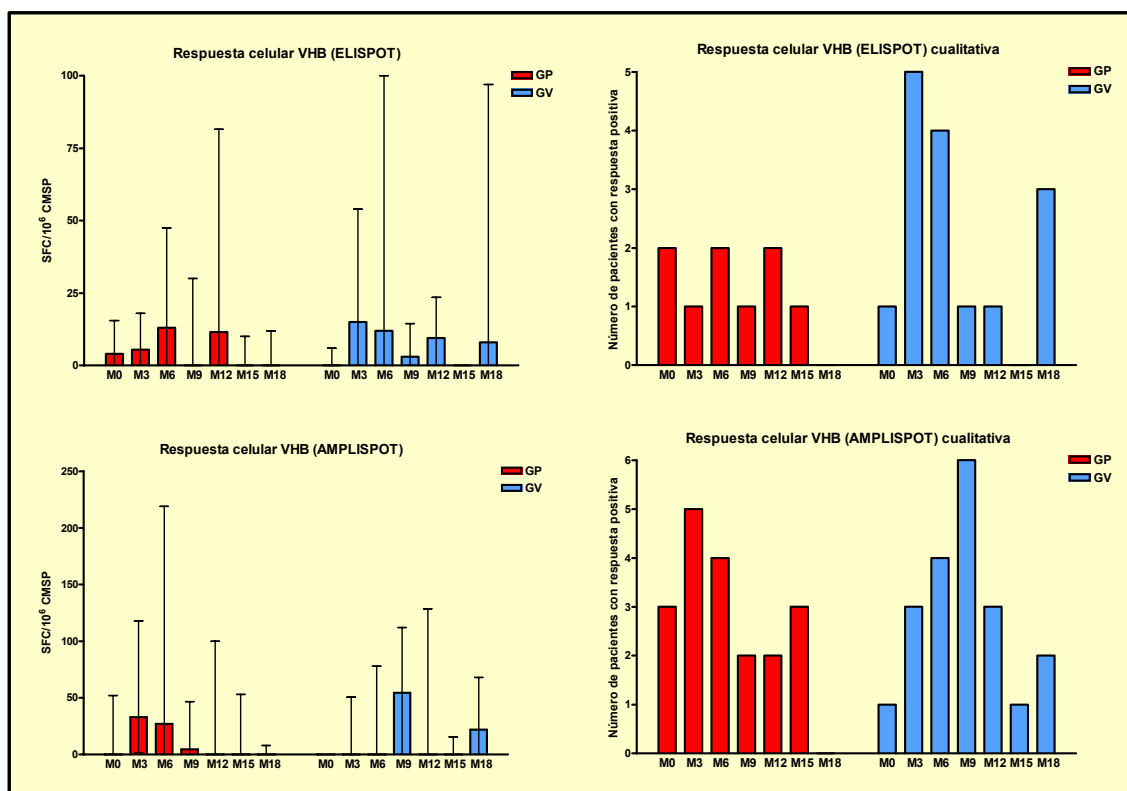


Figura R.1.29. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al virus de la hepatitis B durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VHB: Virus de la hepatitis B, GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Por lo que respecta a valores nulos/cero, éstos fueron el 26,4% / 34,1% y el 29,12% / 36,8% para ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente.

Cuando se analizó la correlación existente entre las respuestas celulares medidas por ELISPOT y AMPLISPOT para el VHB, hallamos que, ni globalmente ($p = 0,096$), ni para ninguna de las determinaciones (desde el mes 0 al 18) fue significativa, presentando únicamente una tendencia en el caso del mes 9 ($p = 0,08$). Las respuestas humorales y celulares, por el contrario, sí se correlacionaron globalmente, tanto con ELISPOT ($r = 0,31$, $p < 0,001$) como por AMPLISPOT ($r = 0,18$, $p = 0,042$).

Finalmente, el aumento de la respuesta celular por ELISPOT y AMPLISPOT entre los meses 0 y 3 se correlacionó positivamente con el nadir de linfocitos T CD4⁺ ($r = 0,780$, $p = 0,008$ para ELISPOT y $r = 0,720$, $p = 0,019$ para AMPLISPOT, respectivamente).

Tabla R.1.33. Respuesta inmune frente a virus hepatitis B humoral y celular, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta a virus hepatitis B	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 12	
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	5,65 (1-799,7)	5,65 (1-817)	5,2 (1-884,5)	1,95 (1-807)	2,14 (1-696,55)	2,14 (1-696,55)	1 (1-599,7)	588 (43,28-1000)	353 (39,15-1000)	360,6 (58,34-1000)	321 (29,69-1000)		
Humoral cualitativa	6 (46,2)	6 (46,2)	6 (46,2)	6 (46,2)	5 (38,5)	5 (38,5)	5 (38,5)	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)		
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	4 (0-17,25)	5,5 (0-19,5)	13 (0-47,5)	0 (0-30)	11,5 (0-77,25)	11,5 (0-77,25)	0 (0-6)	15 (0-54)	12 (0-100)	3 (0-14,75)	9,5 (0-21,25)		
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-52)	33 (0,75-137,5)	27 (0-178,5)	4,5 (0-53,25)	0 (0-66)	0 (0-66)	0 (0-0)	0 (0-50,5)	0 (0-78)	54,5 (0-118)	0 (0-128,5)		
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (15,4)	1 (7,7)	2 (15,4)	1 (7,7)	2 (15,4)	2 (15,4)	1 (7,7)	5 (38,5)	4 (30,8)	1 (7,7)	1 (7,7)		
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	3 (23,1)	5 (38,5)	4 (30,8)	2 (15,4)	2 (15,4)	2 (15,4)	1 (7,7)	3 (23,1)	4 (30,8)	6 (46,2)	3 (23,1)		

Tabla R.1.34. Valores de las P de los análisis estadísticos al comparar la respuesta inmune frente a virus hepatitis B en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

Respuesta a virus hepatitis B	Grupo placebo						Grupo vacunado						P meses 0-12 intergrupos*
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-12		
Humoral cuantitativa	0,6	0,87	0,46	0,89	0,87	0,012	0,12	0,093	0,008	0,012	0,014		
Humoral cualitativa	1	1	1	1	1	0,031	1	1	1	0,031	-		
Celular (ELISPOT) cuantitativa	0,87	0,87	0,75	0,77	1	0,21	0,88	0,093	0,14	0,25	0,25		
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa	0,48	0,87	0,51	1	0,92	0,34	0,92	0,26	0,91	0,46	0,46		
Celular (ELISPOT) cualitativa	1	1	1	1	1	0,22	1	0,25	1	1	-		
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1	1	1	1	1	0,62	1	1	1	0,5	-		

1.3.6.3. *Respuesta a gripe*

Se administró una dosis de vacuna de la gripe en el GV y una dosis de placebo en el GP en el mes 1. Sólo se analizaron las respuestas celulares (**Figura R.1.30** y **Tablas R.1.35.-R.1.36.**).

En el GV se detectó un aumento en la respuesta celular frente a gripe medida por ELISPOT y AMPLISPOT, tanto de forma cuantitativa como cualitativa, entre los meses 0 y 3. Sin embargo, únicamente la valoración cuantitativa por ELISPOT alcanzó la significación estadística ($p = 0,012$). Este aumento, representado por el cociente entre los títulos de la respuesta en los meses 0 y 3, fue significativamente mayor en el grupo vacunado, con tendencia a la significación estadística ($p = 0,071$). El resto de cambios y variaciones no fueron significativos.

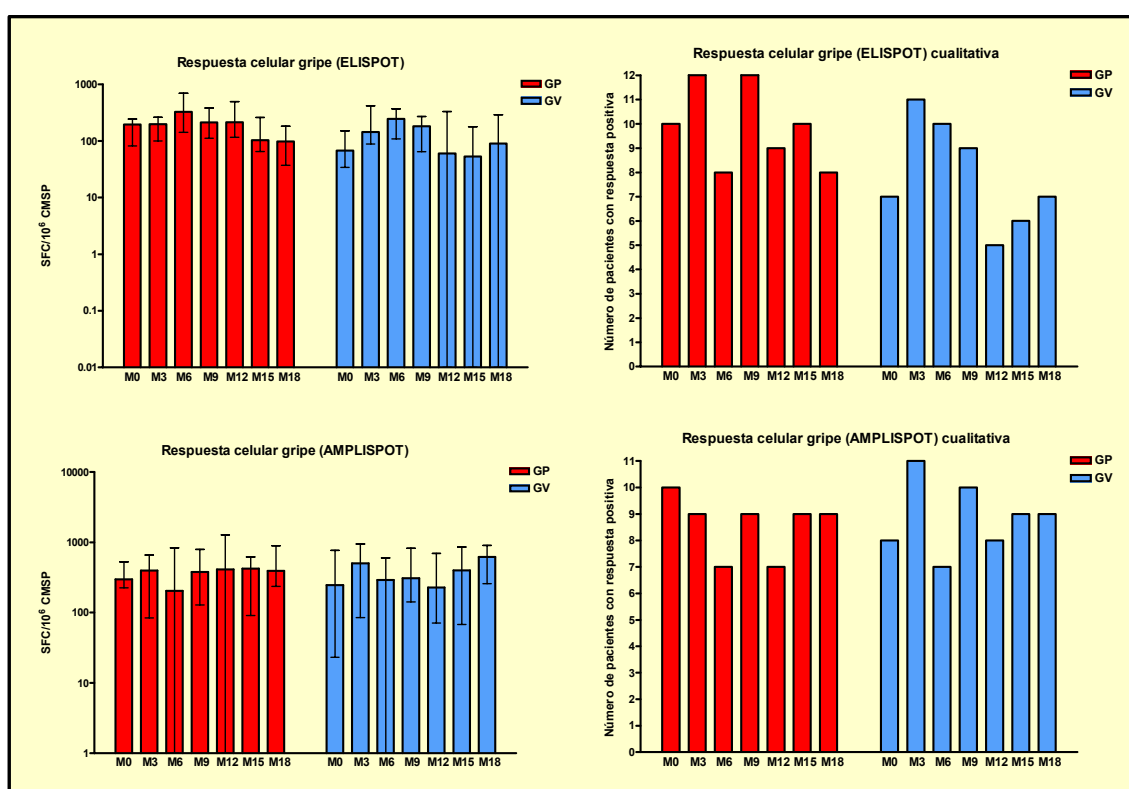


Figura R.1.30. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al virus de la gripe durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.1.35. Respuesta inmune celular frente al virus de la gripe, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta a virus influenza	Grupo Placebo					Grupo Vacunado				
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	195 (76,25-261,5)	198 (99,75-274,25)	325 (141-689)	213 (111-379,5)	214 (126,25-466,25)	67 (34-150)	144 (88-416,5)	245 (108-371)	181 (38,25-277)	60 (0-299,25)
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	297 (225-526)	395,5 (42-717,5)	204,5 (0-811,75)	378,5 (64-791)	413 (0-1096,75)	247 (23-770)	501 (84,5-948,5)	290 (0-599)	308 (118,75-858,5)	227 (71-694)
Celular (ELISPOT) cualitativa	10 (76,9)	12 (92,3)	8 (61,5)	12 (92,3)	9 (69,2)	7 (53,8)	11 (84,6)	10 (76,9)	9 (69,2)	5 (38,5)
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	10 (76,9)	9 (69,2)	7 (53,8)	9 (69,2)	7 (53,8)	8 (61,5)	11 (84,6)	7 (53,8)	10 (76,9)	8 (61,5)

Tabla R.1.36. Valores de las P de los análisis estadísticos al comparar la respuesta inmune frente al virus de la gripe en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

Respuesta a virus influenza	Grupo placebo					Grupo vacunado					P meses 0-12 intergrupos*
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	
Celular (ELISPOT) cuantitativa	1	0,12	0,11	0,65	0,51	0,012	1	0,96	0,37	0,77	0,51
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa	0,86	0,73	0,92	0,37	0,8	0,44	0,42	0,59	0,89	0,33	0,93
Celular (ELISPOT) cualitativa	1	1	1	1	1	0,62	1	0,62	0,69	0,69	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1	1	1	1	0,62	1	0,25	0,62	1	1	-

Por lo que respecta a valores nulos/cero, éstos fueron del 14,8% / 9,9% y el 18,3% / 12,6% para ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente.

Al analizar las correlaciones entre la respuestas celulares frente a gripe medidas por ELISPOT o AMPLISPOT, globalmente fueron significativas ($p < 0,001$, $r = 0,4$), aunque por determinaciones sólo fueron significativas en los meses 0 y 9 ($p = 0,012$ y $p < 0,001$ respectivamente), con una tendencia a ser significativa en el mes 18 ($p = 0,065$) y resultando no significativas para los meses 3, 6 y 15.

Se halló una correlación negativa entre el aumento de la respuesta celular medida por ELISPOT entre los meses 0 y 3 y la edad ($r = -0,525$, $p = 0,012$). No se halló correlación con las respuestas por AMPLISPOT ($p = 0,38$).

1.3.6.4. Respuesta a varicela

Se administraron dos dosis de vacuna de la varicela en el GV y dos dosis de placebo en el GP en los meses 4 y 6. Las respuestas humoral y celular en los diferentes meses en el GP y el GV se pueden ver en las **Figuras R.1.31-R.1.32.** y en las **Tablas R.1.37.-R.1.38.**

- Respuesta humoral

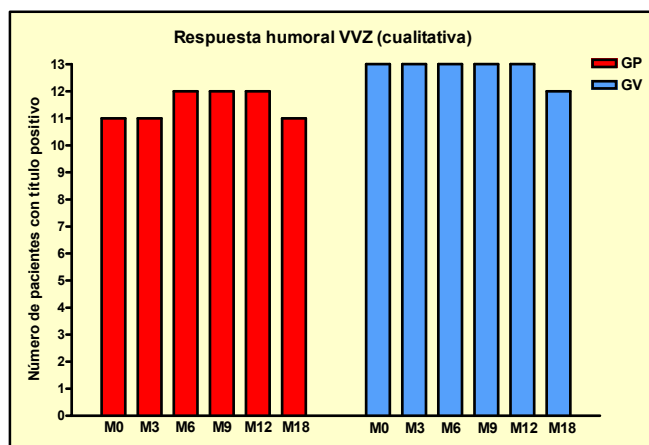


Figura R.1.31. Evolución de la respuesta humoral cualitativa al VVZ durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se expone el número de pacientes positivos (VVZ: Virus varicela zoster; GP Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

Desde el punto de vista cualitativo, básicamente todos los pacientes excepto dos del GP tenían serología positiva para el VVZ. A lo largo de los 12 meses de tratamiento, uno de esos pacientes “seroconvirtió” y presentó títulos positivos sin haber recibido vacuna ni haber pasado

una enfermedad relacionada clínicamente aparente. No se pudieron demostrar diferencias entre grupos respecto a la respuesta humoral a VVZ.

- Respuesta celular

La respuesta celular para VVZ presentó cambios significativos por AMPLISPOT en el GP entre los meses 3 y 6, cuando se produjo un descenso ($p = 0,025$) y entre el 6 y el 9, cuando aumentó ($p = 0,015$). Dichos cambios no se produjeron en la medida por ELISPOT. Por otro lado, en el GV se observó un aumento significativo por AMPLISPOT entre los meses 6 y 9 ($p = 0,028$) y también en cuanto a la proporción de pacientes con respuesta celular positiva por el mismo método (de 6 a 9, aunque no fue significativo).

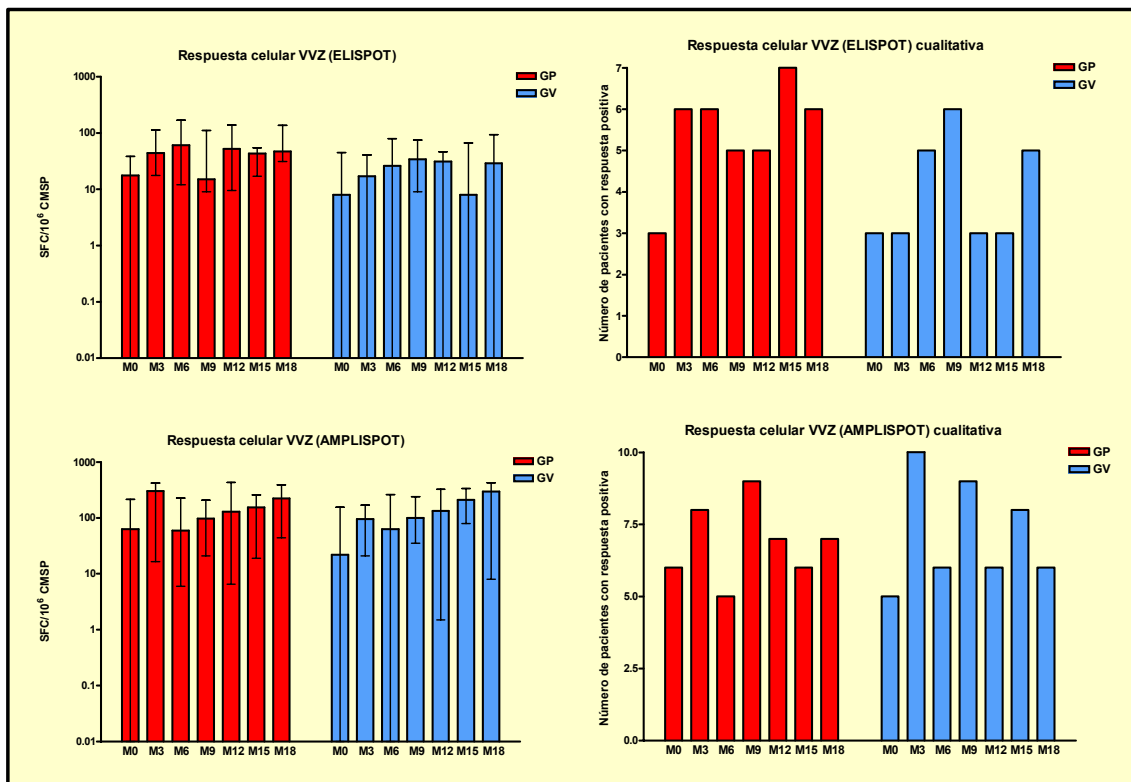


Figura R.1.32. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al VVZ durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VVZ: Virus varicela zoster; GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.1.37. Respuestas inmune humoral y celular frente al virus varicela, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta a varicela	Grupo Placebo						Grupo Vacunado								
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12
Humoral cualitativa	11 (84,6)	11 (84,6)	12 (92,3)	12 (92,3)	12 (92,3)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	17,5 (0-39,75)	44 (16,25-130,5)	61 (12-169,5)	15 (9-110)	52 (14,25-126,5)	8 (0-45)	17 (0-40,5)	26 (0-80)	34 (8,5-74,75)	31 (0-45,75)	8 (0-45)	95 (21-169,5)	63 (0-262)	99,5 (28,5-248,25)	133 (1,5-326)
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	63 (0-214)	302 (8,25-429,5)	59 (9-171,75)	97,5 (10,5-234)	128,5 (9,75-313,5)	22 (0-156)	95 (21-169,5)	63 (0-262)	99,5 (28,5-248,25)	133 (1,5-326)	3 (23,1)	3 (23,1)	5 (38,5)	6 (46,2)	3 (23,1)
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (23,1)	6 (46,2)	6 (46,2)	5 (38,5)	5 (38,5)	3 (23,1)	3 (23,1)	5 (38,5)	6 (46,2)	6 (46,2)	5 (38,5)	5 (38,5)	6 (46,2)	6 (46,2)	6 (46,2)
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	6 (46,2)	8 (61,5)	5 (38,5)	9 (69,2)	7 (53,8)	5 (38,5)	10 (76,9)	6 (46,2)	9 (69,2)	9 (69,2)	5 (38,5)	10 (76,9)	6 (46,2)	9 (69,2)	6 (46,2)

Tabla R.1.38. Valores de las P de los análisis estadísticos al comparar la respuesta inmune frente al virus varicela en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

Respuesta a varicela	Grupo placebo						Grupo vacunado						P meses 0-12 intergrupos*		
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 3-6	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 3-6		meses 6-9	meses 9-12
Humoral cualitativa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Celular (ELISPOT) cualitativa	0,061	0,44	0,37	0,96	0,21	0,39	0,39	0,51	0,65	0,31	0,65	0,65	0,31	0,91	0,82
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa	0,4	0,025	0,015	0,41	0,69	0,11	0,11	0,8	0,028	0,73	0,73	0,028	0,73	1	0,72
Celular (ELISPOT) cualitativa	0,62	1	0,62	1	1	1	1	0,68	1	0,37	1	1	0,37	1	1
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1	1	0,62	1	0,69	0,37	0,37	0,37	0,37	1	0,37	1	1	1	1

No se hallaron diferencias significativas entre grupos en el cambio de respuesta entre los meses 3 y 6 ó 6 y 9, periodos en los que se administró la vacuna al GV, valorados mediante los cocientes de los títulos obtenidos en cada mes.

El 14,8% / 16,5% y el 18,3% / 18,1% de las determinaciones fueron valores nulos/cero fueron para ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente.

Respecto a la correlación de la respuesta celular medida mediante ELISPOT y AMPLISPOT, aunque globalmente fue significativa ($p = 0,008$, $r = 0,22$), por determinaciones únicamente fue significativa en el mes 12 ($p = 0,044$). Para el resto de determinaciones no se halló correlación significativa ($p > 0,1$).

Se halló una correlación negativa entre la edad y el aumento de respuesta celular medida por AMPLISPOT entre los meses 3 y 6 ($r = -0,599$, $p = 0,005$).

1.3.6.5. Respuesta a parotiditis

Se administró una dosis de vacuna triple vírica en el GV, que incluye la vacuna frente al virus de la parotiditis, y una dosis de placebo en el GP en el mes 8. Las respuestas humoral y celular en los diferentes meses en el GP y el GV se pueden ver en las **Figuras R.1.33-R.1.34.** y en las **Tablas R.1.39.-R.1.40.**

- Respuesta humoral

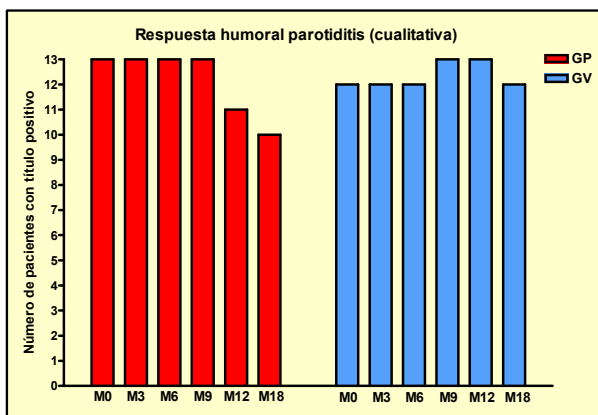


Figura R.1.33. Evolución de la respuesta humoral cualitativa al virus parotiditis durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se expone el número de pacientes positivos (GP Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

Tabla R.1.39. Respuestas inmune humoral y celular frente a virus de la parotiditis, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta a parotiditis	Grupo Placebo					Grupo Vacunado				
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12
Humoral cualitativa	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	11 (84,6)	12 (92,3)	12 (92,3)	12 (92,3)	13 (100)	13 (100)
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-31,75)	37,5 (2,5-73)	89 (12,5-404,5)	19 (1,5-56)	50,5 (7,5-223,5)	25 (0-31)	25 (0-107)	55 (25-103)	47,5 (8,5-110,5)	0 (0-71)
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	72 (25-156)	30 (0-419,75)	45,5 (0-204,5)	106,5 (0-199,5)	86,5 (0-398,75)	71 (0-165)	188 (36,5-264)	43 (0-230)	108,5 (40-364,75)	125 (21-284)
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (15,4)	5 (38,5)	5 (38,5)	5 (38,5)	5 (38,5)	2 (15,4)	4 (30,8)	7 (53,8)	6 (46,2)	3 (23,1)
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	7 (53,8)	5 (38,5)	5 (38,5)	7 (53,8)	6 (46,2)	7 (53,8)	9 (69,2)	6 (46,2)	9 (69,2)	6 (46,2)

Tabla R.1.40. Valores de las P de los análisis estadísticos para comparar la respuesta inmune frente a virus parotiditis en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

Respuesta a parotiditis	Grupo placebo					Grupo vacunado					P meses 0-12 intergrupos*
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	
Humoral cualitativa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa	0,37	0,21	0,11	0,11	0,21	0,24	0,37	1	0,4	0,78	0,16
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa	0,96	0,075	1	0,67	0,72	0,86	0,39	0,26	0,57	1	0,23
Celular (ELISPOT) cualitativa	0,69	1	1	1	0,69	1	0,37	1	1	0,62	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	0,69	1	1	1	1	1	0,69	0,37	1	1	-

Los 13 pacientes del GP tenían serología positiva para el virus parotiditis. Uno de ellos dio un valor negativo en el mes 12, aunque posteriormente volvió a positivizar. De los pacientes del GV, sólo 1 presentaba títulos negativos de anticuerpos contra el virus parotiditis. Tras la administración de la vacuna triple vírica en el mes 8, seroconvirtió y mostró títulos contra este virus (mes 9).

- Respuesta celular

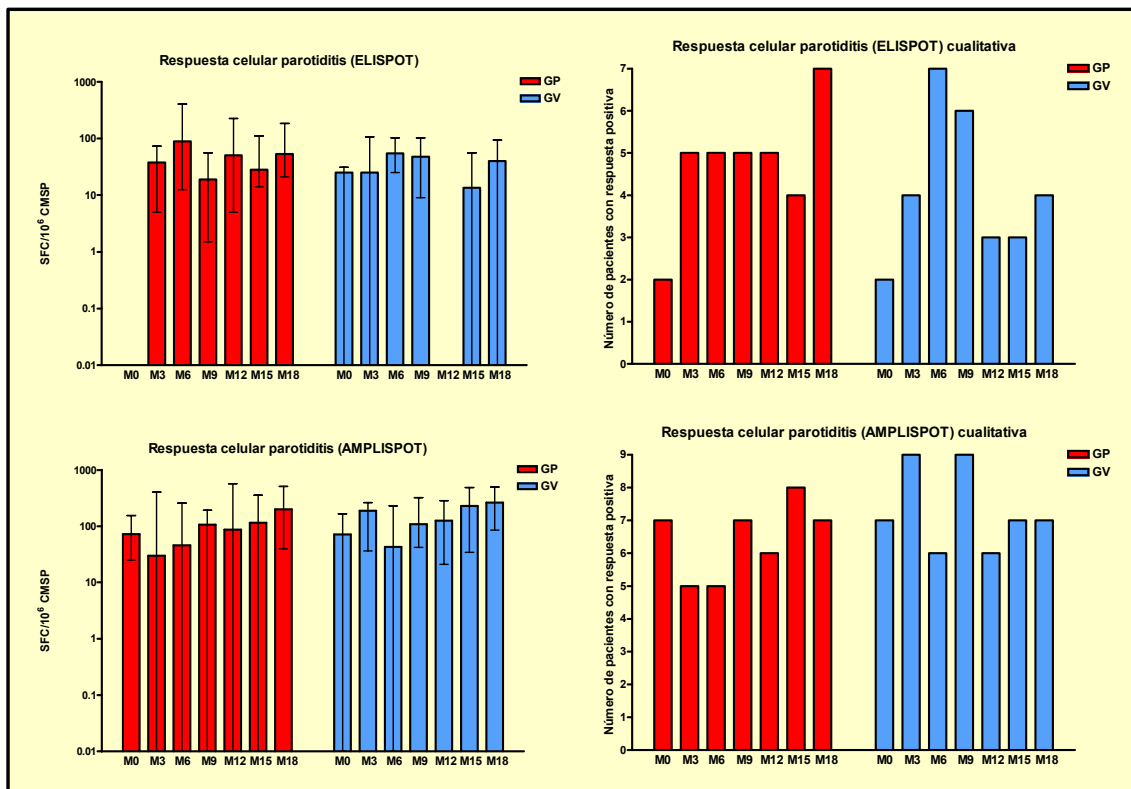


Figura R.1.34. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al virus parotiditis durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Cuando se analizó la respuesta celular al virus parotiditis no se hallaron cambios significativos en el GP, aunque en la medida por ELISPOT había una tendencia a un aumento entre los meses 0 y 3 ($p = 0,075$). En el GV no se detectaron cambios significativos entre los meses 6 y 9, secundarios a la administración de la vacuna. Aunque por AMPLISPOT se detectó

un aumento de la respuesta tanto cuantitativa como cualitativa (pasando de 6 a 9 pacientes positivos) en este periodo, éstos no fueron significativos ($p = 0,26$ y $0,37$ respectivamente). De hecho, sólo se hallaron cambios significativos entre los meses 0-6 y 0-9, con aumentos de la respuesta por ELISPOT ($p = 0,038$ y $0,032$ respectivamente).

No se detectaron cambios en el grado de variación de la respuesta entre los meses 6 y 9 entre grupos ($p = 0,66$ y $0,16$ por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente).

Los valores nulos/cero supusieron el 14,8% / 22,5% y el 18,3% / 18,1% de las determinaciones para ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente.

Cuando se analizó la correlación entre las respuestas medidas por ELISPOT y AMPLISPOT para el virus parotiditis se observó que, aunque globalmente tenían una buena correlación ($p < 0,001$, $r = 0,33$), en el análisis por determinaciones sólo existía una correlación significativa para los meses 9 ($p = 0,016$) y 3 ($p = 0,009$), y una tendencia en el mes 18 ($p = 0,058$). Para el resto de determinaciones no se halló una correlación significativa entre las dos medidas de respuesta celular frente parotiditis.

1.3.6.6. *Respuesta a rubéola*

Se administró una dosis de vacuna triple vírica en el GV, que incluye la vacuna frente al virus de la rubéola, y una dosis de placebo en el GP en el mes 8. Sólo se analizó la respuesta humoral (**Figura R.1.35.** y en las **Tablas R.1.41.-R.1.42.**).

Durante los 12 meses de tratamiento se observó en el GP un descenso progresivo en el título de anticuerpos anti-rubéola que alcanzó la significación estadística entre los meses 0 y 3 ($p = 0,005$) y 9 y 12 ($p = 0,013$). Sin embargo, este descenso supuso en un único caso y de forma transitoria (en el mes 3) una caída por debajo de los títulos considerados como protectores o de positividad (5 UI/mL). En el GV también se produjo este descenso, también significativo entre los meses 0 y 3 ($p = 0,025$) y con negatividad cualitativa para dos pacientes que en el mes 0 eran positivos (lo eran el 100% de los pacientes del GV).

Tabla R.1.41. Respuesta inmune humoral frente a virus de la rubéola, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo

Respuesta a rubéola	Grupo Placebo						Grupo Vacunado					
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 12
Humoral cuantitativa (UI/mL)	102 (28-183)	90 (19,5-144)	100 (20,5-175)	79 (21,5-154)	74 (28-224,5)	66 (35-103,5)	66 (35-103,5)	44,5 (21,75-80)	50 (33-97)	67 (50,25-123,25)	93 (49-291,5)	93 (49-291,5)
Humoral cualitativa	13 (100)	12 (92,3)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	10 (76,9)	12 (92,3)	12 (92,3)	13 (100)	13 (100)

Tabla R.1.42. Valores de las P de los análisis estadísticos al comparar la respuesta inmune frente a rubéola en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

Respuesta a rubéola	Grupo placebo						Grupo vacunado						P meses 0-12 intergrupos*
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-12		
Humoral cuantitativa	0,005	0,79	0,45	0,013	0,69	0,025	0,42	0,004	0,25	0,14	0,1	0,1	
Humoral cualitativa	1	1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	-	

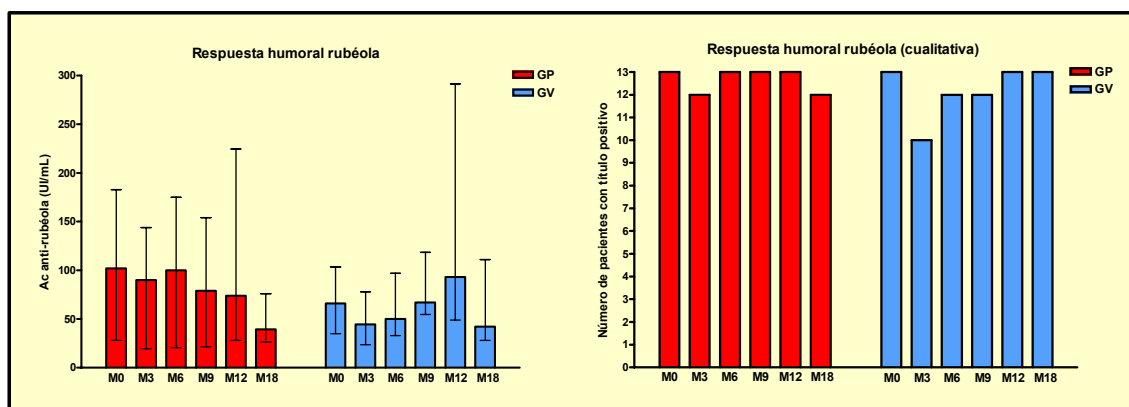


Figura R.1.35. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa al virus rubéola durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; Ac: Anticuerpos)

Tras la administración de la vacuna en el GV se produjo un aumento del título de anticuerpos significativo estadísticamente ($p = 0,004$ entre los meses 0 y 9), con un aumento de 1,3 veces (valor mediano). El incremento del título fue significativamente diferente al hallado en el GP ($p < 0,001$).

Se halló una correlación negativa entre la edad y el aumento de respuesta vacunal humoral a rubéola entre los meses 6 y 9 ($r = -0,399$, $p = 0,048$).

1.3.6.7. Respuesta a sarampión

Se administró una dosis de vacuna triple vírica en el GV, que incluye la vacuna frente al virus del sarampión, y una dosis de placebo en el GP en el mes 8. Las respuestas humoral y celular en los diferentes meses en el GP y el GV se pueden ver en las **Figuras R.1.36-R.1.37.** y en las **Tablas R.1.43.-R.1.44.**

- Respuesta humoral

El 100% de los pacientes en el GP y el GV tenían una serología positiva para sarampión, y así se mantuvieron durante el periodo de tratamiento.

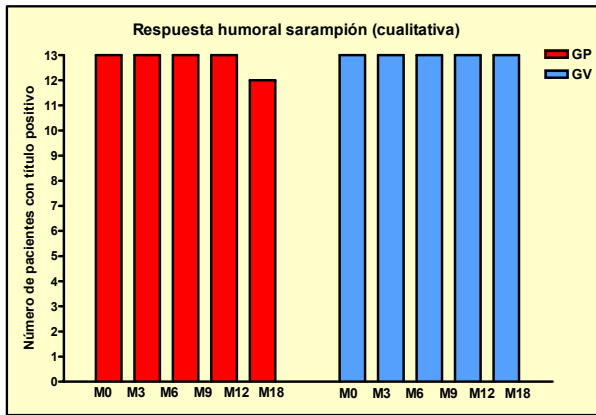


Figura R.1.36. Evolución de la respuesta humoral cualitativa al virus sarampión durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se expone el número de pacientes positivos (GP Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Respuesta celular

La evaluación de la respuesta celular por ELISPOT mostró en el GV un aumento significativo ($p = 0,038$) entre los meses 0 y 3. Además de ésta, otras dos variaciones con tendencia a la significación estadística se produjeron durante el periodo de tratamiento en ambos grupos, en sentido contrario, entre los meses 9 y 12: una tendencia a aumentar en el GP ($p = 0,068$) y una tendencia a disminuir en el GV ($p = 0,08$).

No se hallaron diferencias significativas en los cambios de respuesta celular entre grupos por ELISPOT o AMPLISPOT entre los meses 6 y 9 (la vacuna de sarampión se administraba en el mes 8). Tampoco se vieron cambios a nivel cualitativo. Únicamente fue significativamente diferente la razón entre los meses 9 y 12 entre grupos medida por AMPLISPOT ($p = 0,027$).

Por lo que respecta a valores nulos/cero, éstos fueron el 15,38% / 36,3% y el 17,58% / 49,5% de las determinaciones por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente, lo que supone más de un 50% y casi un 70% respectivamente de los valores.

Al analizar las correlaciones en las mediciones con ELISPOT y AMPLISPOT para la respuesta celular de sarampión, aunque globalmente la transformación logarítmica de las variables tuviese una correlación significativa ($p = 0,007$, $r = 0,42$), en el análisis por meses únicamente las determinaciones realizadas en el mes 12 mostraron una correlación significativa ($p = 0,008$), mientras que en el resto no se halló ($p > 0,1$).

Tabla R.1.43. Respuestas inmunes humoral y celular frente al virus del sarampión, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartilico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta a sarampión	Grupo Placebo						Grupo Vacunado					
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 12
Humoral cualitativa	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	12 (92,3)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	3 (0-13)	5 (0-30)	7,5 (0-58)	4 (0-30,5)	10 (0-47,75)	18 (0-44,5)	0 (0-8)	10 (0-45)	5,5 (0-17,5)	1,5 (0-23,75)	5 (0-14)	1 (7,7)
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	3 (0-43)	0 (0-5,25)	19 (0-160,75)	0 (0-0)	0 (0-46,75)	0 (0-0)	0 (0-6)	0 (0-12)	0 (0-62,5)	0 (0-14)	0 (0-14)	0 (0-14)
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (15,4)	1 (7,7)	2 (15,4)	3 (23,1)	3 (23,1)	3 (23,1)	0 (0)	3 (23,1)	1 (7,7)	1 (7,7)	1 (7,7)	1 (7,7)
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	3 (23,1)	2 (15,4)	4 (30,8)	2 (15,4)	2 (15,4)	2 (15,4)	1 (7,7)	2 (15,4)	2 (15,4)	3 (23,1)	1 (7,7)	1 (7,7)

Tabla R.1.44. Valores de las P de los análisis estadísticos al comparar la respuesta inmune frente al virus del sarampión en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

Respuesta a sarampión	Grupo placebo						Grupo vacunado						P meses 0-12 intergrupos*
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-12		
Humoral cualitativa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	
Celular (ELISPOT) cuantitativa	0,57	0,87	1	0,69	0,51	0,038	0,26	0,48	0,75	0,73	0,54	0,54	
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa	0,92	0,4	0,27	0,068	0,57	0,46	0,92	0,46	0,08	0,6	0,16	0,16	
Celular (ELISPOT) cualitativa	1	1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	-	
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1	0,69	1	0,5	1	1	1	1	0,5	1	1	-	

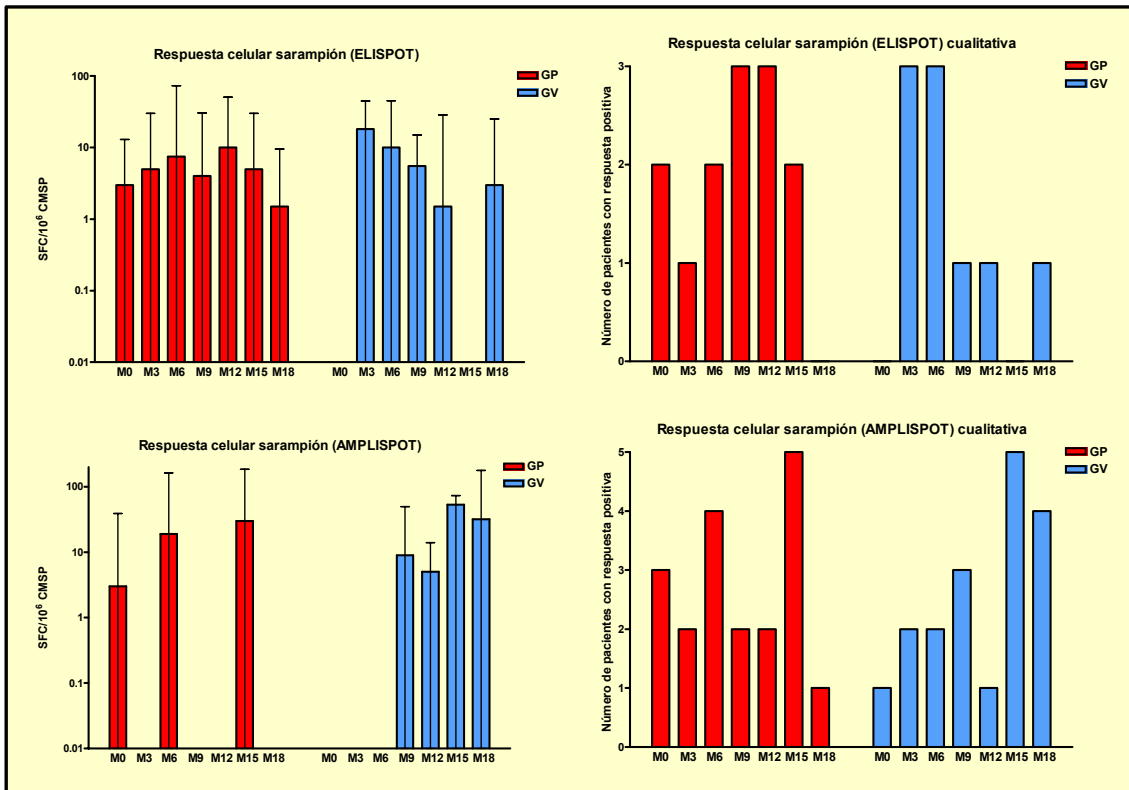


Figura R.1.37. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al sarampión durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

1.3.6.8. Respuesta a neumococo

Se administró una dosis de vacuna anti-neumocócica en el GV y una dosis de placebo en el GP en el mes 2. Las respuestas humoral y celular en los diferentes meses en el GP y el GV se pueden ver en las **Figuras R.1.38.-R.1.39.** y en las **Tablas R.1.45.-R.1.46.**

- Respuesta humoral

En el GP no se observaron cambios significativos durante el periodo de tratamiento en la respuesta humoral a neumococo, ni cuantitativa ni cualitativa. Por el contrario, en el GV, siguiendo a la vacunación (mes 2) se observó un aumento significativo en el título de anticuerpos ($p = 0,019$), con una mediana de aumento de 1,25 veces (rango intercuartílico 0,95-5,83), significativamente diferente del cambio en el GP en el mismo periodo ($p = 0,033$).

Posteriormente se produjo un descenso significativo del título de anticuerpos en el GV hasta el mes 12 ($p = 0,007$), pero manteniendo en ese momento un título significativamente superior al del mes 0 ($p = 0,036$).

Cualitativamente, tras la vacunación (entre los meses 0 y 3) el 30% de los pacientes seroconvirtieron (95% IC: 6,7-65%).

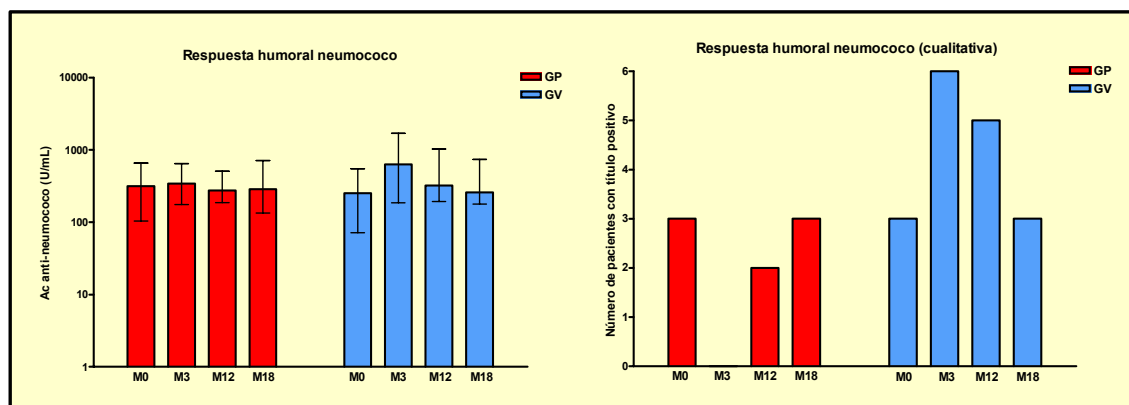


Figura R.138. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a neumococo durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; Ac: Anticuerpos)

- Respuesta celular

Se detectó un aumento significativo en la respuesta entre el mes 9 y 12 en el GP por ELISPOT ($p = 0,038$). Ningún otro cambio alcanzó la significación estadística, ni cuantitativo ni cualitativo, incluyendo el cambio en el GV entre los meses 0 y 3.

Los valores nulos/cero fueron el 14,8% / 37,4% y de 18,13% / 37,4% de las mediciones por ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente.

El análisis de las correlaciones entre la respuesta humoral y las respuestas celulares no fue significativo ($p > 0,1$). Tampoco hubo correlación entre los resultados obtenidos por ELISPOT y AMPLISPOT para ninguno de los meses ($p > 0,1$). Cuando se analizaron globalmente todas las determinaciones, el logaritmo de las respuestas celulares sí llegó a correlacionar de forma significativa ($p = 0,02$, $r = 0,42$, Pearson), pero no así con la humoral.

Tabla R.1.45. Respuestas inmune humoral y celular frente a neumococo, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta a neumococo	Grupo Placebo						Grupo Vacunado					
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	
Humoral cuantitativa (U/mL)	317 (104-655,5)	342 (175,5-646)	-	-	275 (161,5-536,5)	252 (71,5-551)	631 (185,5-1698,5)	-	-	321 (193-1030)		
Humoral cualitativa	3 (23,1)	0 (0)	-	-	2 (15,4)	3 (23,1)	6 (46,2)	-	-	5 (38,5)		
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	7 (0-22,75)	20,5 (0-47,75)	12 (0-40)	0 (0-9,5)	22 (3,75-38)	0 (0-1,5)	3 (0-39,5)	20 (0-25)	7,5 (0-23,5)	0 (0-12,75)		
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	13 (0-100)	7 (0-148)	0 (0-187,5)	15,5 (0-77,25)	15,5 (0-110,75)	0 (0-3,9)	0 (0-32)	0 (0-40)	0 (0-82,75)	0 (0-46,5)		
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (15,4)	2 (15,4)	2 (15,4)	0 (0)	2 (15,4)	2 (15,4)	3 (23,1)	2 (15,4)	0 (0)	1 (7,7)		
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	3 (23,1)	4 (30,8)	4 (30,8)	4 (30,8)	4 (30,8)	2 (15,4)	3 (23,1)	2 (15,4)	4 (30,8)	2 (15,4)		

Tabla R.1.46. Valores de las P de los análisis estadísticos al comparar la respuesta inmune frente a neumococo en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

Respuesta a neumococo	Grupo placebo						Grupo vacunado						P meses 0-12 intergrupos*
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12			
Humoral cuantitativa	0,42	-	-	-	0,75	0,019	-	-	-	0,036	0,073		
Humoral cualitativa	0,25	-	-	-	1	0,45	-	-	-	0,62	-		
Celular (ELISPOT) cuantitativa	0,21	0,11	0,14	0,038	0,11	0,73	0,77	0,48	0,25	0,46	0,19		
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa	0,46	0,92	0,73	0,4	0,81	0,55	0,34	0,6	0,5	0,34	0,57		
Celular (ELISPOT) cualitativa	1	1	0,5	0,5	1	1	1	0,5	1	1	-		
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1	1	1	0,69	1	1	1	1	1	1	-		

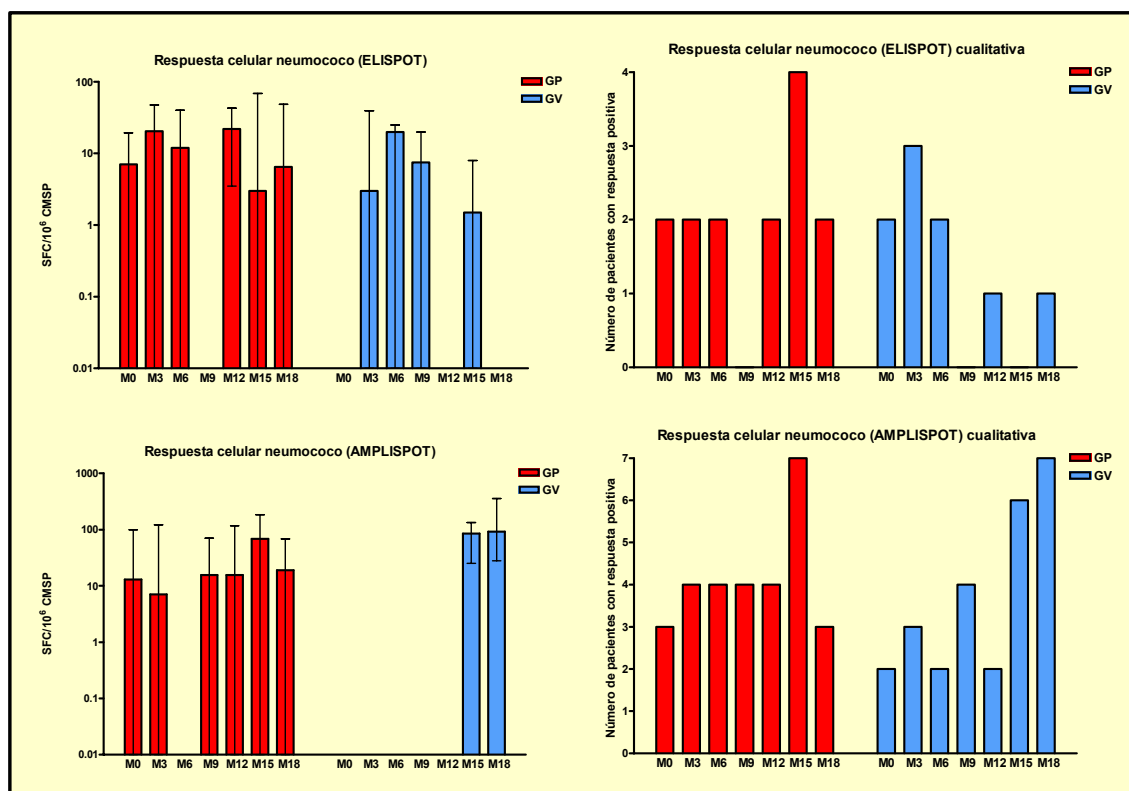


Figura R.1.39. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al neumococo durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de *spots*; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

1.3.6.9. Respuesta a tétanos

Se administró una dosis de vacuna Td (tétanos-difteria) en el GV, que incluye la vacuna antitetánica, y una dosis de placebo en el GP en el mes 10. Las respuestas humoral y celular en los diferentes meses en el GP y el GV se pueden ver en las **Figuras R.1.40.-R.1.41.** y en las **Tablas R.1.47.-R.1.48.**

- Respuesta humoral

En el GV se produjo tras la vacunación antitetánica (mes 10) un aumento significativo del título de anticuerpos ($p = 0,006$), con una razón mediana de 4,38 veces (rango intercuartílico 2,78-13,7), significativamente superior al cambio experimentado en el GP ($p = 0,014$).

Tabla R.1.47. Respuestas inmune humoral y celular frente a tétanos, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta a tétanos	Grupo Placebo						Grupo Vacunado													
	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12	Mes 0	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Mes 12					
Humoral cuantitativa (UJ/mL)	0,09 (0,01-1,97)	0,35 (0,01-1,4)	0,3 (0,01-2,45)	0,25 (0,01-3,4)	0,21 (0,05-3,27)	0,65 (0,04-2,18)	0,89 (0,16-1,46)	0,69 (0,17-2,4)	0,91 (0,21-1,59)	4 (1,26-5)	0 (0-47,5)	31 (15-54,5)	7 (0-49,5)	0 (0-36,5)	7,5 (3,75-66,25)	0 (0-6)	0 (0-36,5)	15 (0-43)	9 (0-29)	5 (0-30,5)
Humoral cualitativa	10 (76,9)	8 (61,5)	8 (61,5)	8 (61,5)	10 (76,9)	13 (100)	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)	13 (100)	0 (0-19)	49 (0-226,75)	20 (0-281,75)	0 (0-87,75)	0 (0-38,5)	0 (0-19)	0 (0-45)	36,5 (0-87,75)	29 (4-51,5)	2 (15,4)
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-47,5)	31 (15-54,5)	7 (0-49,5)	0 (0-36,5)	7,5 (3,75-66,25)	0 (0-6)	0 (0-36,5)	0 (0-43)	9 (0-29)	5 (0-30,5)	3 (23,1)	4 (30,8)	2 (15,4)	2 (15,4)	3 (23,1)	2 (15,4)	3 (23,1)	2 (15,4)	6 (46,2)	3 (23,1)
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-19)	49 (0-226,75)	20 (0-281,75)	0 (0-87,75)	0 (0-38,5)	0 (0-19)	0 (0-42,5)	0 (0-45)	36,5 (0-87,75)	29 (4-51,5)	0 (0-19)	49 (0-226,75)	20 (0-281,75)	0 (0-87,75)	0 (0-38,5)	0 (0-19)	0 (0-45)	36,5 (0-87,75)	29 (4-51,5)	2 (15,4)
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (23,1)	4 (30,8)	2 (15,4)	2 (15,4)	3 (23,1)	0 (0)	2 (15,4)	2 (15,4)	1 (7,7)	2 (15,4)	1 (7,7)	6 (46,2)	3 (23,1)	3 (23,1)	2 (15,4)	3 (23,1)	2 (15,4)	6 (46,2)	3 (23,1)	
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1 (7,7)	6 (46,2)	3 (23,1)	3 (23,1)	2 (15,4)	2 (15,4)	3 (23,1)	2 (15,4)	6 (46,2)	3 (23,1)	1 (7,7)	6 (46,2)	3 (23,1)	3 (23,1)	2 (15,4)	3 (23,1)	2 (15,4)	6 (46,2)	3 (23,1)	

Tabla R.1.48. Valores de las P de los análisis estadísticos al comparar la respuesta inmune frente a tétanos en grupo placebo y vacunado. *Es la P de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de los títulos de anticuerpos entre los meses 0 y 12

Respuesta a tétanos	Grupo placebo						Grupo vacunado						P meses 0-12 intergrupos*
	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-3	meses 3-6	meses 6-9	meses 9-12	meses 0-12	meses 0-12		
Humoral cuantitativa	0,77	1	0,73	1	0,059	0,59	0,44	0,89	0,006	0,019	0,14		
Humoral cualitativa	0,5	1	1	0,5	1	0,5	1	1	1	1	-		
Celular (ELISPOT) cuantitativa	0,074	0,29	1	0,39	0,33	0,29	0,95	0,93	0,73	0,25	0,93		
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa	0,028	0,5	0,75	0,34	0,6	0,18	0,57	0,5	0,33	0,24	0,21		
Celular (ELISPOT) cualitativa	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	-		
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	0,25	0,62	1	1	1	1	1	0,25	0,69	0,5	-		

Cualitativamente, 11 de los pacientes vacunados eran seropositivos para tétanos y los 2 restantes seroconvirtieron tras la vacuna (tasa de respuesta del 100% [95% IC 16,81-100%]).

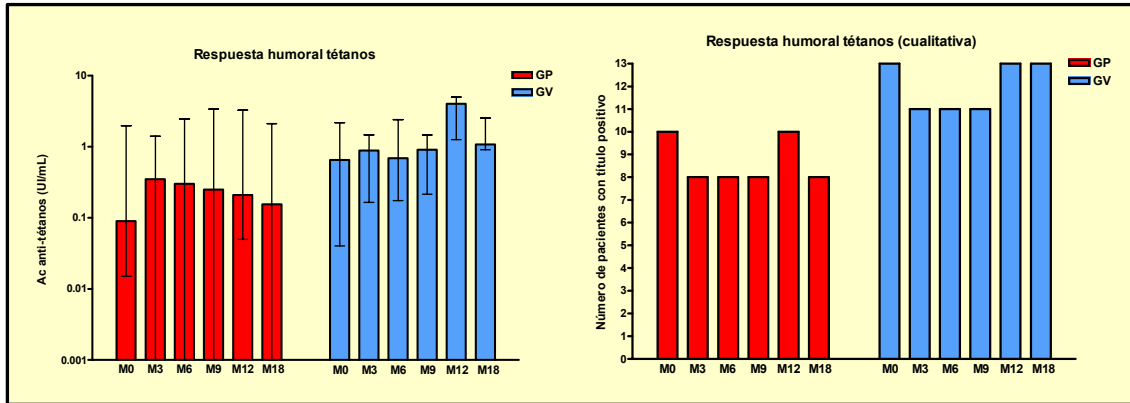


Figura R.1.40. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a tétanos durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; Ac: Anticuerpos)

- Respuesta celular

El único cambio significativo que se halló en el análisis de la respuesta celular a tétanos fue un incremento en el GP, tanto por ELISPOT ($p = 0,074$) como por AMPLISPOT ($p = 0,028$), entre los meses 0 y 3. No se detectaron otros cambios significativos ni intragrupos ni intergrupos, ni cuantitativos ni cualitativos; tampoco un aumento de la respuesta significativo entre los meses 9 y 12, ni diferencias en la razón entre grupos ($p = 0,2$ y $0,21$ para la comparación entre razones medidas por ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente).

Los valores nulos/cero fueron el 14,8% / 34,21% y 18,1% / 33% de las determinaciones por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente.

Al analizar la correlación entre las respuestas celulares para tétanos medidas por ELISPOT y AMPLISPOT hallamos ausencia de correlación significativa para todas las determinaciones. Únicamente las determinaciones realizadas en el mes 15 presentaban una tendencia a la significación ($p = 0,083$). Cuando se realizó el análisis global con todas las determinaciones, tampoco se hallaron correlaciones entre ellas, y la comparación de la

transformación logarítmica sólo mostró una tendencia a la significación ($p = 0,056$). Tampoco se halló correlación entre las respuestas humorales y celulares ($p > 0,1$).

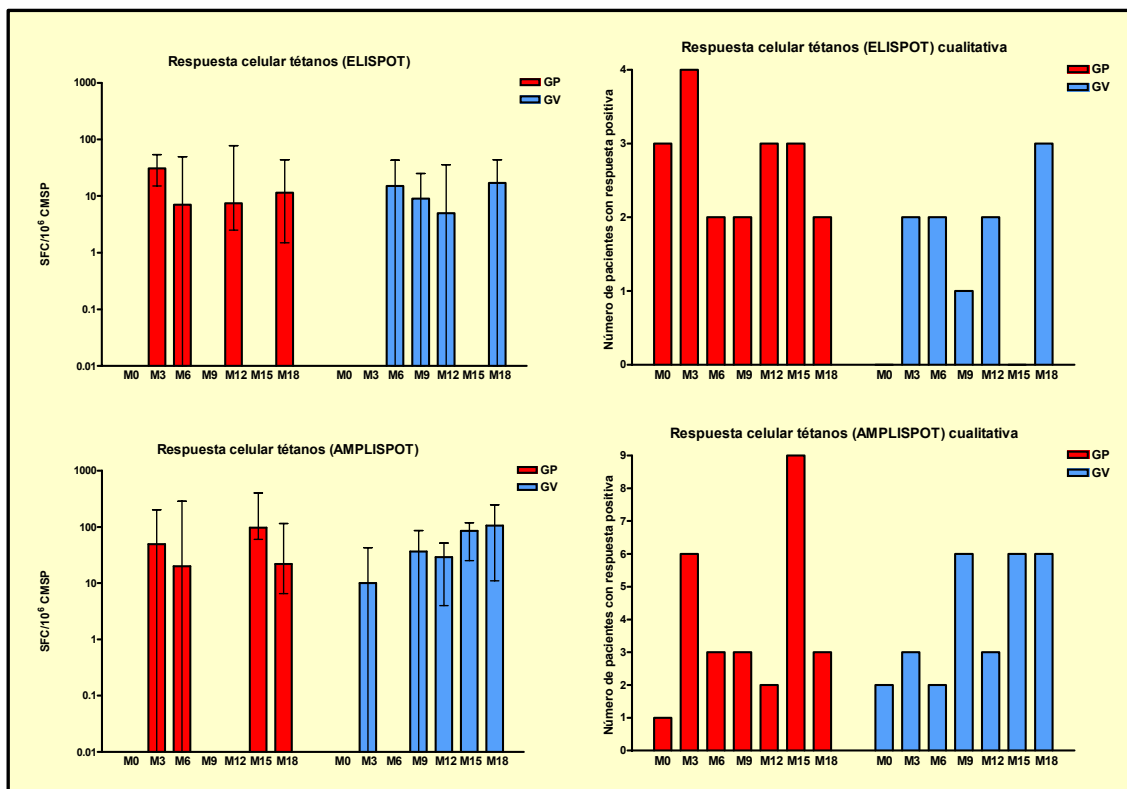


Figura R.1.41. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a tétanos durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

1.3.6.10. Respuesta a difteria

Se administró una dosis de vacuna Td (tétanos-difteria) en el GV, que incluye la vacuna antidiftérica, y una dosis de placebo en el GP en el mes 10. Sólo se evaluó la respuesta humoral (Figura R.1.42. y en la Tabla R.1.49.).

Entre los meses 0 y 12 se produjo un aumento del título de anticuerpos significativo en los dos grupos ($p = 0,042$ y $0,018$ para GP y GV respectivamente). Dicho incremento fue mayor en el GV (aunque no alcanzó a ser significativamente diferente al aumento conseguido en el GP, $p = 0,28$).

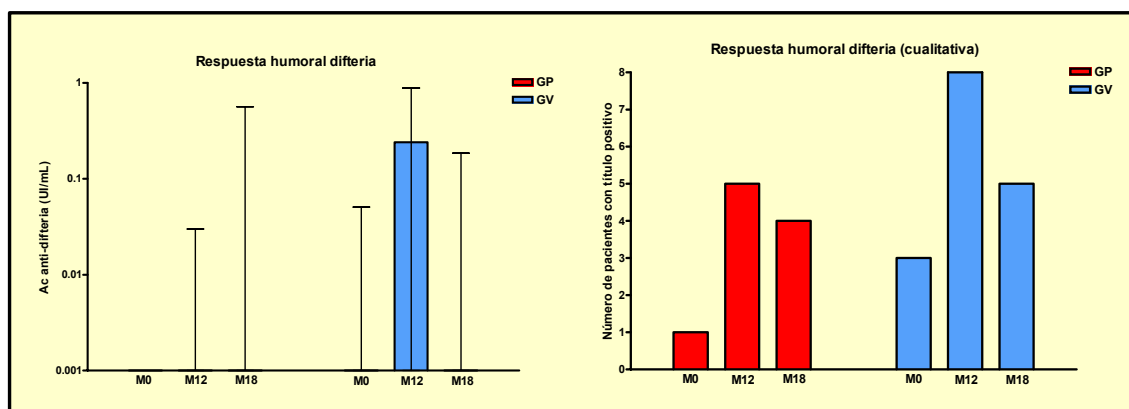


Figura R.1.42. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a difteria durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; Ac: Anticuerpos)

Desde el punto de vista cualitativo, también aumentó el número de pacientes positivos en los dos grupos, pero sólo con tendencia a la significación estadística en el GV, donde pasó de 3 a 8 ($p = 0,063$). La tasa de respuestas a la vacunación de difteria fueron del 50% (5/10) (95% IC: 18,7-81,3%).

Tabla R.1.49. Respuesta inmune humoral frente a difteria, tanto cuantitativa como cualitativa. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo

Respuesta a difteria	Grupo Placebo			Grupo Vacunado			P meses 0-12 intergrupos*
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 0	Mes 12	P	
Humoral cuantitativa (UI/mL)	0,01 (0,01-0,01)	0,01 (0,01-0,03)	0,042	0,01 (0,01-0,05)	0,24 (0,01-0,88)	0,018	0,28
Humoral cualitativa	1 (7,7)	5 (38,5)	0,12	3 (23,1)	8 (61,5)	0,063	-

1.4. CAMBIOS TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TRATAMIENTO

1.4.1. Generalidades

Tras haber recibido los 12 meses de tratamiento y vacunas (GV) o tratamiento y placebo (GP), los pacientes suspendían el TARGA que estaban recibiendo. En este punto, y como se comentó con anterioridad, el análisis se limitó a 25 pacientes y no 26, pues un paciente del GP tuvo una pérdida de seguimiento en el mes 9 por *exitus*.

La suspensión en el mes 12 se hizo retirando de forma simultánea todos los fármacos antirretrovirales, excepto en aquellos pacientes que tomaban efavirenz o nevirapina (7 en el GP, 4 en el GV), en los que estos fármacos se suspendieron 5 días antes que el resto.

Ninguno de los pacientes experimentó efectos secundarios en el periodo sin TARGA. No refirieron sintomatología alguna relacionada con un síndrome retroviral agudo ni presentaron infecciones comunitarias u oportunistas.

De los 25 pacientes, sólo uno (GV) tuvo que reiniciar el TARGA en el mes 18 por haber caído por debajo de los 350 linfocitos T CD4⁺/mm³ (180 linfocitos T CD4⁺/mm³ en el mes 17). Tampoco este paciente presentó efectos secundarios atribuibles a la inmunosupresión.

Otro de los pacientes (GV) voluntariamente reinició el TARGA en el mes 15.

1.4.2. Cambios en la carga viral

1.4.2.1. Rebote viral

Los 25 pacientes presentaron un rebote de la CV al interrumpir el TARGA.

Cuando se compararon los rebotes que sufrieron el GP y el GV, aunque fue mayor en el GV, en ninguna de las variables virológicas estudiadas (CV en el primer mes (mes 13), CV en el último mes (mes 18), CV en el resto de los meses de parada, CV pico, mes de CV pico o AUC del rebote viral) se hallaron diferencias significativas (**Figuras R.1.43-R.1.45.** y **Tabla R.1.50.**).

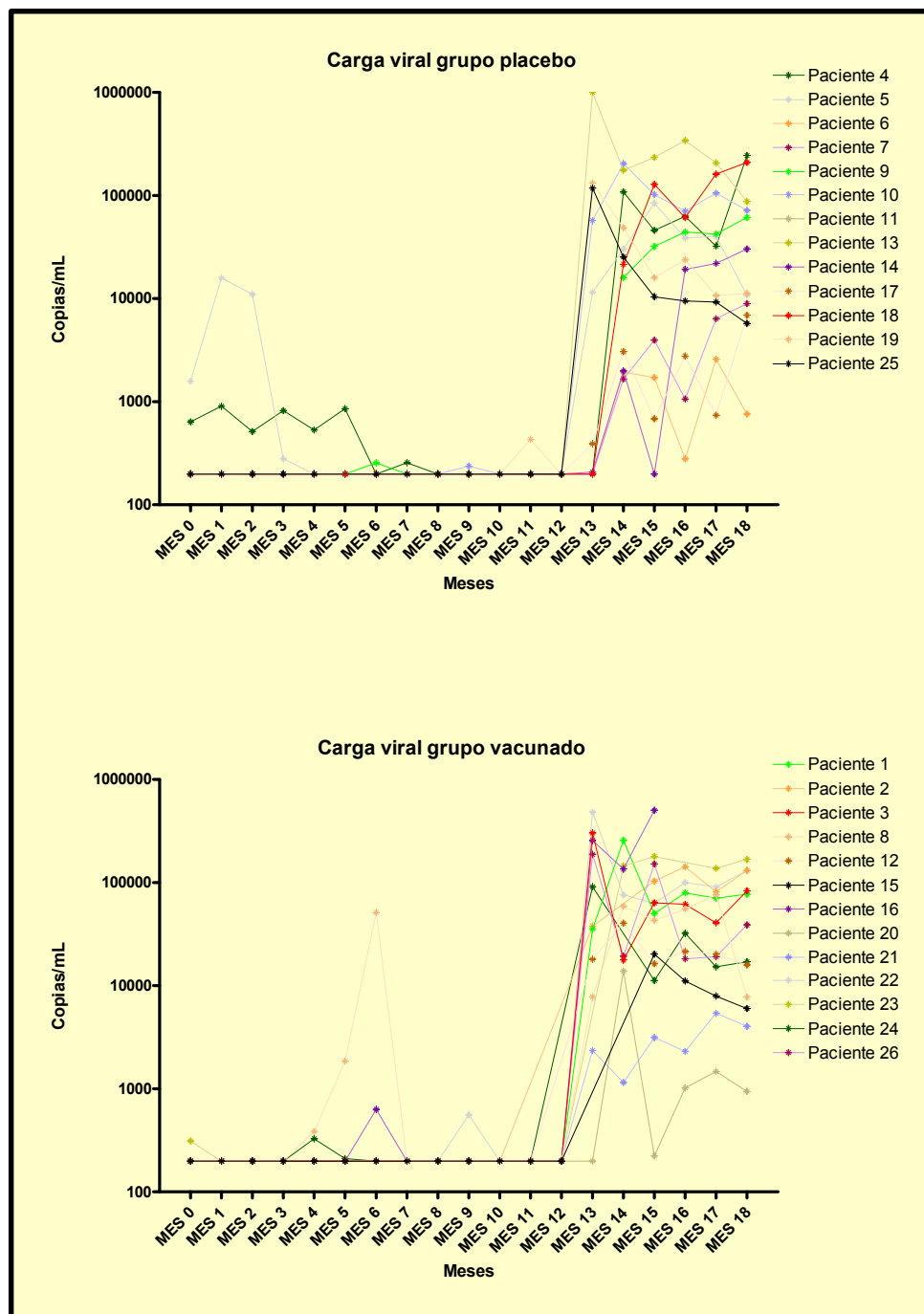


Figura R.1.43. Cargas virales durante el tratamiento y en el rebote de los pacientes en los grupos vacunado y placebo.

Quando se analizó la proporción de pacientes que al final del estudio tenían menos de 5000 copias/mL, criterio descrito en el protocolo para reiniciar el TARGA en el mes 18, se halló que no hubo diferencias entre los grupos: sólo 1 paciente en el GP (0,083, 95% IC 0,0021-0,38)

Resultados

y 2 en el GV (0,154, 95% IC 0,019-0,45) estuvieron por debajo de esa cifra en el mes 18 ($p = 1$, test exacto de Fisher; RR 1,85 [95% IC 0,19-17,85]).

El rebote viral no se correlacionó con el nadir de linfocitos T CD4⁺ (ni en porcentaje ni en números absolutos).

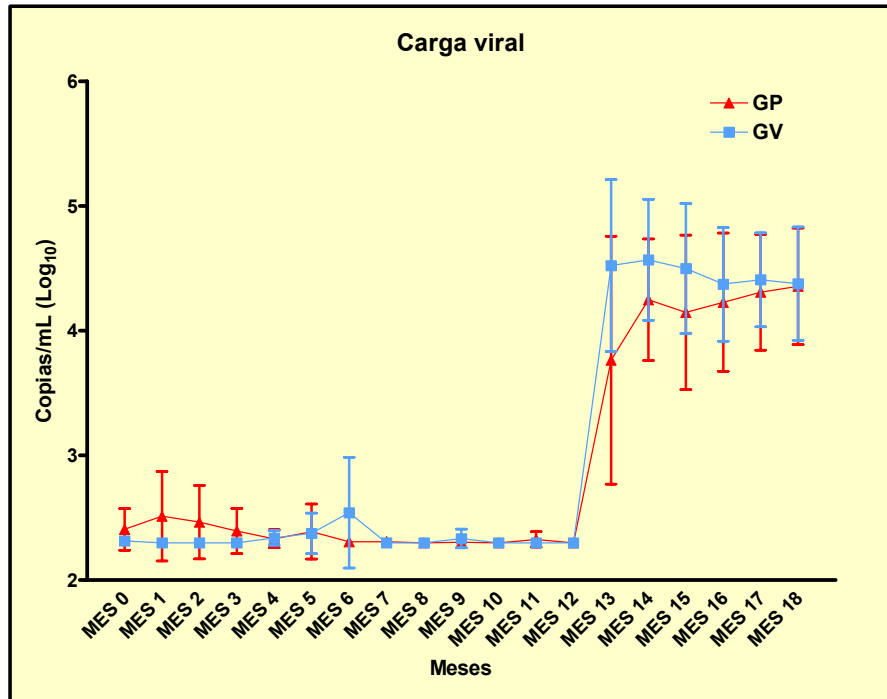


Figura R.144. Cargas virales durante el tratamiento y en el rebote de los grupos vacunado y placebo (GP: Grupo placebo; GV: Grupo vacunado). Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación

Figura R.145. Comparación de las cargas virales pico tras el rebote entre los GP y GV (GP: Grupo placebo; GV: Grupo vacunado)

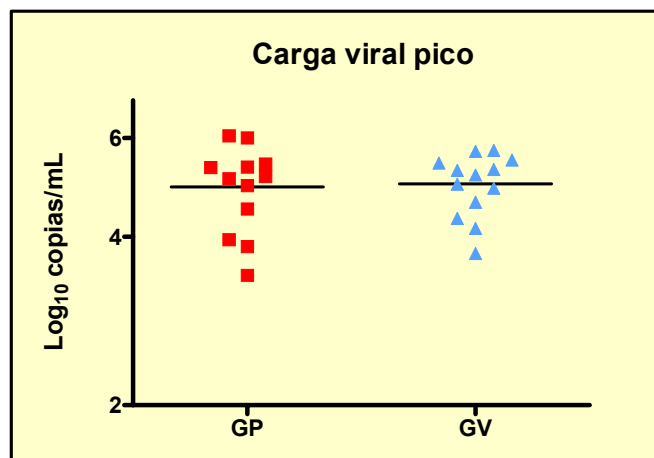


Tabla R.1.50. Comparación de variables virológicas en el rebote entre los grupos vacunado y placebo. Se exponen la media y la desviación típica de las variables

Variables virológicas en el rebote	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Carga viral mes 13 (copias/mL log ₁₀)	3,76 ± 1,56	4,52 ± 1,03	0,18
Carga viral mes 18 (copias/mL log ₁₀)	4,36 ± 0,73	4,38 ± 0,71	0,94
Carga viral pico (copias/mL log ₁₀)	4,9 ± 0,83	4,97 ± 0,61	0,83
Mes de carga viral pico	15,67 ± 2,35	14,38 ± 1,5	0,12
Área neta bajo la curva de carga viral en el rebote	10,23 ± 4,39	11,99 ± 3,89	0,3

1.4.2.2. Mutaciones en el virus de rebote

Tabla R.1.50. Mutaciones halladas en el genotipado del virus en la primera carga viral del rebote y su interpretación (TARGA: Tratamiento antiretroviral de alta eficacia; TI: Transcriptasa Inversa, 3TC: Lamivudina; ABC: Abacavir; NFV: Nelfinavir; D4T: Didanosina; AZT: Zidovudina; DDI: Didanosina; EFV: Efavirenz; TFV: Tenofovir; LPV/r: Lopinavir/ritonavir; NVP: Nevirapina; S: Sensible)

Número paciente	TARGA actual	Mutaciones genéticas		Interpretación
		TI	Proteasa	
Grupo placebo				
4	3TC+ABC+NFV	-	L33I, L63P, A71T, V77I, I93L	S
5	3TC+ABC+AZT	-	L63P	S
6	D4T+DDI+NEV	-	L63P	S
7	3TC+AZT+EFV	-	-	S
9	3TC+ABC+NFV	M41L, T215	L10I, L63P, A71T, V77I, I93L	S intermedia a D4T y AZT
10	3TC+AZT+EFV	-	M36I	S
11	3TC+ TFV+ LPV/r	Pérdida seguimiento mes 9		
13	3TC+TFV+NVP	-	L63P, V77I, I93L	S
14	3TC+DDI+NFV	No realizado		
17	3TC+AZT+EFV	V118I	L63P, A71V, I93L	S
18	3TC+AZT+EFV	P225H	L63P, I93L	S intermedia a EFV
19	3TC+D4T+NFV	G333E	L63P	S
25	3TC+AZT+NVP	-	L10V, L33V	S
Grupo vacunado				
1	3TC+ABC+NFV	-	B77I	S
2	3TC+LPV/r+D4T	-	L63P	S
3	3TC+AZT+EFV	-	L63P, I93L	S
8	3TC+DDI+NFV	T69S	L10I, M36I, L63T	S
12	3TC+DDI+NFV	G333E	M36I, L63P, I93L	S
15	D4T+DDI+NVP	No realizado		
16	3TC+TFV+EFV	-	L63P, I93L, V77I	S
20	3TC+AZY+EFV	Virus no amplificable		
21	3TC+ABC+NFV	-	L63P	S
22	D4T+DDI+NFV	-	L63P, A71T, V77I, I93L	S
23	3TC+DDI+NFV	T69N	K20I, M36I, L63P	S
24	3TC+DDI+NFV	-	-	S
26	3TC+DDI+NFV	-	A71T, V77I, I93L	S

De los 25 pacientes que suspendieron el tratamiento, se pudo realizar un genotipado de la primera CV que rebotaba en 22 pacientes (11 GV y 11 GP). Éste se realizó en el mes 13 en 16 de los casos (6 GP y 10 GV) y en el mes 14 en los 6 restantes (5 GP y 1 GV). Se encontraron mutaciones en el gen de la retrotranscriptasa en 7 pacientes (4 GP y 3 GV) y en el gen de la proteasa en 21 pacientes (10 GP y 11 GV). Éstas fueron mayoritariamente polimorfismos que se consideran no confieren resistencia, excepto en un paciente en el que una mutación en la retrotranscriptasa confería sensibilidad intermedia al efavirenz (GP), y en otro paciente (GP) con mutaciones que conferían sensibilidad intermedia a estavudina y zidovudina (**Tabla R.1.50.**).

1.4.3. Cambios en el sistema inmune

1.4.3.1. *Subpoblaciones linfocitarias*

Los cambios experimentados por las diferentes poblaciones linfocitarias tras suspender el TARGA se pueden observar en las **Figuras R.1.46.-R.1.53.** y en las **Tablas R.1.51.-R.1.52.**

- **Linfocitos totales:** En el GP se produjo un ascenso inicial significativo hasta el mes 15 ($p = 0,046$), con un descenso posterior hasta el mes 18 ($p = 0,027$), mientras que en el GV no se observó esta tendencia, sino que incluso desde el mes 14 se experimentó un ascenso progresivo aunque sin significación estadística. Al comparar entre grupos, se observó una tendencia a la significación estadística en los cambios producidos en estas dos mitades: entre los meses 13-15 ($p = 0,054$) y 15-18 ($p = 0,065$).

Tabla R.1.51. Evolución de las subpoblaciones linfocitarias durante el periodo de interrupción de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de la proporción de cada población (P* de la diferencia 15-18 intragrupo; P de la diferencia 12-18 intragrupo; P*** de la diferencia 12-18 intergrupos)**

Subpoblaciones linfocitarias (%)	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***
Linfocitos totales (cel/mm ³)	1950 ± 410,83	2222,50 ± 517,7	0,046	1987,5 ± 589,99	0,027	0,76	2073,85 ± 880,8	2042,5 ± 738,06	0,77	2138,33 ± 891,88	0,5	0,77	0,91
CD4 ⁺	39,83 ± 9,28	30,4 ± 9,81	<0,001	28,78 ± 9,02	0,34	<0,001	35,09 ± 7,55	29,16 ± 7,85	0,015	27,56 ± 9,28	0,69	0,038	0,38
CD8 ⁺	34,31 ± 6,46	46,12 ± 9,78	<0,001	45,65 ± 10,84	0,85	0,002	33,22 ± 8,6	44,17 ± 10,77	0,003	43,04 ± 8,63	0,94	0,003	0,83
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,2 ± 0,42	0,69 ± 0,34	<0,001	0,67 ± 0,28	0,74	<0,001	1,13 ± 0,44	0,69 ± 0,31	0,004	0,64 ± 0,29	0,37	0,003	0,96
CD4 ⁺ CD28 ⁺	92,03 ± 6,77	89,78 ± 8,48	0,07	91,06 ± 7,16	0,3	0,22	95,41 ± 5	94,86 ± 5,12	0,78	96,26 ± 3,14	0,23	0,94	0,34
CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	7 ± 6,05	7,97 ± 6,59	0,35	7,15 ± 5,74	0,38	0,81	3,52 ± 4,37	3,76 ± 4,34	0,98	2,53 ± 3,11	0,2	0,78	0,72
CD4 ⁺ CD38 ⁺	40,66 ± 12,51	43,83 ± 15,27	0,38	50,61 ± 12,63	0,15	0,008	55,23 ± 10,95	54,79 ± 6,81	0,97	57,42 ± 11,76	0,23	0,91	0,09
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	2,04 ± 1,3	4,59 ± 2,78	<0,001	5,29 ± 3,89	0,25	0,003	3,15 ± 1,91	4,3 ± 3,63	0,29	4,02 ± 1,7	0,36	0,15	0,035
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	1,9 ± 0,98	6,82 ± 13,01	0,22	3,98 ± 2,72	0,47	0,033	6,8 ± 6,64	3,64 ± 1,98	0,1	3,76 ± 2,98	0,8	0,16	0,039
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁻	30,27 ± 12,31	27,61 ± 14,05	0,41	33,21 ± 13,01	0,006	0,23	39,89 ± 11,68	39,45 ± 4,6	0,91	42,31 ± 6,64	0,32	0,73	0,56
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	62,59 ± 11,36	62,58 ± 16,75	1	60,47 ± 13,19	0,51	0,33	49,07 ± 13,66	52,25 ± 6,6	0,41	50,68 ± 11,03	0,68	0,23	0,12
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	31,35 ± 13,47	26,57 ± 17,76	0,29	34,39 ± 13,95	0,03	0,12	40,25 ± 16,46	41,05 ± 6,17	0,85	44,56 ± 8,18	0,15	0,48	0,97
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	27,63 ± 17,52	24,06 ± 20,18	0,64	28,91 ± 23,45	0,61	0,88	42,89 ± 30,26	30,01 ± 16,72	0,33	32,75 ± 20,32	0,47	0,22	0,28
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	2,68 ± 2,16	3,52 ± 3,64	0,43	4,79 ± 4,12	0,3	0,14	4,62 ± 3,45	5,53 ± 4,72	0,56	4,29 ± 2,55	0,42	0,98	0,23
CD8 ⁺ CD28 ⁺	54,46 ± 12,35	44,99 ± 11,24	<0,001	48,89 ± 7,53	0,23	0,066	57,59 ± 14,29	45,75 ± 11,31	0,019	45,87 ± 9,34	0,32	0,029	0,28
CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	35,22 ± 11,26	36,11 ± 9,43	0,61	32,95 ± 7,1	0,08	0,25	33,42 ± 12,08	31,94 ± 11,86	0,73	31,89 ± 8,97	0,09	0,49	0,92
CD8 ⁺ CD38 ⁺	32,77 ± 12,34	56,78 ± 14,49	<0,001	56,82 ± 13,73	0,99	<0,001	39,13 ± 10,8	56,82 ± 14,48	0,01	56,49 ± 8,08	0,79	0,002	0,17
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	8,21 ± 4,62	28,69 ± 14,18	<0,001	26,42 ± 11,27	0,43	<0,001	11,03 ± 5,94	29,11 ± 17,74	0,007	26,64 ± 9,19	0,96	<0,001	0,53

Tabla R.1.51. (continuación)

Subpoblaciones linfocitarias (%)	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						P***
	Mes 12	Mes 15	Mes 18	P	P**	P***	Mes 12	Mes 15	Mes 18	P	P**	P***	
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	7,64 ± 4,89	13,16 ± 11,21	13,07 ± 10,99	0,18	0,98	0,047	14,39 ± 8,44	11,29 ± 5,7	11,16 ± 6	0,22	0,76	0,45	0,062
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	54,26 ± 11,03	41,24 ± 8,4	41,37 ± 10,76	<0,001	0,94	<0,001	51,65 ± 14,65	36,9 ± 12,69	40,7 ± 14,3	0,001	0,89	<0,001	0,49
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	33,16 ± 15,29	24,21 ± 13,32	25,8 ± 9,92	0,001	0,63	0,017	31,59 ± 13,68	24,08 ± 7,87	26,38 ± 6,15	0,11	0,41	0,26	0,65
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	35,12 ± 10,73	43,83 ± 11,77	44,13 ± 12,82	0,03	0,95	0,001	31,52 ± 11,84	49,64 ± 14,43	47,22 ± 14,82	<0,001	0,73	<0,001	0,046
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	28,09 ± 13,56	21,24 ± 19,63	20,22 ± 14,63	0,4	0,9	0,077	34,55 ± 22,48	14,51 ± 7,71	18,24 ± 10,92	0,023	0,2	0,027	0,2
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	9,39 ± 7,13	10,23 ± 10,23	17,94 ± 15,21	0,75	0,14	0,11	14,6 ± 6,99	19,63 ± 12,14	12,22 ± 5,55	0,2	0,11	0,5	0,076
CD4 ⁺ CD25 ⁺	4,11 ± 2,24	3,69 ± 2,92	4,46 ± 2,49	0,49	0,41	0,59	4,65 ± 3,04	5,49 ± 7,2	4,42 ± 4,09	0,75	0,64	0,83	0,71
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	2,05 ± 0,52	4,53 ± 2,52	4,98 ± 2,15	0,013	0,44	0,001	1,97 ± 1,01	4,92 ± 3,68	3,76 ± 1,06	0,005	0,52	<0,001	0,16
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	1,59 ± 0,89	1,23 ± 0,5	1,56 ± 0,79	0,29	0,25	0,9	1,87 ± 1,67	1,51 ± 0,93	1,10 ± 0,7	0,46	0,93	0,42	0,47
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	1,52 ± 1,12	3,12 ± 1,65	3,76 ± 1,44	0,016	0,25	<0,001	1,56 ± 1,59	4,57 ± 5,05	2,79 ± 1,62	0,084	0,42	0,016	0,097
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	1,56 ± 0,82	1,22 ± 0,82	1,12 ± 0,65	0,41	0,75	0,095	1,15 ± 0,77	1,94 ± 3,38	1,07 ± 0,68	0,46	0,68	0,79	0,26
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	2,70 ± 2,05	1,87 ± 1,5	2,87 ± 1,8	0,39	0,22	0,8	2,12 ± 1,39	3,42 ± 3,51	2,2 ± 1,41	0,27	0,64	0,79	0,99

Tabla R.1.52. Áreas netas bajo la curva de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y las subpoblaciones en proliferación tras la interrupción del tratamiento. Se muestran las medias y las desviaciones típicas de cada variable

Subpoblaciones linfocitarias	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Linfocitos totales	882,08 ± 1970,55	357 ± 3234,05	0,63
CD4 ⁺	-52,41 ± 19,84	-36,18 ± 29,61	0,12
CD8 ⁺	52,46 ± 35,81	50,34 ± 49,77	0,9
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-2,49 ± 1,14	-2,25 ± 1,97	0,71
CD4 ⁺ CD28 ⁺	-15,89 ± 18,57	-0,34 ± 16,31	0,036
CD4 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	6,97 ± 17,75	-2,9 ± 15,19	0,15
CD4 ⁺ CD38 ⁺	33,02 ± 54,39	4,99 ± 64,95	0,26
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	14,83 ± 9,89	5,12 ± 16,84	0,096
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	13,17 ± 16,22	-18,88 ± 34,11	0,007
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	2,86 ± 46,55	4,8 ± 38	0,91
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	-3,55 ± 56,02	9,14 ± 63,19	0,6
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	-12,21 ± 41,45	11,39 ± 42,4	0,17
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	-15,79 ± 92,97	-48,73 ± 187,17	0,58
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	4,23 ± 12,16	-0,88 ± 16,38	0,39
CD8 ⁺ CD28 ⁺	-47,64 ± 25,1	-56,75 ± 71,75	0,67
CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	1,99 ± 32,3	-13,91 ± 52,13	0,37
CD8 ⁺ CD38 ⁺	117,2 ± 38,34	97,56 ± 96,85	0,51
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	92,88 ± 45,36	96,32 ± 83,19	0,9
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	28,05 ± 38,28	-19,26 ± 50,37	0,015
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	-60,3 ± 26,81	-58,82 ± 42,12	0,92
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	-34,10 ± 31,09	-28,88 ± 65,23	0,27
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	34,74 ± 29,57	80,12 ± 43,31	0,006
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	-49,52 ± 70,89	-80,90 ± 140,78	0,49
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	7,06 ± 33,58	3,65 ± 38,83	0,82
CD4 ⁺ CD25 ⁺	-2,13 ± 8,88	-3,32 ± 17,57	0,83
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	12,25 ± 6,84	16,9 ± 16,11	0,36
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	-0,83 ± 4,12	-1,51 ± 10,64	0,84
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	10,42 ± 7,03	17,25 ± 26,19	0,38
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	-2,37 ± 3,46	3,3 ± 12,59	0,15
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	-1,8 ± 12,12	7,86 ± 20,86	0,17

- Linfocitos CD4⁺: En ambos grupos se produjo el mismo cambio tras la retirada del tratamiento: una disminución significativa en la población de linfocitos CD4⁺, sobre todo en los tres primeros meses (diferencia 12-15 significativa en ambos grupos, con $p < 0,001$ y $0,015$ para GP y GV respectivamente), estabilizándose después hasta el mes 18 (diferencias 15-18 no significativas, con $p = 0,34$ y $0,69$ para GP y GV respectivamente). La diferencia final 0-18 y 12-18 fue significativa en ambos grupos ($p < 0,001$ y $0,001$ para GP y GV en la diferencia 0-18 y $p < 0,001$ y $0,038$ para GP y GV en la diferencia 12-18). Cuando se comparon los cambios entre grupos, se pudo observar que la caída de esta población fue mayor en el GP, básicamente a

expensas de una mayor pendiente de caída entre los meses 12 y 16 ($p = 0,015$ para la diferencia 12-16 entre grupos), aunque el AUC resultante de la evolución de la población entre los meses 12-18 no fue significativamente diferente entre los grupos ($p = 0,12$). Cuando se analizó la caída porcentual de la proporción de linfocitos T CD4⁺ de cada grupo entre los meses 12 y 13 (primer mes tras la parada) y 12-18 (tras los 6 meses de parada) no se encontraron tampoco diferencias significativas ($p = 0,92$ y $0,41$ respectivamente).

No se hallaron correlaciones entre la magnitud de la caída inicial de los linfocitos T CD4⁺ tras la interrupción y la edad de los pacientes ($p = 0,96$ para la correlación entre la edad a la inclusión y el porcentaje de caída entre los meses 12 y 14), ni con la magnitud del rebote ($p > 0,1$), pero sí se halló una correlación negativa con el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ nadir ($p = 0,029$, $r = -0,477$), de forma que cuanto más alto era el nadir, menor fue la caída, y positiva con los linfocitos T CD4⁺ en el mes 12: cuanto mayor fue el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en el mes 12, mayor fue la caída ($p = 0,007$, $r = 0,529$ en la correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en el mes 12 y el AUC entre los meses 12 y 18) y también con la ganancia de linfocitos T CD4⁺ desde el nadir hasta la interrupción ($p = 0,001$, $r = 0,615$ en la correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en el mes 12 y el AUC entre los meses 12 y 18).

Como se comentó en el diseño del estudio, los pacientes que disminuían por debajo de los 350 linfocitos T CD4⁺/mm³ dentro de los primeros 6 meses tras la parada del tratamiento debían reiniciar el TARGA. Sólo un paciente en el GV llegó a tal cifra en el mes 17, no estableciéndose por tanto diferencias significativas entre grupos a este respecto ($p = 1$). Cuando se analizó por medio de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier los pacientes que cayeron en al menos una determinación por debajo de 500 linfocitos T CD4⁺/mm³ totales a partir del mes 12 tampoco se hallaron diferencias significativas ($p = 0,73$) (**Figura R.1.46**).

- Linfocitos CD8⁺: El comportamiento de esta subpoblación tras la parada fue el contrario a la subpoblación linfocitaria CD4⁺. Se produjo un aumento significativo en ambos grupos, sobre todo en los tres primeros meses (diferencia 12-15 significativa en ambos grupos, con $p < 0,001$ y $0,003$ para GP y GV, respectivamente), estabilizándose después hasta el mes 18 (diferencias 15-18 no significativas, con $p = 0,85$ y $0,94$ para GP y GV, respectivamente). La

diferencia final 0-18 y 12-18 fue prácticamente significativa en ambos grupos ($p = 0,11$ y $0,013$ para GP y GV en la diferencia 0-18, y $p = 0,002$ y $0,003$ para GP y GV en la diferencia 12-18). Cuando se compararon los cambios entre grupos, se pudo observar que el aumento de esta población fue mayor en el GP, básicamente a expensas de una mayor pendiente de subida entre los meses 13 y 14 ($p = 0,034$), aunque el AUC resultante de la evolución de la población entre los meses 12-18 no fue significativamente diferente entre los grupos ($p = 0,9$).

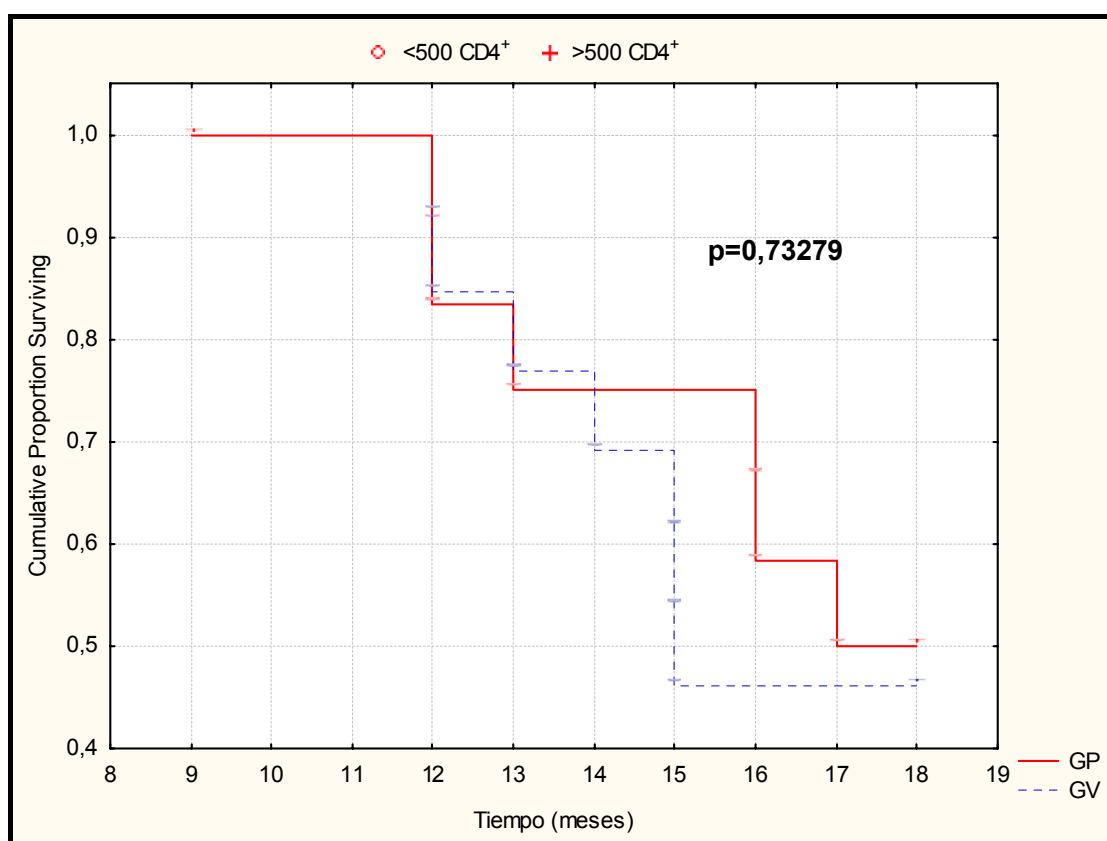


Figura R.1.46. Curva de Kaplan Meier en la que se observa la proporción de pacientes que permanecieron con una cifra de linfocitos T $CD4^+$ totales superior a 500 células/mm^3 tras la interrupción de tratamiento (mes 12) hasta el fin del protocolo (mes 18) (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Cociente $CD4^+/CD8^+$: Reflejando los cambios antagónicos en estas poblaciones tras la interrupción, el cociente entre ellas disminuyó al suspender el TARGA en ambos grupos. Los mayores cambios se produjeron sobre todo en los tres primeros meses (diferencia 12-15 significativa en ambos grupos, con $p < 0,001$ y $0,004$ para GP y GV respectivamente), estabilizándose después hasta el mes 18 (diferencias 15-18 no significativas, con $p = 0,74$ y $0,37$

para GP y GV respectivamente). La diferencia final 0-18 y 12-18 fue significativa en ambos grupos ($p = 0,025$ y $< 0,001$ para GP y GV en la diferencia 0-18 y $p < 0,001$ y $0,003$ para GP y GV en la diferencia 12-18). Cuando se compararon los cambios entre grupos, no se observaron diferencias significativas

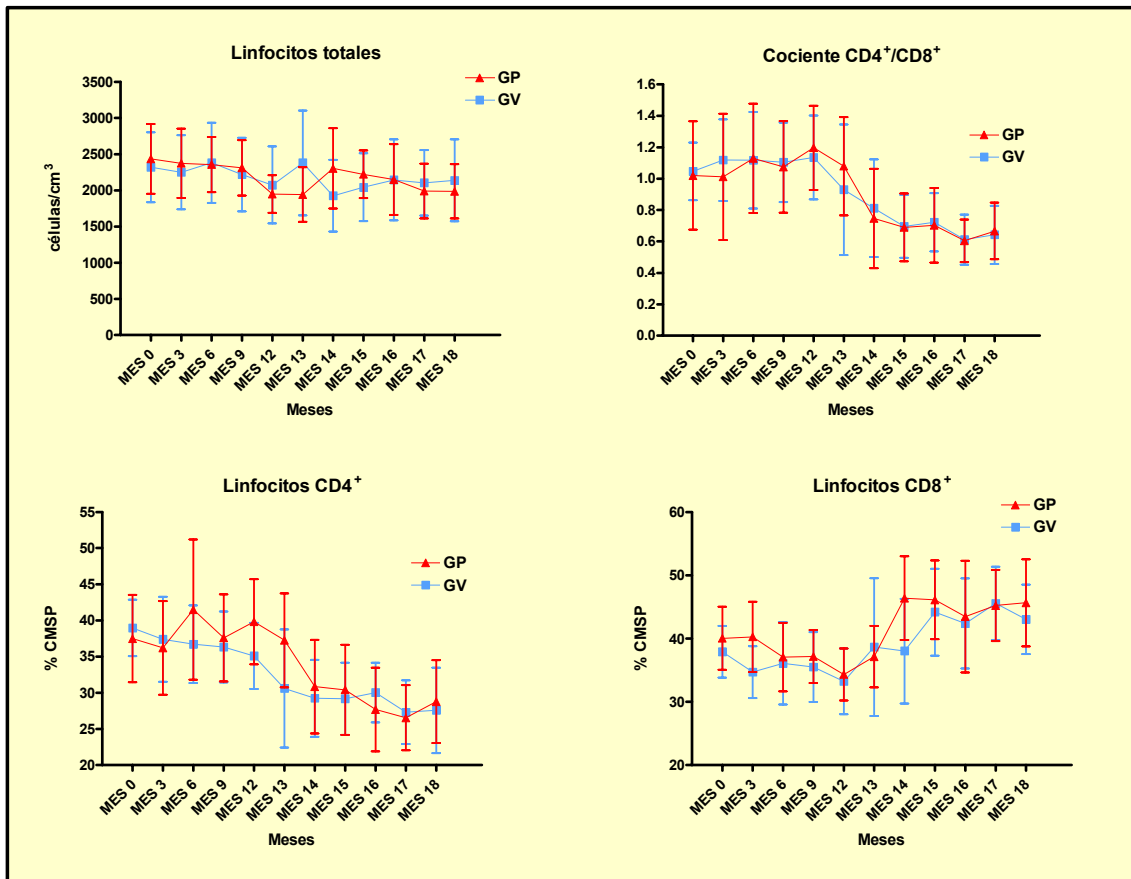


Figura R.1.47. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos totales, CD4⁺, CD8⁺ y su cociente. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

- Linfocitos CD4⁺CD28⁺: En el GP se observó un descenso significativo entre el mes 12 y 13 ($p = 0,04$), con tendencia a ser significativamente mayor que el del GV ($p = 0,057$). Posteriormente no se produjeron cambios significativos en esta población ni intra ni intergrupos, aunque el AUC en el periodo 12-18 fue significativamente mayor en el GV que en el GP ($p = 0,036$).

- Linfocitos $CD4^+CD28^-CD57^+$: En el GP se produjo un aumento casi significativo entre el mes 12 y 13 ($p = 0,053$), significativamente superior al cambio en el GV ($p = 0,025$). Posteriormente no se produjeron cambios significativos ni intra ni intergrupos.

- Linfocitos $CD4^+CD38^+$: En ambos grupos se halló un aumento de esta subpoblación tras la interrupción del TARGA. Respecto al mes de inicio del estudio, el aumento fue significativo en ambos grupos ($p = 0,021$ y $0,041$ para GP y GV, respectivamente). Sin embargo, en el GP el aumento fue mayor ($p = 0,008$ para la diferencia 12-18), mientras que en el GV fue menor y no significativo ($p = 0,91$). Sin embargo, ni la diferencia entre estas diferencias ($p = 0,09$) ni entre las AUC de esta subpoblación ($p = 0,26$) alcanzaron la significación estadística.

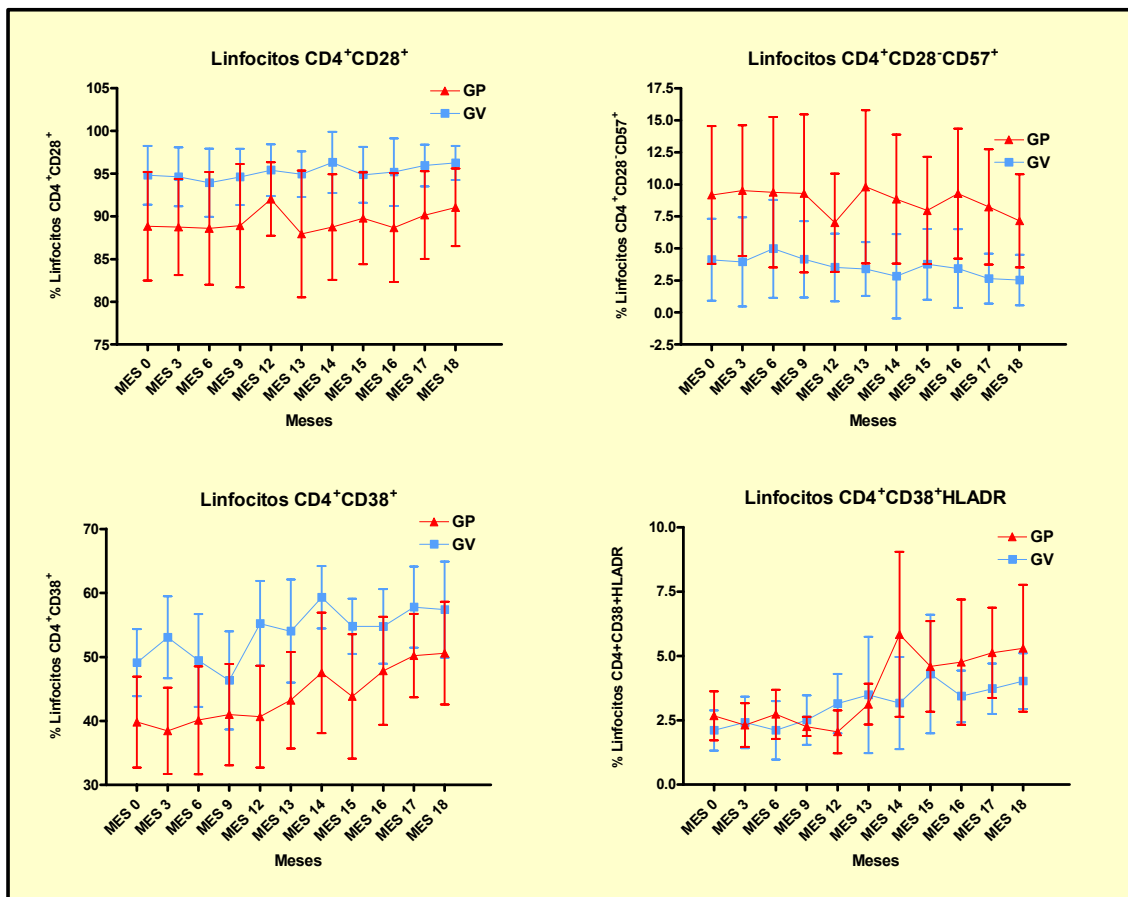


Figura R.1.48. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CD28^-CD57^+$, $CD4^+CD38^+$ y $CD4^+CD38^+HLADR^+$. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos CD4⁺CD38⁺HLADR⁺: Al igual que la subpoblación anterior, en ambos grupos se produjo un aumento de esta SUBpoblación tras suspender el TARGA. También respecto al mes de inicio del estudio el aumento fue significativo en ambos grupos ($p = 0,015$ y $0,004$ para GP y GV, respectivamente). Y también fue mayor en el GP ($p = 0,003$ para la diferencia 12-18), mientras que en el GV fue menor y no significativo ($p = 0,15$). En este caso, la diferencia entre estos gradientes sí fue significativa ($p = 0,035$), con una tendencia a que el AUC fuese menor en el GV ($p = 0,096$).

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺: En el GP se produjo un aumento significativo desde el momento de la suspensión del TARGA, sobre todo en los primeros 3 meses ($p = 0,027$ en la diferencia 12-18). En el GV, por otro lado, inicialmente se halló una caída significativa de esta población entre los meses 12 y 13 ($p = 0,048$), con un aumento posterior que no alcanzó la significación estadística ($p = 0,17$ para la diferencia 13-17). La comparación de estas tendencias entre los grupos mostró diferencias significativas tanto en el AUC ($p = 0,007$), la diferencia 12-18 ($p = 0,039$) y, sobre todo, la diferencia 12-13 ($p = 0,013$).

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: Esta SUBpoblación experimentó un discreto aumento tras la parada, sólo significativo en el GP en la segunda mitad de este periodo ($p = 0,006$ en la diferencia 15-18), pero sin otras diferencias ni intra ni intergrupos.

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺: No se observaron cambios significativos ni dentro de cada grupo ni entre ellos. Lo que sí se produjo fue, globalmente, entre el mes 0 y el mes 18, un aumento en esta subpoblación, significativo en el GP ($p = 0,005$) y con tendencia en el GV ($p = 0,065$).

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺: Se produjo un aumento significativo en los dos grupos ($p = 0,03$ para la diferencia 15-18 en GP y $p = 0,039$ para la diferencia 13-18 en GV), sin diferencias entre ellos.

- Linfocitos CD8⁺CD28⁺: Tras la suspensión del tratamiento se produjo en ambos grupos un descenso significativo de esta subpoblación, fundamentalmente en la primera mitad

del periodo ($p < 0,001$ y $p = 0,019$ para la diferencia 12-15 en el GP y GV, respectivamente).

Los cambios entre grupos no fueron significativos.

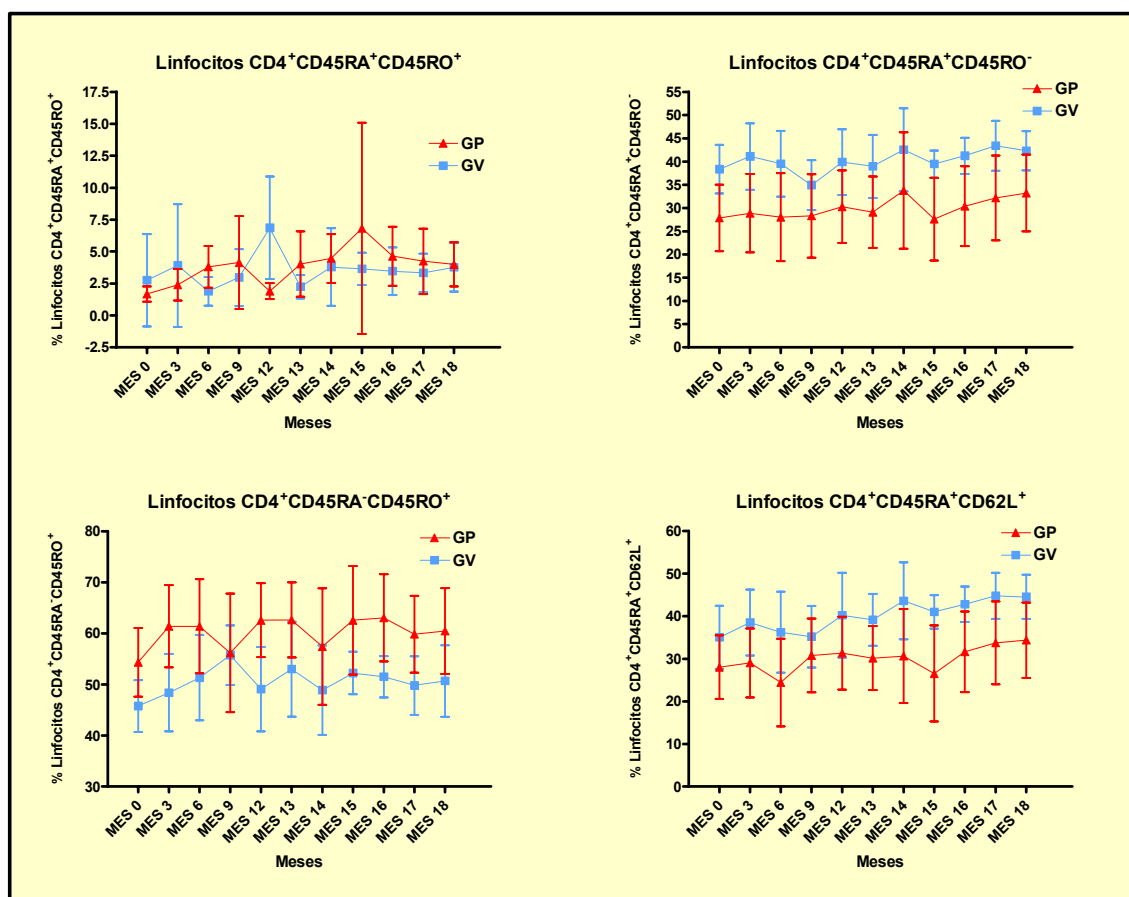


Figura R.1.49. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻, CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ y CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos CD8⁺CD28⁻CD57⁺: Globalmente, en ambos grupos se halló un descenso de esta población tras la suspensión del TARGA, con tendencia a la significación estadística ($p = 0,08$ y $0,095$ para la diferencia 12-18 en GP y GV, respectivamente), sobretudoo entre los meses 13 y 14. Sin embargo, esto se produjo de forma diferente en ambos grupos, pues mientras que en el GP hubo un aumento inicial entre los meses 12 y 13 ($p = 0,005$), en el GV no se produjeron cambios en ese periodo ($p = 0,001$ para la diferencia entre grupos en ese periodo).

Resultados

- Linfocitos $CD8^+CD38^+$: En ambos grupos se observó un aumento tras la interrupción, mayor en los primeros dos meses con una estabilización posterior. Dicho aumento fue significativo en todo el periodo, además de en el global del estudio ($p < 0,001$ y $0,002$ para la diferencia 0-18, $< 0,001$ y $0,01$ para la diferencia 12-15, y $< 0,001$ y $< 0,001$ para la diferencia 0-18 para GP y GV respectivamente). La tendencia en ambos grupos fue similar, aunque el aumento en el GV fue más precoz, de forma que el aumento entre el mes 9 y 13 tuvo tendencia a ser significativamente mayor en GV que en GP ($p = 0,09$) y fue mayor entre el 13 y el 14 en el GP ($p = 0,003$).

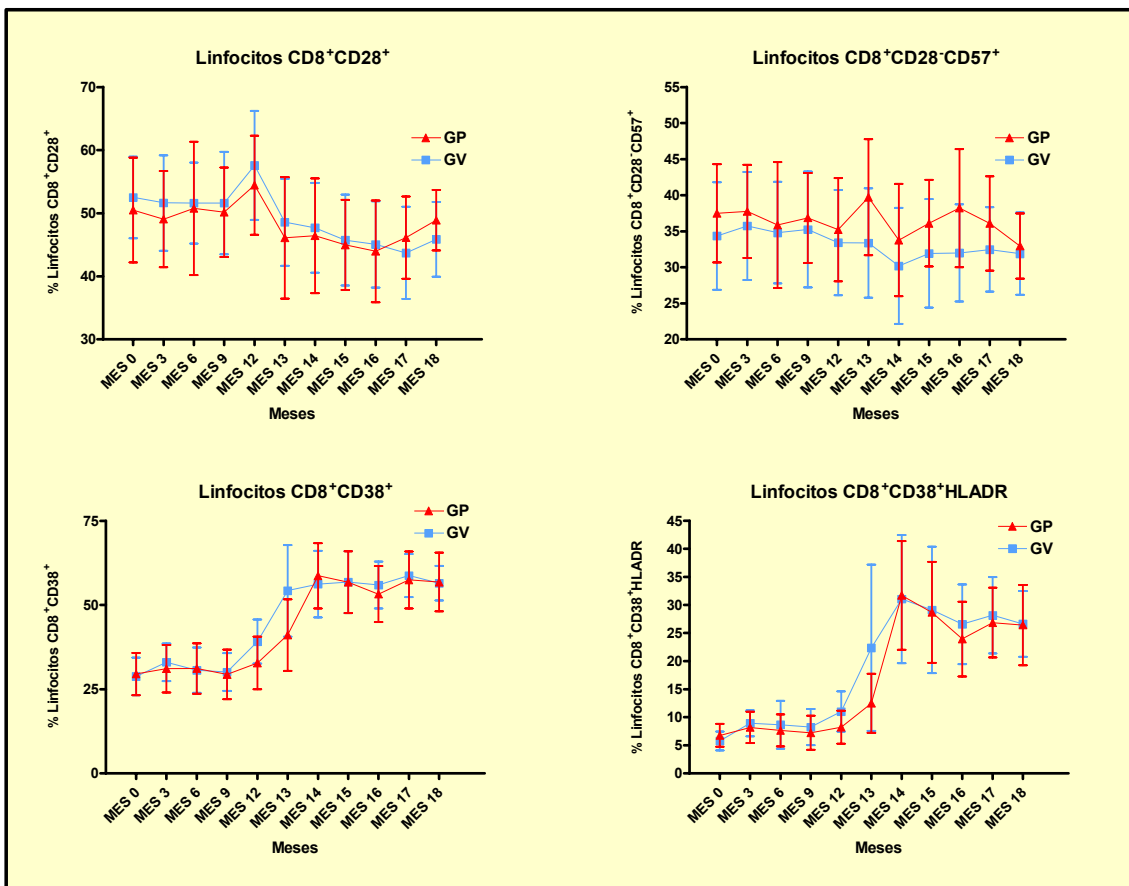


Figura R.1.50. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos $CD8^+CD28^+$, $CD8^+CD28^-CD57^+$, $CD8^+CD38^+$ y $CD8^+CD38^+HLADR^+$. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos $CD8^+CD38^+HLADR^+$: De forma paralela a la subpoblación $CD8^+CD38^+$, esta subpoblación aumentó durante el periodo sin tratamiento en ambos grupos,

sobre todo en los primeros dos meses y de forma más precoz en el GV. Se obtuvieron aumentos estadísticamente significativos entre los meses 12-15 ($p < 0,001$ para GP y $0,007$ para GV), 12-18 ($p < 0,001$ para ambos) y 0-18 ($p < 0,001$ en ambos grupos). También en este caso, el aumento fue más precoz en el GV y más tardío en el GP, de forma que el mayor aumento se produjo en este último entre los meses 13 y 14, con diferencias significativas con el mismo periodo en el GV ($p = 0,033$).

- Linfocitos $CD8^+CD45RA^+CD45RO^+$: Las evoluciones en esta población fueron muy diferentes en función del grupo. En el GP se produjo un aumento tras la interrupción hasta el mes 14 ($p = 0,048$), con un posterior descenso pero manteniendo un porcentaje mayor en el mes 18 que en el mes 12 ($p = 0,047$). Por otro lado, en el GV, en el que se había producido previamente un aumento entre los meses 9 y 12, se produjo un descenso entre los meses 12 y 18, ($p = 0,015$ entre el mes 13 y 16). Al comparar las diferencias entre grupos, se establecieron cambios significativos en las AUC tras la parada, mayor en el GP ($p = 0,015$) y en la tendencia a partir del mes 12 ($p = 0,004$ entre los meses 12 y 16 y $0,062$ entre 12 y 18). En los 18 meses del estudio se produjo un aumento global en esta población en ambos grupos ($p = 0,019$ y $0,012$ para GP y GV, respectivamente).

- Linfocitos $CD8^+CD45RA^+CD45RO^-$: Se observó tras el mes 12 un descenso en esta subpoblación, sobre todo en los 2-3 primeros meses, en ambos grupos, pero de forma más precoz y mayor en el GV. Así, el descenso fue significativo en ambos grupos entre los meses 12-15 ($p < 0,001$ y $0,001$ para GP y GV respectivamente), 12-18 ($p < 0,001$ para ambos grupos) y 0-18 ($p = 0,002$ en GP y $< 0,001$ en GV), pero con diferencias entre grupos en la caída entre los meses 13 y 14, mayor en el GP ($p = 0,039$).

- Linfocitos $CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$: La interrupción del tratamiento provocó un aumento en esta población significativo en ambos grupos, fundamentalmente a expensas de un mayor aumento en los primeros 3 meses ($p = 0,03$ y $< 0,001$ para la diferencia 12-15 en GP y GV, $p = 0,001$ y $< 0,001$ para la diferencia 12-18 en GP y GV y $p = 0,002$ y $< 0,001$ en GP y GV, respectivamente). Nuevamente el aumento fue mayor y más precoz en el GV, con

Resultados

diferencias significativas en los aumentos entre los meses 12 al 18 y en el área neta bajo la curva, mayores en el GV ($p < 0,05$ para las diferencias 12-18 y $0,006$ para el AUC).

- Linfocitos $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$: Se produjo una disminución de esta población a partir del mes 12, mayor en el GP pero más precoz en el GV ($p = 0,017$ y $0,001$ para las diferencias 12-18 y 12-15, respectivamente, en el GP; y $p = 0,26$ y $0,11$ para las diferencias 12-18 y 12-15 en el GV), existiendo diferencias entre grupos con un mayor descenso entre los meses 13 y 14 en el GP ($p = 0,064$).

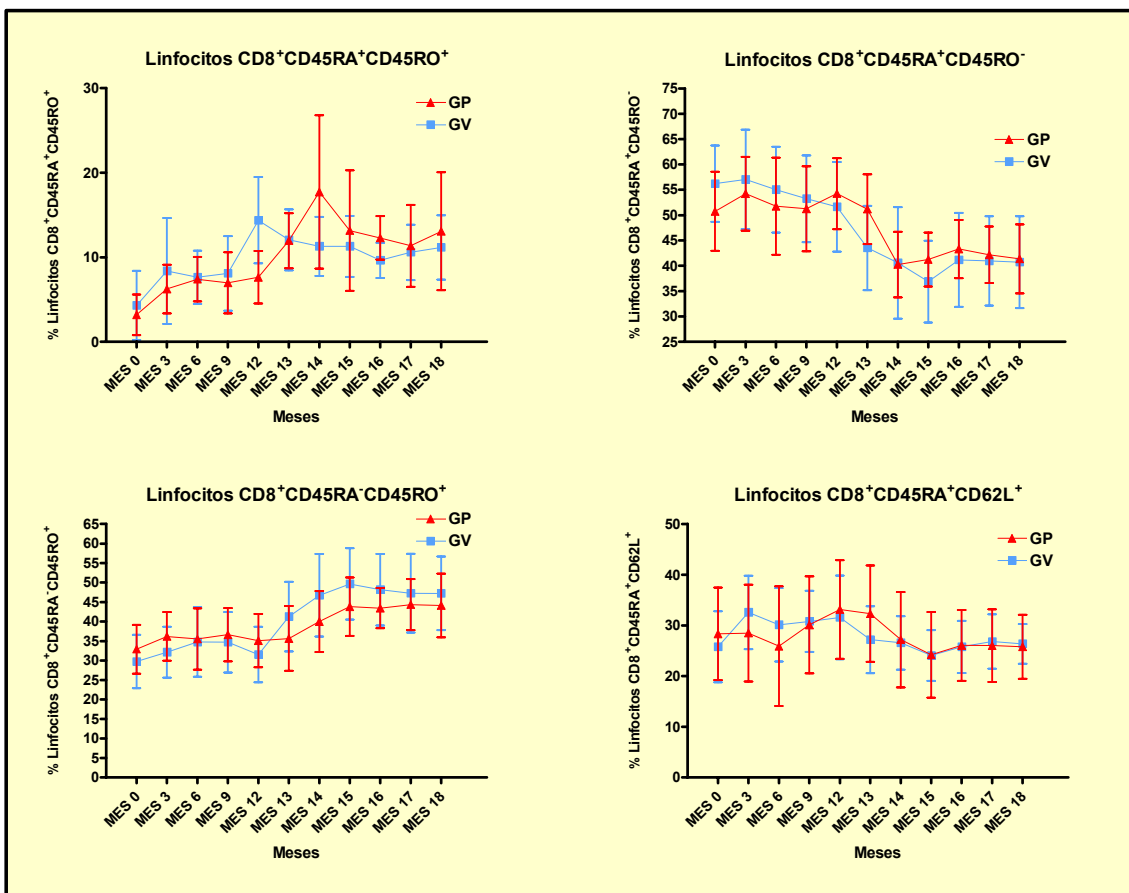


Figura R.1.51. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos $CD8^+CD45RA^+CD45RO^+$, $CD8^+CD45RA^+CD45RO^-$, $CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$ y $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos $CD4^+CXCR4^+$: Se produjeron en esta población cambios en el periodo de parada con importantes oscilaciones entre los meses, hallando en el GV un aumento entre el mes 15 y 16 significativo ($p = 0,004$), así como en el GP entre el 13 y 17 ($p = 0,047$), con diferencias entre grupos significativas en el cambio entre los meses 16 y 17, con un descenso en el GV y un aumento en el GP ($p = 0,012$).
- Linfocitos $CD4^+CCR5^+$: Se produjo en general un aumento significativo en esta subpoblación en ambos grupos ($p = 0,053$ y $0,012$ para la diferencia 13-18 en GP y GV, respectivamente), más precoz y mantenido en el GV.

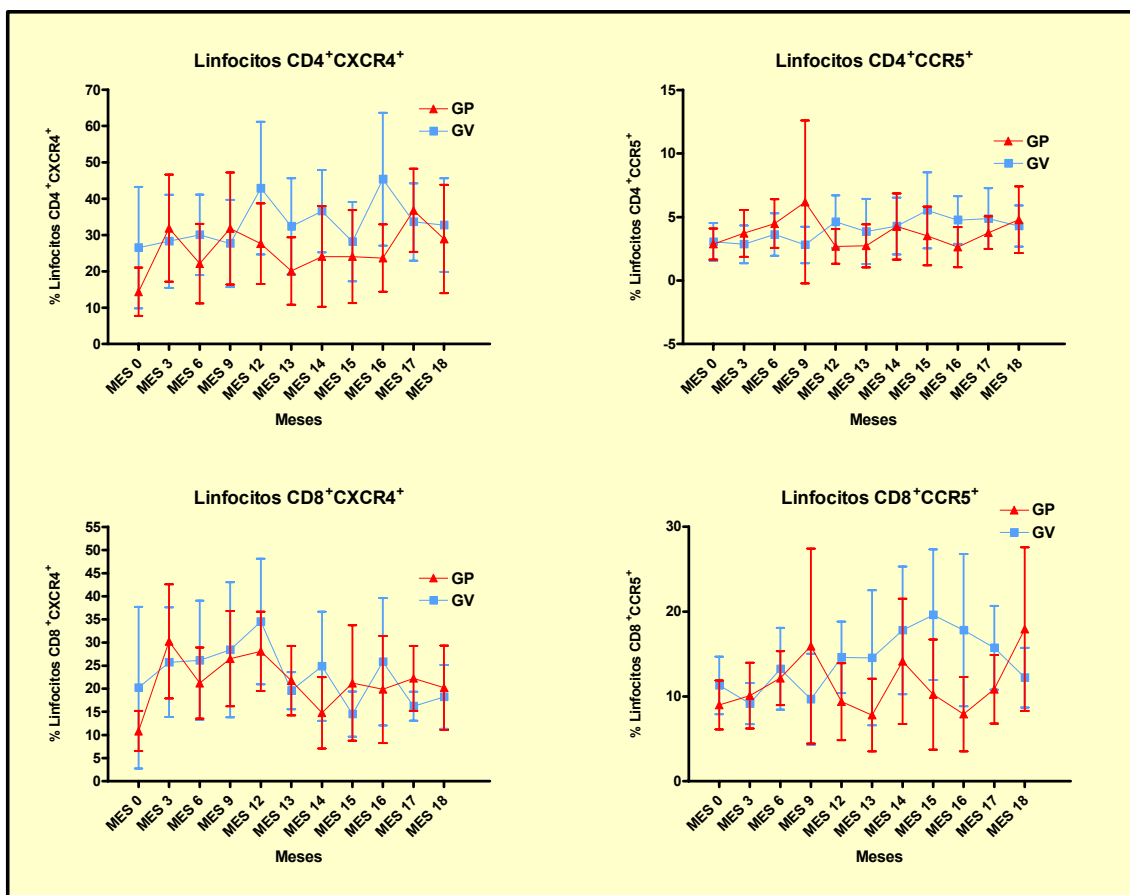


Figura R.1.52. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos $CD4^+CXCR4^+$, $CD4^+CCR5^+$, $CD8^+CXCR4^+$ y $CD8^+CCR5^+$. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos CD8⁺CXCR4⁺: Esta subpoblación disminuyó en el periodo sin TARGA en ambos grupos (p = 0,077 y 0,027 en GP y GV, respectivamente), sobre todo en los primeros meses (p = 0,017 entre mes 12 y 14 en GP), siendo el descenso más precoz en el GV.

- Linfocitos CD8⁺CCR5⁺: En esta subpoblación se produjeron cambios divergentes tras la interrupción del tratamiento en los diferentes grupos, de forma que en el GP existió una tendencia al aumento, mientras que en el GV aumentó los 3 primeros meses para posteriormente disminuir. Sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas en el ascenso entre el mes 13 y 18 en el GP (p = 0,026), existiendo diferencias significativas entre grupos en las tendencias entre los meses 15 y 18 (p = 0,032).

- Linfocitos CD4⁺CD25⁺: No se hallaron cambios significativos en esta subpoblación ni intra ni intergrupos.

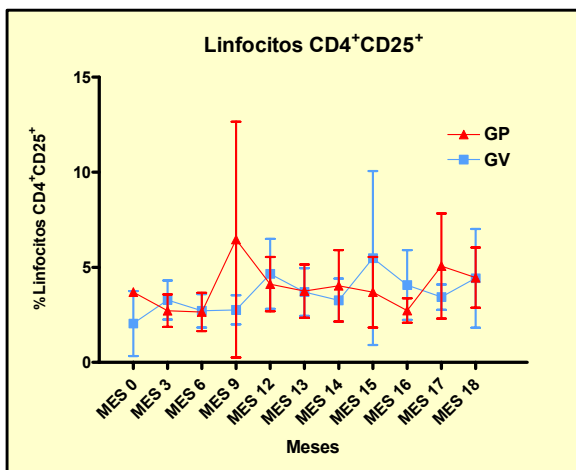


Figura R.1.53. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de la subpoblación celular de linfocitos CD4⁺CD25⁺. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

1.4.3.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación

Los cambios experimentados en la proliferación de las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo *naïve* se pueden observar en las **Tablas R.1.51.-R.1.52.** o en la **Figura R.1.54.**

- CD4⁺CD45RA⁺Ki-67⁺: Se observó una tendencia a un aumento inicial en la proliferación en esta subpoblación en el GV, con un posterior descenso, significativo entre los meses 15 y 16 (p = 0,032). La comparación entre grupos demostró una tendencia a la

significación en las diferentes tendencias entre los meses 12-14 ($p = 0,079$), pero no otras diferencias significativas.

- $CD8^+CD45RA^+Ki-67^+$: Se produjo inicialmente un ascenso de la proliferación en ambos grupos hasta el mes 14, tras el cual se observó un descenso significativo ($p = 0,027$ y $0,034$ para la diferencia 14-15 en GP y GV respectivamente). No se objetivaron diferencias significativas entre grupos.

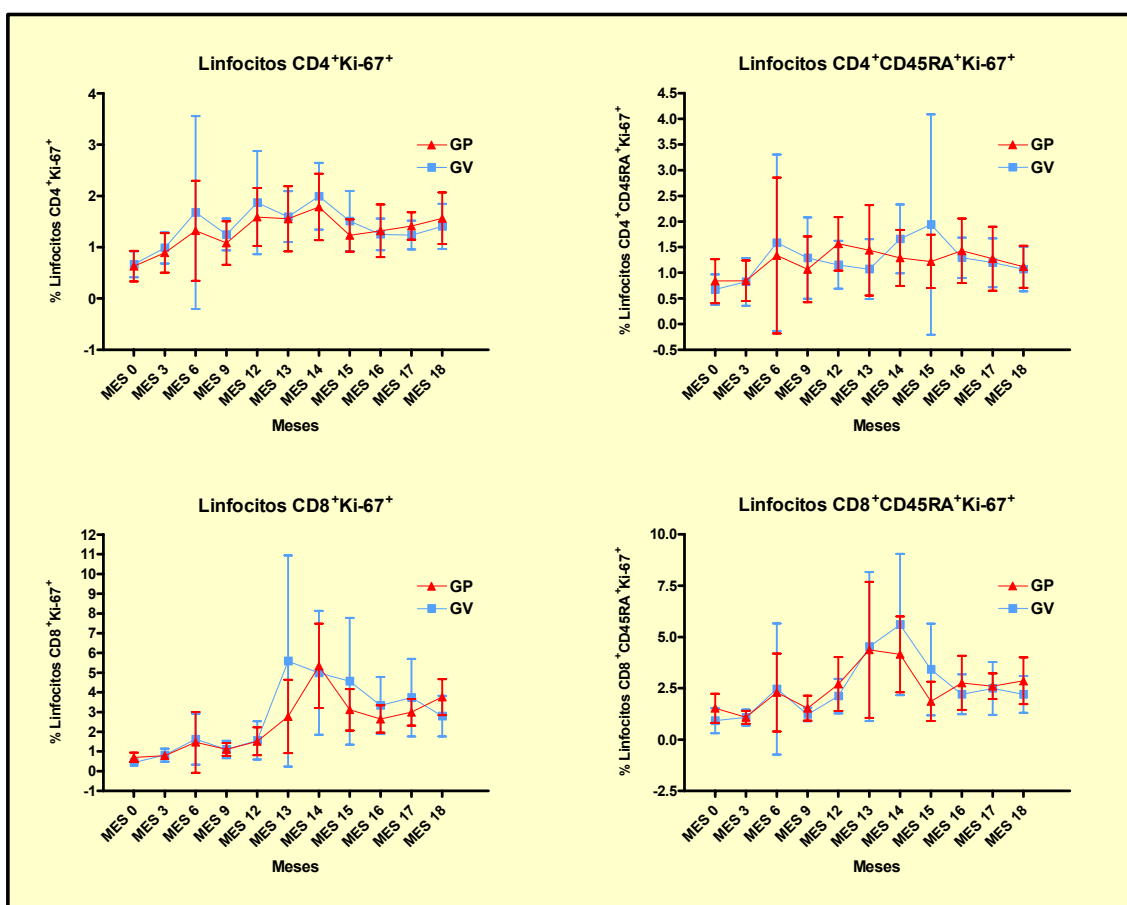


Figura R.1.54. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+CD45RA^+$ en proliferación (con el marcaje $Ki-67^+$). Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

1.4.3.3. Respuestas linfoproliferativas

Los cambios experimentados en las respuestas linfoproliferativas durante el periodo sin tratamiento se pueden observar en las Figuras R.1.55.-R.1.57. o en las Tablas R.1.53.-R.1.54.

Tabla R.1.53. Evolución de las respuestas linfoproliferativas durante el periodo de interrupción de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable (CMV: Citomegalovirus; P* de la diferencia 15-18 intragrupo; P de la diferencia 12-18 intragrupo; P*** de la diferencia 12-18 intergrupos)**

Índices de estimulación	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***
Fitoheماغlutinina 0,5%	35,23 ± 46,27	43,98 ± 44,88	0,65	39,01 ± 33,58	0,7	0,96	47,75 ± 50,15	36,51 ± 41,49	0,69	27,42 ± 30,34	0,43	0,32	0,39
Fitoheماغlutinina 1%	12,07 ± 18,45	27,89 ± 42,42	0,3	36,5 ± 30,35	0,59	0,033	41,12 ± 47,38	27,16 ± 31,91	0,48	18,15 ± 13,74	0,3	0,2	0,027
Anticuerpo anti-CD3	21,14 ± 24,82	24,43 ± 19,57	0,76	30,64 ± 31,2	0,39	0,53	24,72 ± 24,15	20,62 ± 16,39	0,78	24,31 ± 21,47	0,64	0,89	0,58
Anti-CD3 + anti-CD28	35,1 ± 42,66	34,38 ± 24,21	0,88	42,04 ± 27,21	0,33	0,9	41,36 ± 45,55	32,78 ± 31,59	0,76	41,27 ± 34,52	0,57	0,74	0,73
Mitógeno Pokeweed	14,3 ± 18,38	20,79 ± 17,54	0,26	15,48 ± 18,72	0,21	0,96	18,58 ± 8,96	24,88 ± 26,23	0,55	11,29 ± 9,33	0,046	0,32	0,55
Toxoides Tetánico	1,72 ± 1,24	1,62 ± 1,02	0,74	2,2 ± 3,67	0,66	0,72	2,16 ± 1,51	5,78 ± 12,49	0,3	1,77 ± 1,33	0,28	0,77	0,65
Antígenos de CMV	2,18 ± 2	3,85 ± 6	0,43	3,29 ± 3,17	0,77	0,44	1,98 ± 1,59	8,19 ± 9,21	0,079	2,55 ± 0,98	0,013	0,18	0,77
gp160 del VIH	1,59 ± 0,94	4,23 ± 7,65	0,06	1,82 ± 1,51	0,32	0,7	1,73 ± 1,39	1,89 ± 1,27	0,12	1,37 ± 1,02	0,22	0,66	0,56
p24 del VIH	2,19 ± 1,72	3,92 ± 5,13	0,23	1,93 ± 1,08	0,23	0,35	1,37 ± 0,41	4,54 ± 8,11	0,066	2 ± 1,33	0,28	0,051	0,077

Tabla R.1.54. Áreas netas bajo la curva de las respuestas linfoproliferativas durante el periodo de interrupción del tratamiento. Se exponen la media y la desviación típica de cada variable

AUC netas índices de estimulación	Grupo placebo	Grupo vacunado	P
Fitoheماغlutinina 0,5%	-2,77 ± 270,89	-38,09 ± 256,71	0,74
Fitoheماغlutinina 1%	55,86 ± 144,63	-53,92 ± 230,19	0,17
Anticuerpo anti-CD3	-4,89 ± 160,29	-7,6 ± 139,37	0,96
Anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28	-8,14 ± 281,53	-24,91 ± 251,95	0,88
Mitógeno Pokeweed	-1,75 ± 102,16	12,59 ± 97,48	0,72
Toxoides Tetánico	1,99 ± 14,79	6,95 ± 25,84	0,57
Antígenos de Citomegalovirus	3,11 ± 13,95	10,74 ± 10,30	0,13
gp160 del VIH	5,72 ± 16,76	1,1 ± 8,89	0,39
p24 del VIH	4,61 ± 15,77	7,92 ± 17,51	0,62

- Respuestas linfoproliferativas a mitógenos:
 - Fitohemaglutinina al 0,5%: En general se apreció una tendencia a la disminución de las respuestas linfoproliferativas en el GV (con un aumento transitorio no significativo entre los meses 16-17) y un aumento en el GP. Así, se produjo un aumento significativo en el GP entre los meses 13 y 18 ($p = 0,04$), y un descenso no significativo en el GV ($p = 0,43$). Estos cambios fueron significativamente diferentes cuando se compararon entre grupos ($p = 0,02$ para la diferencia 13-18), aunque las AUC no fueron estadísticamente diferentes.
 - Fitohemaglutinina al 1%: Se magnificaron las tendencias observadas con la PHA 0,5%, con un descenso en el GV a partir del mes 12 (con un aumento transitorio no significativo en los meses 16-17) y un aumento en el GP ($p = 0,033$ para la diferencia 12-18 en GP y $0,051$ para la 13-18 en GV). Estos cambios fueron significativamente diferentes cuando se compararon entre grupos ($p = 0,027$ para la diferencia 13-18), aunque las AUC tampoco fueron estadísticamente diferentes.
 - Anticuerpos anti-CD3: También se observó el aumento en el GP durante el periodo sin tratamiento ($p = 0,013$ para la diferencia 14-18), pero en este caso los cambios en el GV no fueron significativos y se vió una tendencia al mantenimiento en sus respuestas. Comparando entre grupos, existieron diferencias significativas entre estas tendencias ($p = 0,019$ para la diferencia 14-18 entre grupos).
 - Anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28: De forma similar a lo observado sólo con el anti-CD3, se produjo un aumento en el GP ($p = 0,028$ para la diferencia 13-18) y un mantenimiento en las respuestas en el GV, sin cambios significativos. En este caso, sin embargo, las diferencias entre grupos no fueron tan marcadas y sólo existió una tendencia a la significación estadística ($p = 0,089$ para la diferencia 13-18).
 - Mitógeno Pokeweed: Las tendencias que experimentaron los dos grupos fueron diferentes. En el GP aumentaron, con un descenso transitorio entre los meses 15-17, mientras que en el GV descendieron, con un aumento transitorio entre los mismos meses. El descenso entre el mes 15 y 17 en el GP fue significativo ($p = 0,036$), pero no el cambio entre el

mes 12 y 18 ($p = 0,96$), mientras que los cambios en el GV entre los meses 13-18 ($p = 0,037$) ó 15-18 ($p = 0,046$) fueron significativos. Al comparar entre grupos, se hallaron diferencias significativas en las tendencias antagónicas entre los meses 16-18 ($p = 0,033$).

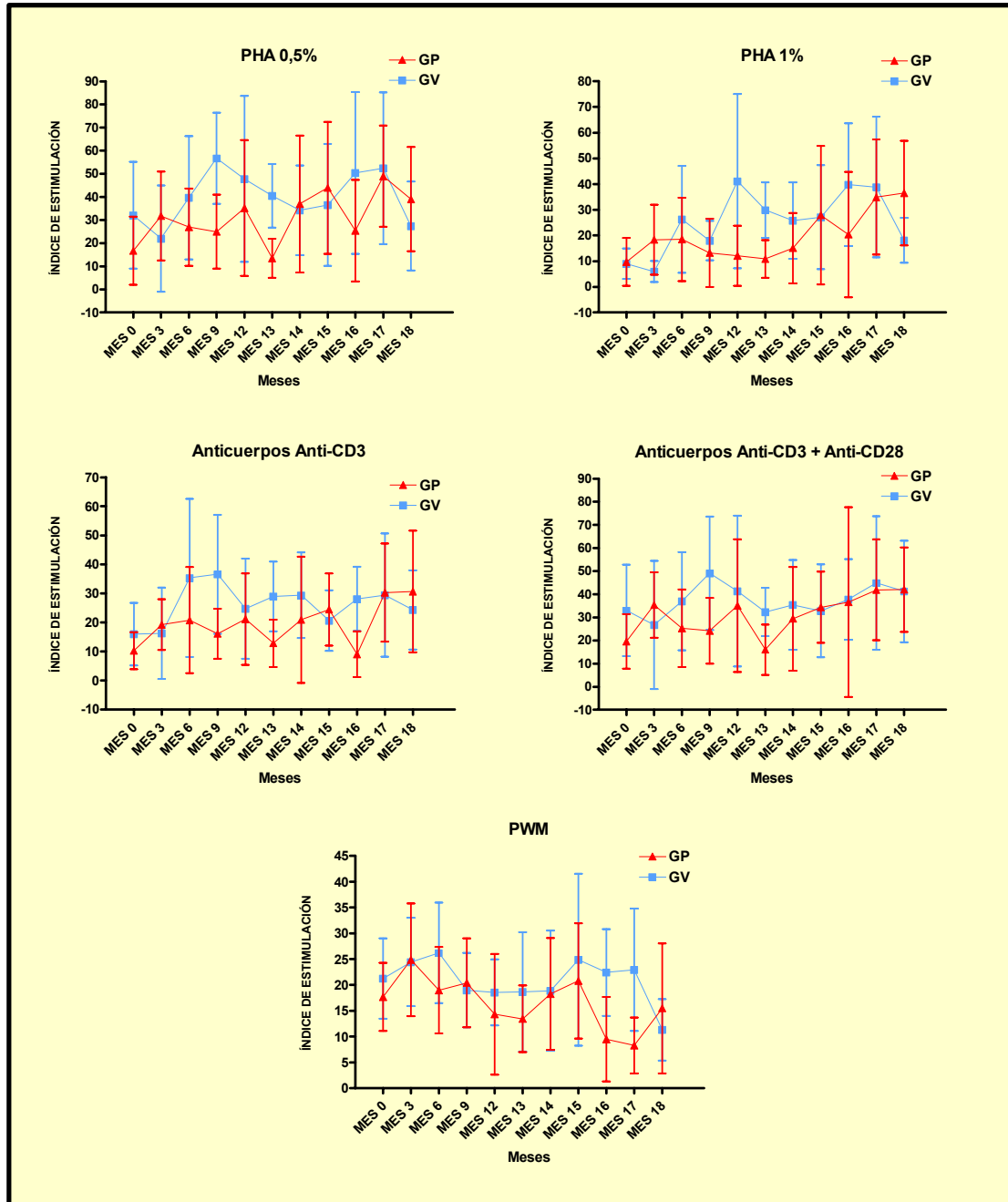


Figura R.155. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a mitógenos. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; PHA: Fitohemaglutinina; PWM: Mitógeno Pokeweed)

- Respuestas linfoproliferativas a antígenos comunes:

▪ Toxoide tetánico: En general las respuestas al toxoide tetánico tras la interrupción se mantuvieron estables en ambos grupos, con un ascenso transitorio en los meses 13 y 14 en el GP y 15-16 en el GV, siendo significativos los descensos posteriores ($p = 0,05$ para la diferencia 14-17 en GP y $0,035$ para la 16-18 en GV), aunque estas diferencias no fueron significativas entre grupos.

▪ Antígenos del CMV: Al igual que con el toxoide tetánico, en general no existieron cambios en estas respuestas entre el inicio y el final de la parada, pero sí hubo un aumento transitorio en el mes 15 en ambos grupos, de difícil valoración por existir un aumento importante en el rango de respuestas, pero que estableció diferencias casi significativas en el GV entre los meses 12-15 ($p = 0,079$) y 15-18 ($p = 0,05$). Sin embargo, no se establecieron diferencias en el comportamiento entre los grupos.

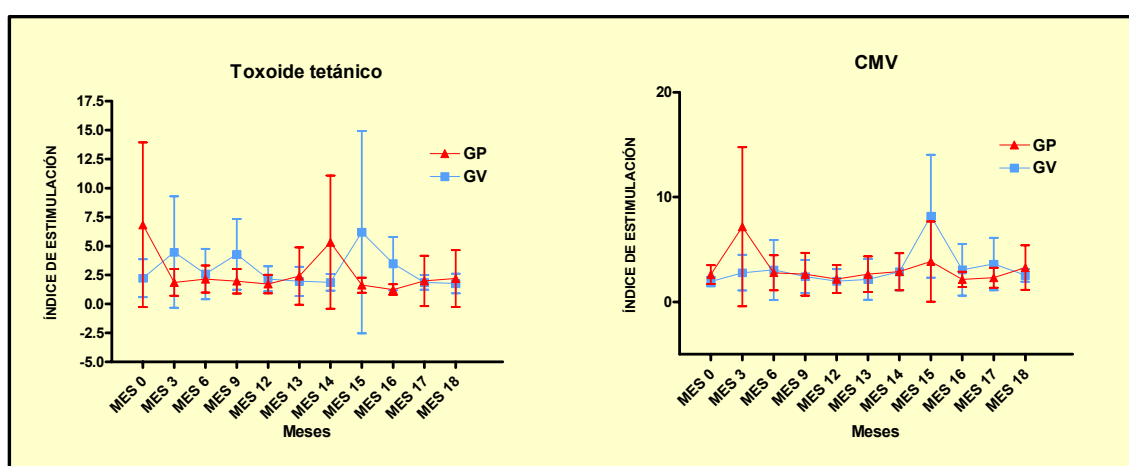


Figura R.1.56. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a antígenos comunes. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; CMV: Citomegalovirus)

- Respuestas linfoproliferativas a proteínas del VIH.

▪ gp160: Se produjo un aumento inicial en ambos grupos, con tendencia a la significación estadística entre los meses 12-15 en el GP ($p = 0,06$), y un descenso al final del periodo sin tratamiento. El aumento en el GP tuvo tendencia a ser mayor, de forma no significativa.

▪ p24: De forma similar que frente a la gp160, hubo un aumento inicial significativo en las respuestas proliferativas frente a p24, significativo en GV ($p = 0,025$ para la diferencia 12-16), con un descenso posterior, significativo en GP ($p = 0,019$ para la diferencia 14-17). Las diferencias entre los grupos se establecieron en el momento de la máxima respuesta, más precoz en el GP (mes 14) que en el GV (mes 15), existiendo por ello diferencias en los cambios entre los meses 14 y 16-17 ($p < 0,05$ para esas diferencias entre grupos).

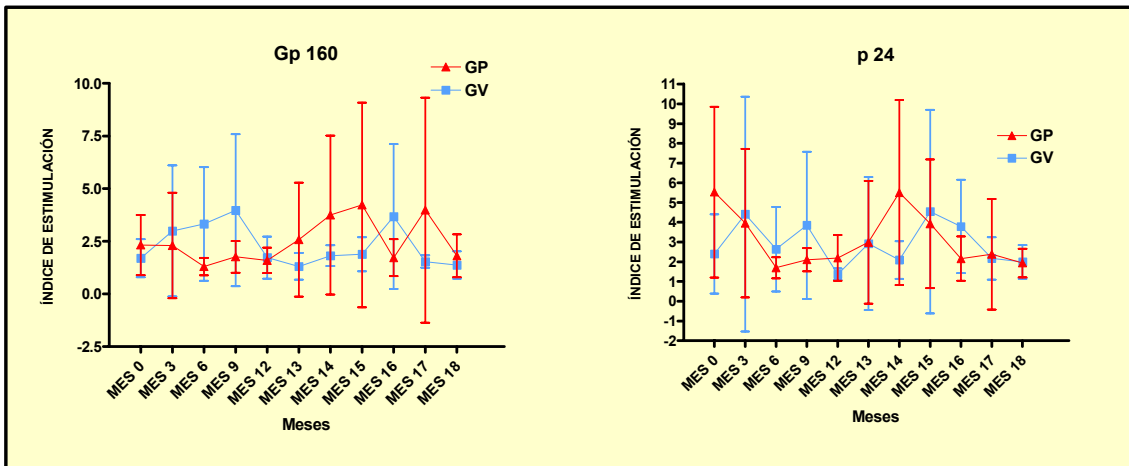


Figura R.1.57. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a proteínas del VIH. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

1.4.3.4. Respuestas $CD8^+$ específicas frente al VIH

Los cambios experimentados en las respuestas $CD8^+$ específicas anti-VIH en los GP y GV se pueden observar en la **Figura R.1.58.** o en la **Tabla R.1.55.**

- Respuestas $CD8^+$ específicas anti-VIH totales (magnitud de la respuesta): Se produjo una tendencia a aumentar estas respuestas tras la suspensión del TARGA, aunque sin llegar a la significación estadística, mayor en el GV (aunque tampoco se hallaron diferencias significativas entre grupos), llegando a ser significativo el aumento de las respuestas entre el mes 0 y el 18 ($p = 0,026$).

Tabla R.1.55. Evolución de las respuestas CD8⁺ específicas anti-VIH durante el periodo de interrupción de tratamiento por grupos. Se expresa la media y la desviación típica (resp/pep: cociente de la respuesta total CD8⁺ específica anti-VIH/numero de péptidos; small: pool de péptidos de gag; P* de la diferencia 15-18 intragrupo; P** de la diferencia 12-18 intragrupo; P*** de la diferencia 12-18 intergrupos)

Respuestas CD8 ⁺ anti-VIH	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***
Respuesta CD8 ⁺ total anti-VIH	988,2 ± 1182,29	1386,22 ± 2288,84	0,4	1129,44 ± 975,11	0,67	0,92	613,4 ± 462,73	1470,42 ± 1795,58	0,13	1635,18 ± 2083,81	0,9	0,099	0,17
Nº péptidos	4 ± 3,26	3,22 ± 3,23	1	4,44 ± 6,19	0,53	0,7	2,6 ± 1,43	5 ± 5,44	0,18	3,64 ± 2,38	0,33	0,041	0,69
Cociente resp/pep	289,4 ± 289,57	347,89 ± 259,98	0,66	425,55 ± 516,06	0,31	0,41	266,7 ± 253,11	305 ± 255,97	0,13	390,27 ± 372,78	0,91	0,45	0,95
p24	747,3 ± 1008,08	672,11 ± 692,23	0,88	883,44 ± 1496,78	0,53	0,5	403,8 ± 512,89	614,33 ± 740,31	0,29	1153,09 ± 1352,42	0,47	0,03	0,085
Small	207,1 ± 306,15	225,33 ± 303,45	0,51	296,55 ± 439,72	0,043	0,72	144 ± 211,87	376,5 ± 587,73	0,22	254,36 ± 422,41	0,38	0,63	0,55
p17	440,4 ± 732,02	476,44 ± 688,92	0,82	550 ± 943,1	0,61	0,62	160,1 ± 214,42	272,25 ± 484,27	0,34	620,73 ± 748,39	0,36	0,025	0,043
Gag total	1391,6 ± 1986,66	1374 ± 1219,51	0,82	1729,89 ± 2637,62	0,49	0,76	707,9 ± 840,87	1263 ± 1668,2	0,25	2027,91 ± 2192,76	0,65	0,038	0,063

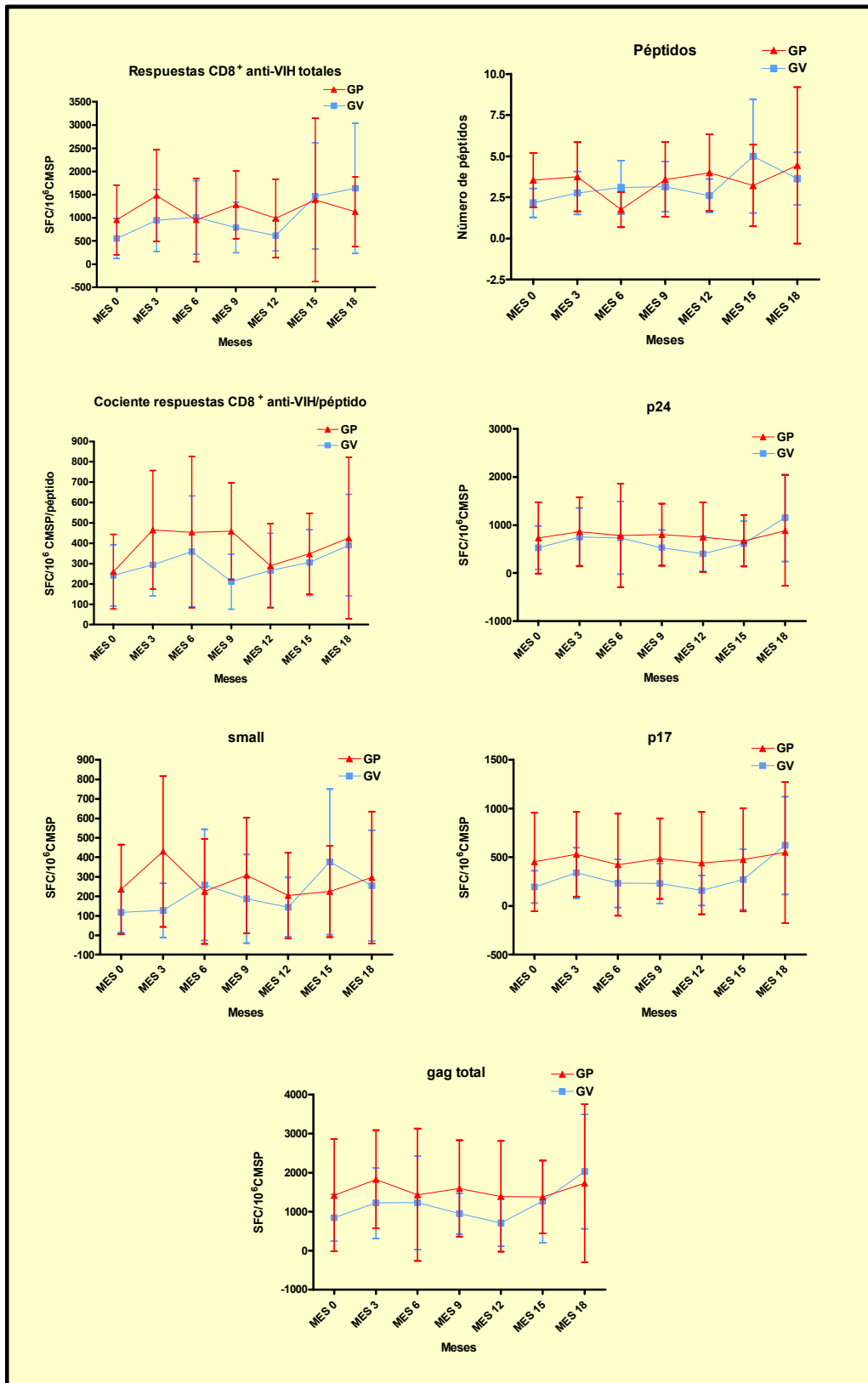


Figura R.1.58. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas específicas CD8⁺ frente a diferentes antígenos del VIH. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado; SFC: Células formadoras de Spots)

- Número de péptidos reconocidos (amplitud de la respuesta): También hubo una tendencia al aumento entre los meses 12-18, mayor y sólo significativo en el GV ($p = 0,041$). Sin embargo no se llegaron a establecer diferencias entre los grupos.
- Cociente respuestas $CD8^+$ específicas antiVIH/péptidos: Ambos grupos aumentaron este cociente, sin llegar a cambios significativos ni intra ni intergrupos.
- Respuestas específicas anti-p24: Se produjo un aumento significativo en el GV entre los meses 12-18 ($p = 0,03$), con tendencia a ser significativamente mayor que en el GP ($p = 0,085$ para la diferencia entre grupos).
- Respuestas específicas anti-small: Existió un aumento en ambos grupos, mayor en el GV (aunque no se establecieron diferencias significativas entre grupos).
- Respuestas específicas anti-p17: De forma similar a las respuestas anti-p24, se produjo un aumento significativo en el GV ($p = 0,025$) que no se detectó en el GP, alcanzando la significación estadística la diferencia entre grupos ($p = 0,043$).
- Respuestas específicas anti-gag: Como resultante de las tres anteriores respuestas, se produjo un aumento en el GV significativo entre los meses 12 y 18 ($p = 0,036$) y con tendencia a ser significativamente mayor que el del GP ($p = 0,063$).

No se halló correlación entre la magnitud de las respuestas $CD8^+$ específicas frente al VIH y la magnitud del rebote ($p > 0,2$ para todas las variables).

1.4.4. Cambios en la función tímica

Los cambios en los parámetros de función tímica tras la interrupción se reflejan en la **Tabla R.1.56.** y la **Figura R.1.59.**

1.4.4.1. Copias de TRECs

- *TRECs*/ μ L: En los primeros 3 meses (12-15) se produjo en los dos grupos un descenso significativo ($p = 0,008$ y $0,004$ para GP y GV, respectivamente), con un aumento

posterior también significativo en el GP ($p = 0,022$) pero no en el GV ($p = 0,57$). A pesar del aumento, se mantuvieron diferencias con tendencia a la significación estadística al final de los 6 meses con respecto al mes 12 ($p = 0,051$ y $0,074$ para GP y GV, respectivamente). El aumento en el GV entre los meses 15 y 18 tuvo tendencia a ser significativamente menor ($p = 0,081$).

TRECs por célula: Los cambios en el número de *TRECs*/ 10^6 células fueron similares a los de los *TRECs*/ μL con alguna particularidad. Se produjo un descenso significativo a partir de la suspensión del TARGA en los dos grupos, fundamentalmente en los tres primeros meses ($p = 0,037$ y $0,049$ para la diferencia 12-15 en GP y GV respectivamente), con un posterior ascenso en el GV (con tendencia a la significación estadística, $p = 0,089$) y continuando disminuyendo en el GP, manteniendo un descenso significativo en el mes 18 ($p = 0,034$ para la diferencia 12-18 en GP). Al comparar entre grupos, existió una tendencia a la significación estadística en la diferente evolución a partir del mes 15 ($p = 0,081$).

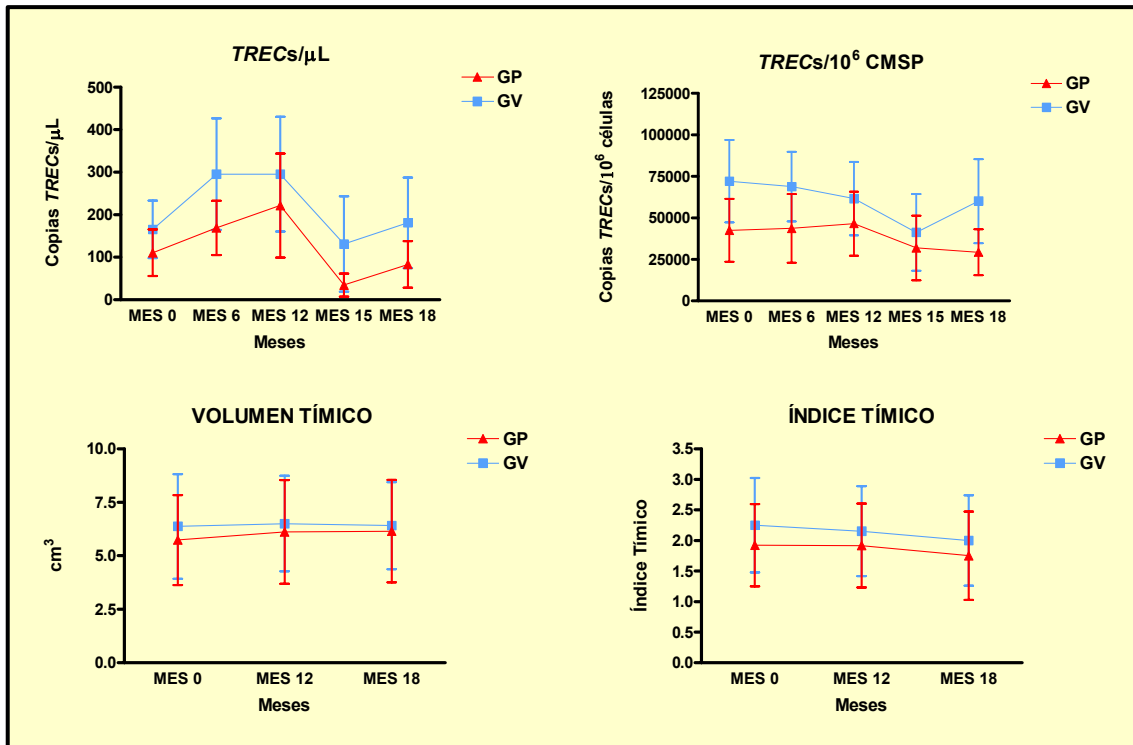


Figura R.1.59. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de los parámetros de función tímica. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (*TRECs*: Círculos de escisión del receptor celular T; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

Tabla R.1.56. Evolución de los parámetros de función tímica durante el período de interrupción de tratamiento por grupos. Se expresan la media y la desviación típica (TRECS: Círculos de escisión del receptor celular T; P* de la diferencia 15-18 intragrupo; P de la diferencia 12-18 intragrupo; P*** de la diferencia 12-18 intergrupos)**

Parámetros de función tímica	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***
Copias TRECS/μL	221,39 ± 202,4	34,24 ± 42,71	0,008	82,95 ± 86,17	0,022	0,051	295,13 ± 223,28	131,05 ± 185,19	0,004	180,93 ± 167,58	0,57	0,074	0,33
Copias TRECS/10 ⁶ células	46573,05 ± 31951,94	31875,4 ± 30646,61	0,037	29351,21 ± 21700,73	0,64	0,034	61607,58 ± 36782,87	41352,72 ± 38143,46	0,049	60111,58 ± 39780,8	0,089	0,57	0,33
Volumen tímico (cm ³)	6,12 ± 3,81	-	-	6,15 ± 3,78	-	0,8	6,51 ± 3,7	-	-	6,41 ± 3,37	-	0,61	0,58
Índice tímico	1,92 ± 1,08	-	-	1,75 ± 1,14	-	0,17	2,15 ± 1,21	-	-	2 ± 1,22	-	0,34	1
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	30,27 ± 12,31	27,61 ± 14,05	0,41	33,21 ± 13,01	0,006	0,23	39,89 ± 11,68	39,45 ± 4,6	0,91	42,31 ± 6,64	0,32	0,73	0,56
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	31,35 ± 13,47	26,57 ± 17,76	0,29	34,39 ± 13,95	0,03	0,12	40,25 ± 16,46	41,05 ± 6,17	0,85	44,56 ± 8,18	0,15	0,48	0,97
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	54,26 ± 11,03	41,24 ± 8,4	<0,001	41,37 ± 10,76	0,94	<0,001	51,65 ± 14,65	36,9 ± 12,69	0,001	40,7 ± 14,3	0,89	<0,001	0,49
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	33,16 ± 15,29	24,21 ± 13,32	0,001	25,8 ± 9,92	0,63	0,017	31,59 ± 13,68	24,08 ± 7,87	0,11	26,38 ± 6,15	0,41	0,26	0,65
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	1,56 ± 0,82	1,22 ± 0,82	0,41	1,12 ± 0,65	0,75	0,095	1,15 ± 0,77	1,94 ± 3,38	0,46	1,07 ± 0,68	0,68	0,79	0,26
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	2,70 ± 2,05	1,87 ± 1,5	0,39	2,87 ± 1,8	0,22	0,8	2,12 ± 1,39	3,42 ± 3,51	0,27	2,2 ± 1,41	0,64	0,79	0,99

1.4.4.2. Tejido tímico

Ambos grupos mostraron una tendencia a la disminución de los parámetros de medida de tejido tímico, aunque no se objetivaron cambios significativos ni intra ni intergrupos en el índice o el volumen tímico.

1.4.4.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo naïve

Ya se comentó su evolución durante tras la suspensión del TARGA en los apartados

1.4.3.1 y 1.4.3.2.

1.4.5. Cambios en el sistema IL-7/IL-7R

Los cambios en los parámetros del sistema IL-7/IL-7R se pueden observar en la **Tabla R.1.57.** y en la **Figura R.1.60.**

1.4.5.1. Niveles séricos de IL-7

A partir del mes 12 se produjo un ascenso significativo en ambos grupos de los niveles de IL-7. Dicho ascenso, sin embargo, fue diferente según el grupo. Así, en el GV hubo un aumento inicial de los niveles de IL-7 hasta el mes 15, significativo ($p = 0,013$), pero después descendieron (aunque no de forma significativa) hasta el mes 18. El GP, por otro lado, presentó un aumento más lento e incluso nulo hasta el mes 15, no significativo, y entre el mes 15 y el 18 se observó un aumento significativo ($p = 0,032$). Estos patrones sin embargo no presentaron diferencias significativas entre grupos.

1.4.5.2. Expresión de IL-7R

- Linfocitos $CD4^+CD45RA^+CD127^+$: Tras la interrupción se produjo un descenso en la expresión de CD127 en esta subpoblación, mayor en el GV, aunque no se detectaron diferencias significativas ni intra ni intergrupos.

Tabla R.1.57. Evolución del sistema IL-7/IL-7R durante el periodo de interrupción de tratamiento por grupos. Se expresan la media y la desviación típica (P* de la diferencia 15-18 intragrupo; P** de la diferencia 12-18 intragrupo; P*** de la diferencia 12-18 intergrupos)

Sistema IL-7 / Receptor de IL-7	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***
Concentración IL-7 (pg/mL)	12,13 ± 3,92	12,92 ± 3,78	0,49	14,84 ± 4,21	0,032	0,013	11,07 ± 3,75	13,04 ± 4,83	0,013	12,79 ± 6	0,71	0,065	0,62
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	19,59 ± 13,56	22,22 ± 13,77	0,2	22,61 ± 14,69	0,85	0,18	31,98 ± 19,11	30,16 ± 14,10	0,3	31,23 ± 15,16	0,98	0,88	0,39
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	28 ± 14,02	32,12 ± 16,15	0,022	31,14 ± 17,58	0,73	0,22	33,33 ± 18,24	31,64 ± 17,52	0,75	28,37 ± 14,5	0,4	0,35	0,17
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	11,97 ± 9,46	8,77 ± 4,69	0,16	11,96 ± 11,89	0,29	0,99	17,85 ± 13,49	8,9 ± 7,69	0,033	10,53 ± 9,21	0,75	0,05	0,27
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	9,21 ± 7,2	7,37 ± 5,4	0,15	8,14 ± 4,62	0,49	0,5	12,21 ± 9,7	5,97 ± 6,15	0,021	7,76 ± 6,58	0,015	0,14	0,37

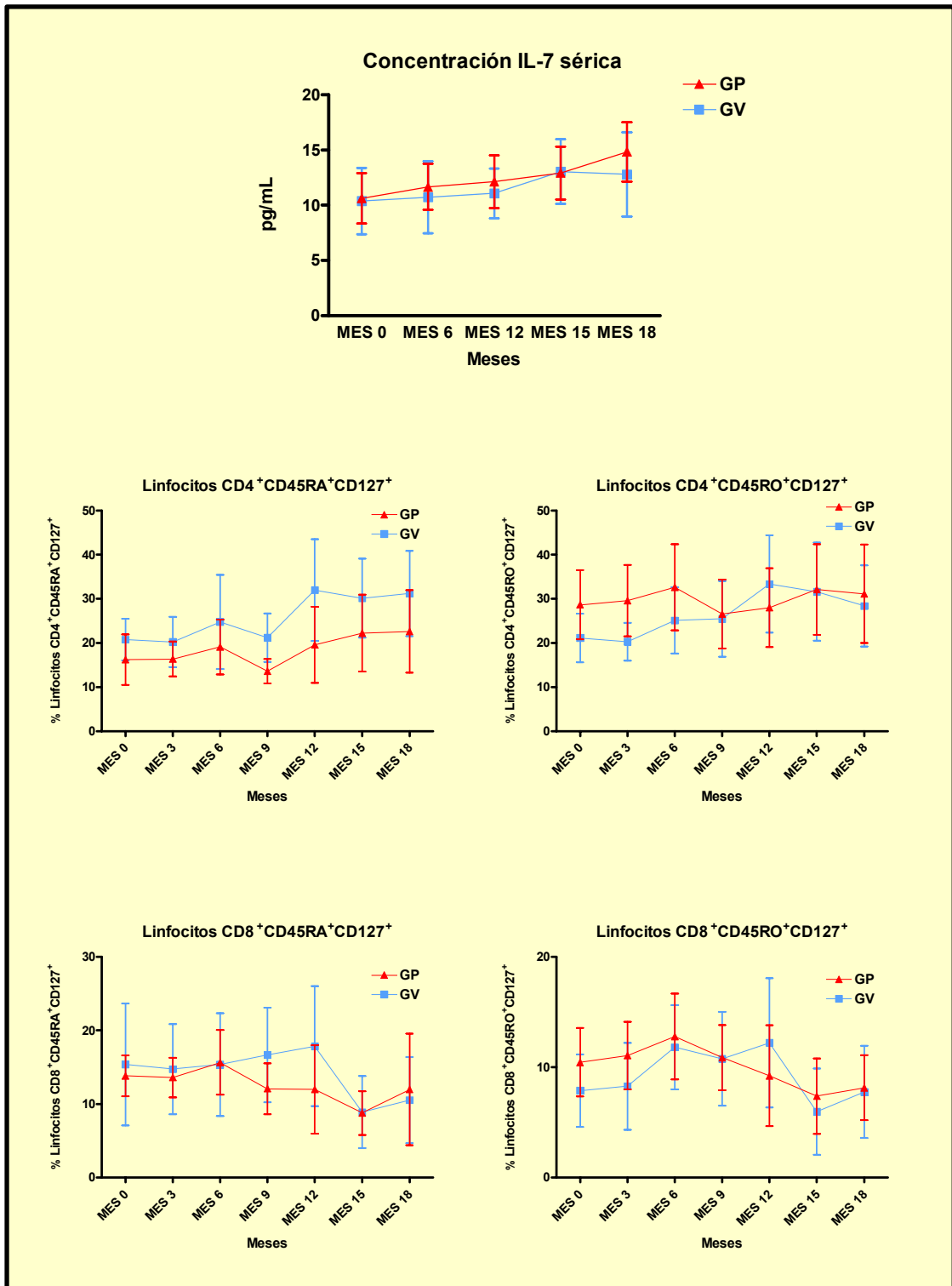


Figura R.1.60. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las concentraciones séricas de IL-7 y la expresión del IL-7R. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (GP: Grupo Placebo; GV: Grupo Vacunado)

- Linfocitos CD4⁺CD45RO⁺CD127⁺: Como en la anterior, la expresión de CD127 en esta subpoblación presentó un descenso en el GV no significativo, mientras que en GP incluso aumentó significativamente hasta el mes 15 ($p = 0,022$), aunque la comparación entre grupos no alcanzó diferencias estadísticas.

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺: Con la suspensión del tratamiento, la expresión del CD127 en esta subpoblación disminuyó en los dos grupos hasta el mes 15 y luego se estabilizó, siendo el descenso en el GV mayor y significativo ($p = 0,033$ para la diferencia 12-15), y no así en el GP. Sin embargo no se alcanzaron diferencias significativas en la comparación entre grupos.

- Linfocitos CD8⁺CD45RO⁺CD127⁺: Esta subpoblación siguió el mismo patrón que la anterior, con un descenso marcado hasta el mes 15 y una estabilización posterior. Igualmente, el descenso fue más marcado y significativo en el GV ($p = 0,021$), siendo también significativo el ascenso posterior entre el mes 15 y 18 ($p = 0,015$). La comparación de los cambios entre grupos no alcanzaron la significación estadística.

1.4.6. Cambio en las respuestas a los antígenos vacunales

1.4.6.1. Respuesta a VHA

- Respuesta humoral

Tras la suspensión del tratamiento no se detectaron cambios significativos en los títulos de anticuerpos frente a VHA, y ningún paciente con serología positiva negativizó tras los 6 meses sin TARGA dentro de cada grupo (**Figura R.1.26.**), sin establecerse diferencias en la evolución entre los grupos (**Tabla R.1.58.**).

Tabla R.1.58. Respuesta inmune humoral y celular frente a virus hepatitis A, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de spots/ 10⁶ células mononucleares de sangre periférica; P * de la diferencia 15-18 de cada grupo. P** de la comparación entre los dos grupos de la diferencia 12-18 de cada grupo. P*** de la comparación entre los dos grupos de la diferencia 12 y 18)

Respuesta a virus hepatitis A	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***
Humoral cuantitativa (mIU/mL)	100 (21,02-100)	-	-	100 (17,35-100)	-	1	100 (100-100)	-	-	100 (100-100)	-	0,32	0,77
Humoral cualitativa	10 (76,9)	-	-	9 (69,2)	-	1	13 (100)	-	-	13 (100)	-	1	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	801 (72-1855,25)	249 (73-1823)	0,95	290 (108,75-607,25)	0,24	0,069	315 (11,25-856,25)	240,5 (40,5-1270,25)	0,86	433 (13-917)	0,5	0,33	0,1
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	1122 (409,25-1917,75)	638 (211-2541)	0,86	1942 (1297,5-2695,5)	0,44	0,043	1365 (134-1797)	2428 (407-3397)	1	1500 (310-2393,5)	0,61	0,25	0,84
Celular (ELISPOT) cualitativa	8 (61,5)	9 (69,2)	-	8 (61,5)	-	1	7 (53,8)	8 (61,5)	-	8 (61,5)	-	1	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	8 (61,5)	10 (76,9)	-	9 (69,2)	-	0,5	8 (61,5)	9 (69,2)	-	8 (61,5)	-	1	-

- Respuesta celular

Tras la interrupción del TARGA se observó en el GP, entre los meses 12 y 18, una disminución de la respuesta celular al VHA medida por ELISPOT con tendencia a la significación estadística ($p = 0,069$), mientras que por AMPLISPOT el sentido del cambio fue inverso, con un aumento de la respuesta significativo ($p = 0,043$). En el GV no se observaron cambios significativos. Las diferencias entre grupos en el periodo sin TARGA no fueron significativas (**Figura R.1.27.** y **Tabla R.1.58.**).

1.4.6.2. Respuesta a VHB

- Respuesta humoral

Con la parada del tratamiento se observaron dos tendencias diferentes en función del grupo. Mientras que en el GP se produjo un aumento no significativo en el título de anticuerpos ($p = 0,46$), en el GV se produjo un descenso, que tampoco alcanzó la significación estadística ($p = 0,37$). Las diferencias entre las razones de aumento y disminución entre grupos no fueron significativas ($p = 0,65$) (**Figura R.1.28.** y **Tabla R.1.59.**).

Cualitativamente tampoco se produjeron diferencias tras la suspensión, aunque un paciente por grupo positivizó.

- Respuesta celular

Los cambios que se detectaron en la respuesta celular consistieron, básicamente, en un descenso entre los meses 15 y 18 en el GP en la respuesta medida por AMPLISPOT ($p = 0,043$), en un descenso tanto por ELISPOT como por AMPLISPOT en el GV entre los meses 12 y 15, significativo para ELISPOT ($p = 0,028$), y un ascenso significativo entre los meses 15 y 18 en el GV por ELISPOT y AMPLISPOT ($p = 0,028$ y $0,08$, respectivamente). Las diferencias que se observaron entre grupos no fueron significativas (**Figura R.1.29.** y **Tabla R.1.59.**).

A nivel cualitativo, los cambios que se observaron por ELISPOT y AMPLISPOT no fueron significativos y no se detectaron diferencias entre grupos.

Tabla R.1.59. Respuesta inmune humoral y celular frente a virus hepatitis B, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuantílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de spots/ 10⁶ células mononucleares de sangre periférica; P * de la diferencia 15-18 de cada grupo. P ** de la diferencia 12-18 de cada grupo. P *** de la comparación entre los dos grupos de respuesta entre los meses 12 y 18)

	Grupo Placebo						Grupo Vacunado							
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***	
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	2,14 (1-696,55)	-	-	15,28 (1-708,7)	-	0,46	321 (29,69-1000)	-	-	-	87,57 (30,89-1000)	-	0,37	0,65
Humoral cualitativa	5 (38,5)	-	-	6 (46,2)	-	1	11 (84,6)	-	-	-	12 (92,3)	-	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	11,5 (0-77,25)	0 (0-10)	0,12	0 (0-8,5)	0,69	0,12	9,5 (0-21,25)	0 (0-0)	0,028	8 (0-97)	0,028	0,31	0,1	0,1
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-66)	0 (0-53)	0,71	0 (0-8)	0,043	0,11	0 (0-128,5)	0 (0-15,5)	1	22 (0-68)	0,08	0,69	0,18	0,18
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (15,4)	1 (7,7)	1	0 (0)	1	0,5	1 (7,7)	0 (0)	1	3 (23,1)	0,25	0,62	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	2 (15,4)	3 (23,1)	1	0 (0)	0,25	1	3 (23,1)	1 (7,7)	1	2 (15,4)	1	1	1	-

Tabla R.1.60. Respuesta inmune celular frente a gripe, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuantílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de spots/ 10⁶ células mononucleares de sangre periférica; P * de la diferencia 15-18 de cada grupo. P ** de la diferencia 12-18 de cada grupo. P *** de la comparación entre los dos grupos de respuesta entre los meses 12-18)

	Grupo Placebo						Grupo Vacunado							
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***	
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	214 (126,25-466,25)	103 (65-260)	0,95	98 (41-173)	0,57	0,012	60 (0-299,25)	53 (0-148,25)	0,31	90 (0-290)	0,6	0,6	0,005	0,005
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	413 (0-1096,75)	422 (91-618)	0,37	390 (235,5-891,5)	0,44	0,73	227 (71-694)	398 (67,5-855)	0,73	618 (257-901)	0,87	0,25	0,94	0,94
Celular (ELISPOT) cualitativa	9 (69,2)	10 (76,9)	1	8 (61,5)	1	0,5	5 (38,5)	6 (46,2)	1	7 (53,8)	1	0,5	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	7 (53,8)	9 (69,2)	0,62	9 (69,2)	0,5	0,25	8 (61,5)	9 (69,2)	1	9 (69,2)	1	1	1	-

1.4.6.3. Respuesta a gripe

En la respuesta celular frente a la gripe medida por ELISPOT, mientras que en el GP se observó un descenso significativo entre los meses 12 y 18 ($p = 0,012$), en el GV hubo un aumento no significativo. La diferencia del cambio (medido por la razón de la respuesta entre los meses 12 y 18) entre grupos resultó estadísticamente significativa ($p = 0,005$) (**Figura R.1.30.**). Por AMPLISPOT y a nivel cualitativo los cambios no fueron significativos (**Tabla R.1.60.**).

1.4.6.4. Respuesta a varicela

- Respuesta humoral

Valorada únicamente de forma cualitativa, durante el periodo de parada se produjo la negativización del título de anticuerpos en un paciente en el GV. No se detectaron cambios entre los grupos (**Figura R.1.31.** y **Tabla R.1.61.**).

- Respuesta celular

Aunque se apreció una tendencia al aumento de las respuestas celulares tras la interrupción, no se detectaron cambios significativos en la respuesta celular a varicela tras la suspensión del tratamiento, ni en la valoración cuantitativa por cualquiera de las dos técnicas utilizadas ni en la valoración cualitativa (**Figura R.1.32.** y **Tabla R.1.61.**).

1.4.6.5. Respuesta a parotiditis

- Respuesta humoral

En la valoración cualitativa de la respuesta humoral a la parotiditis se halló que dos pacientes del GP y un paciente del GV negativizaron su serología en el periodo de 6 meses de parada (**Figura R.1.33.** y **Tabla R.1.62.**), sin diferencias entre grupos.

Tabla R.1.61. Respuesta inmune humoral y celular a varicela, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de spots/ 10⁶ células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 15-18 de cada grupo. P** de la diferencia 12-18 de cada grupo. P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a varicela	Grupo Placebo						Grupo Vacunado					
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P***
Humoral cualitativa	12 (92,3)	-	-	11 (84,6)	-	1	13 (100)	-	-	12 (92,3)	-	1
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	52 (14,25-126,5)	43 (17-55)	0,26	47 (34,5-124)	0,96	0,26	31 (0-45,75)	8 (0-58,75)	0,48	29 (0-94)	0,92	0,4
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	128,5 (9,75-313,5)	154 (19-258)	0,51	223 (44-391,5)	0,4	0,61	133 (1,5-326)	210 (79-335)	1	295 (8-425,5)	0,87	0,34
Celular (ELISPOT) cualitativa	5 (38,5)	7 (53,8)	0,25	6 (46,2)	1	1	3 (23,1)	3 (23,1)	1	5 (38,5)	1	0,25
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	7 (53,8)	6 (46,2)	1	7 (53,8)	0,62	0,5	6 (46,2)	8 (61,5)	1	6 (46,2)	0,5	1

Tabla R.1.62. Respuesta inmune humoral y celular a parotiditis, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de spots/ 10⁶ células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 15-18 de cada grupo. P** de la diferencia 12-18 de cada grupo. P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a parotiditis	Grupo Placebo						Grupo Vacunado					
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P***
Humoral cualitativa	11 (84,6)	-	-	10 (76,9)	-	1	13 (100)	-	-	12 (92,3)	-	1
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	50,5 (7,5-223,5)	28 (14-110)	0,16	53 (29,5-149,75)	0,92	0,94	0 (0-71)	13,5 (0-55,25)	0,92	40 (0-94)	0,6	0,22
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	86,5 (0-398,75)	115 (0-357)	0,33	200 (39,5-508,5)	0,48	0,043	125 (21-284)	229 (34-483)	0,87	263 (85-493,5)	1	0,046
Celular (ELISPOT) cualitativa	5 (38,5)	4 (30,8)	1	7 (53,8)	0,25	0,5	3 (23,1)	3 (23,1)	1	4 (30,8)	1	0,5
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	6 (46,2)	8 (61,5)	0,62	7 (53,8)	1	0,5	6 (46,2)	7 (53,8)	1	7 (53,8)	1	0,5

- Respuesta celular

La respuesta celular al virus de parotiditis presentó un incremento en ambos grupos en el periodo de parada tanto por ELISPOT como por AMPLISPOT, siendo significativo únicamente en las mediciones por esta última técnica ($p = 0,043$ y $0,046$ para GP y GV, respectivamente). No hubo diferencias entre grupos (**Figura R.1.34.** y **Tabla R.1.62.**).

La valoración cualitativa no mostró cambios significativos.

1.4.6.6. Respuesta a rubéola

Se produjo una disminución significativa del título de anticuerpos en el periodo sin TARGA en ambos grupos ($p = 0,028$ y $0,001$ para GP y GV, respectivamente), sin diferencias entre ellos. La mediana de la razón de caída fue de 1,54 veces (mediana de la razón entre valores en los meses 18 y 12 de 0,65, rango intercuartílico 0,29-0,77) para el GP y 1,96 veces (mediana de la razón entre valores en los meses 18 y 12 de 0,51, rango intercuartílico de 0,37-0,73) para el GV. Este descenso condicionó un título de anticuerpos menor que al inicio del protocolo (mes 0), con tendencia a la significación estadística en el GP ($p = 0,084$) y no significativo en el GV ($p = 0,17$). Sin embargo, a nivel cualitativo, no provocó que ningún paciente positivo en el mes 12 (100%) negativizara tras los 6 meses de parada (**Figura R.1.35.** y **Tabla R.1.63.**).

Tabla R.1.63. Respuesta inmune humoral a rubéola, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. P* de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18

Respuesta a rubéola	Grupo Placebo			Grupo Vacunado			P*
	Mes 12	Mes 18	P	Mes 12	Mes 18	P	
Humoral cuantitativa (UI/mL)	74 (28-224,5)	39,5 (26,25-76,5)	0,028	93 (49-291,5)	42 (28-111)	0,001	0,61
Humoral cualitativa, n (%)	13 (100)	12 (92,3)	1	13 (100)	13 (100)	1	-

1.4.6.7. Respuesta a sarampión

- Respuesta humoral

Tabla R.1.64. Respuesta inmune humoral y celular a sarampión, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de spots/ 106 células mononucleares de sangre periférica; P * de la diferencia 15-18 de cada grupo; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a sarampión	Grupo Placebo					Grupo Vacunado					P***		
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P***	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18		P*	P**
Humoral cualitativa	13 (100)	-	-	12 (92,3)	-	1	13 (100)	-	-	13 (100)	-	1	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	10 (0-47,75)	5 (0-30)	1	1,5 (0-9,25)	0,21	0,046	1,5 (0-23,75)	0 (0-8,25)	0,12	3 (0-25)	0,89	0,6	0,9
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-46,75)	30 (0-185)	0,043	0 (0-0)	0,17	0,18	5 (0-14)	53 (0-73,5)	0,34	32 (0-178)	0,46	0,046	0,022
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (23,1)	2 (15,4)	1	0 (0)	0,5	0,5	1 (7,7)	0 (0)	1	1 (7,7)	1	1	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	2 (15,4)	5 (38,5)	0,25	1 (7,7)	0,25	1	1 (7,7)	5 (38,5)	0,5	4 (30,8)	1	0,25	-

La parada del TARGA no produjo cambios en el seroestatus de los pacientes respecto al virus del sarampión. El 100% de los pacientes era positivo en el mes 12 y lo seguía siendo en el mes 18 (**Figura R.1.36.** y **Tabla R.1.64.**).

- Respuesta celular

El análisis de la respuesta celular para sarampión en el periodo sin TARGA demostró que se produjo en el GP una caída significativa de dicha respuesta medida por ELISPOT entre los meses 12 y 18 ($p = 0,046$), mientras que en GV se produjo un aumento no significativo en ese periodo ($p = 0,6$), sin diferencias significativas entre grupos.

Por AMPLISPOT los resultados fueron similares, con tendencias invertidas entre grupos, cayendo en el GP de forma no significativa ($p = 0,18$) y aumentando en el GV significativamente ($p = 0,046$), siendo significativamente diferente el cambio entre los grupos ($p = 0,022$) (**Figura R.1.37.** y **Tabla R.1.64.**).

Cualitativamente se comportaron forma similar, pero los cambios no fueron significativos ni intra ni intergrupos.

1.4.6.8. Respuesta a neumococo

- Respuesta humoral

El título de anticuerpos frente a neumococo experimentó un descenso significativo en el GV entre los meses 12 y 18 ($p = 0,003$), con una mediana de descenso de 1,45 veces (mediana de la razón entre valores en los meses 18 y 12 de 0,69, rango intercuartílico 0,63-0,77). Los cambios en el GP no fueron significativos y no hubo diferencias entre grupos (**Figura R.1.38.** y **Tabla R.1.65.**).

Desde el punto de vista cualitativo, dos pacientes positivos en el mes 12 del GV cambiaron su estatus a negativo en el mes 18, mientras que un paciente negativo del GP se hizo positivo.

Tabla R.1.65. Respuesta inmune humoral y celular a neumococo, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de spots/ 10⁶ células mononucleares de sangre periférica; P * de la diferencia 15-18 de cada grupo; P** de la diferencia 12-18 de cada grupo; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a neumococo	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						P***
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	
Humoral cuantitativa (UI/mL)	275 (161,5-536,5)	-	-	287 (132-835,75)	-	0,099	321 (193-1030)	-	-	259,5 (153,75-846,5)	-	0,003	0,27
Humoral cualitativa	2 (15,4)	-	-	3 (23,1)	-	1	5 (38,5)	-	-	3 (23,1)	-	0,5	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	22 (3,75-38)	3 (0-69)	0,5	6,5 (0-31,25)	0,41	0,12	0 (0-12,75)	1,5 (0-6)	0,4	0 (0-4)	0,71	0,59	0,13
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	15,5 (0-110,75)	68 (0-185)	0,028	19 (0-68)	0,4	0,34	0 (0-46,5)	85 (25-134)	0,18	92 (28-357,5)	0,73	0,12	0,035
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (15,4)	4 (30,8)	0,5	2 (15,4)	0,5	1	1 (7,7)	0 (0)	1	1 (7,7)	1	1	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	4 (30,8)	7 (53,8)	0,5	3 (23,1)	0,25	1	2 (15,4)	6 (46,2)	0,69	7 (53,8)	1	0,22	-

- Respuesta celular

Desde el punto de vista de la respuesta celular a neumococo, en el periodo sin tratamiento se objetivó un aumento por AMPLISPOT en ambos grupos, mayor significativamente en GV ($p = 0,035$), sin otros cambios significativos por ELISPOT o en el análisis cualitativo, tanto intragrupos como intergrupos (**Figura R.1.39.** y **Tabla R.1.65.**).

1.4.6.9. Respuesta a tétanos

- Respuesta humoral

Se produjo en el periodo de parada de tratamiento una disminución del título de anticuerpos, significativa en ambos grupos ($p = 0,008$), sin diferencias entre las razones entre grupos ($p = 0,68$). La mediana del descenso fue de 1,35 veces en el GP (mediana de la razón entre valores en los meses 18 y 12 de 0,74, rango intercuartílico 0,2-0,98) y 2,04 veces en el GV (mediana de la razón entre valores en los meses 18 y 12 de 0,49, rango intercuartílico 0,25-0,85) (**Figura R.1.40.** y **Tabla R.1.66.**).

En la valoración cualitativa, 2 de los 10 pacientes positivos en el GP negativizaron en el mes 18, y 0 de los 13 pacientes del GV.

- Respuesta celular

La evaluación de la respuesta celular a tétanos por ELISPOT en el periodo de parada no halló cambios significativos. Sin embargo, la valoración por AMPLISPOT mostró un aumento de respuesta entre los meses 12 y 18 en ambos grupos, significativo en el GP ($p = 0,028$) y con tendencia a ser significativamente mayor que en el GV ($p = 0,086$). El mayor aumento se produjo entre los meses 12 y 15 en el GP ($p = 0,018$), siendo incluso significativo en el análisis cualitativo por pasar de 2 pacientes positivos a 9 ($p = 0,031$) (**Figura R.1.41.** y **Tabla R.1.66.**).

Tabla R.1.66. Respuesta inmune humoral y celular a tétanos, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de spots/ 10⁶ células mononucleares de sangre periférica; P * de la diferencia 15-18 de cada grupo. P** de la diferencia 12-18 de cada grupo. P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a tétanos	Grupo Placebo						Grupo Vacunado						
	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	Mes 12	Mes 15	P	Mes 18	P*	P**	P***
Humoral cuantitativa (UJ/mL)	0,21 (0,05-3,27)	-	-	0,15 (0,001-2,83)	-	0,008	4 (1,26-5)	-	-	1,08 (0,91-2,53)	-	0,008	0,68
Humoral cualitativa	10 (76,9)	-	-	8 (61,5)	-	0,5	13 (100)	-	-	13 (100)	-	1	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	7,5 (3,75-66,25)	0 (0-90)	0,21	11,5 (2,25-41)	0,4	0,4	5 (0-30,5)	0 (0-15,75)	0,27	17 (0-44)	0,17	0,34	0,27
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-38,5)	97 (60-400)	0,018	22 (6,5-114)	0,066	0,028	29 (4-51,5)	85 (25-118,5)	0,13	105 (11-247,5)	0,73	0,12	0,086
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (23,1)	3 (23,1)	1	2 (15,4)	1	1	2 (15,4)	0 (0)	0,5	3 (23,1)	1	0,5	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	2 (15,4)	9 (69,2)	0,031	3 (23,1)	0,12	1	3 (23,1)	6 (46,2)	1	6 (46,2)	1	0,5	-

1.4.6.10. *Respuesta a difteria*

Se produjo un descenso en el título de anticuerpos anti-difteria en ambos grupos durante los 6 meses sin TARGA. Dicha disminución sin embargo no llegó a tener significación estadística ni a ser significativamente diferente entre grupos.

Cualitativamente, 1 paciente de los 5 que había positivos en el mes 12 del GP negativizó, mientras que lo hicieron 3 de 8 en el GV (**Figura R.1.42.** y **Tabla R.1.67.**).

Tabla R.1.67. Respuesta inmune humoral a difteria, tanto cuantitativa como cualitativa, tras la interrupción del tratamiento. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. P* de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18

Respuesta a difteria	Grupo Placebo			Grupo Vacunado			P*
	Mes 12	Mes 18	P	Mes 12	Mes 18	P	
Humoral cuantitativa (UI/mL)	0,01 (0,01-0,03)	0,01 (0,01-0,78)	0,34	0,24 (0,01-0,88)	0,01 (0,01-0,18)	0,21	0,21
Humoral cualitativa, n (%)	5 (38,5)	4 (30,8)	1	8 (61,5)	5 (38,5)	0,37	-

1.5. RESUMEN DEL ESTUDIO (APARTADO 1): ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE UN CALENDARIO VACUNAL SOBRE LA CARGA VIRAL Y EL SISTEMA INMUNITARIO EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH CON TARGA DURANTE EL TRATAMIENTO Y TRAS SU INTERRUPCIÓN

Se presentan los datos de un estudio unicéntrico, prospectivo, randomizado y doble ciego, en el que 26 pacientes adultos infectados por el VIH bien controlados con TARGA (> 500 linfocitos T CD4⁺/mm³, CV < 200 copias/mL y nadir > 300 linfocitos T CD4⁺/mm³) fueron randomizados 1:1 a recibir durante 12 meses el TARGA que estaban realizando junto a un calendario vacunal, o bien placebo. El calendario vacunal incluía 7 vacunas habituales en la práctica clínica frente a 10 agentes diferentes: VHB (4 dosis), VHA (2 dosis), gripe (1 dosis), neumococo (1 dosis), varicela (2 dosis), sarampión-rubéola-parotiditis (triple vírica, 1 dosis) y tétanos-difteria (1 dosis). Las dosis de placebo y vacuna, y los momentos de administración al grupo correspondiente fueron equivalentes. Tras los 12 meses del periodo de tratamiento y vacuna/placebo, éste se suspendió durante 6 meses, reiniciándose en cualquier momento si la cifra de linfocitos T CD4⁺/mm³ descendió por debajo de 350 células/mm³ o al final de los 6 meses si la CV plasmática fue superior a 5000 copias/mL.

1.5.1. Características basales

Basalmente, los pacientes del GV eran más jóvenes que el GP ($p = 0,06$). También el GV presentó mayores parámetros de función tímica (volumen tímico, $TRECs/10^6$ CMSP y células CD4⁺ naïve, incluyendo las CD127 positivas).

No se hallaron diferencias entre grupos en otras subpoblaciones celulares, en las respuestas proliferativas frente a diferentes activadores, incluyendo proteínas del VIH, en las respuestas específicas CD8⁺ frente al VIH, ni en los parámetros del sistema IL-7/IL-7R.

Respecto a las respuestas a los antígenos vacunales, basalmente se halló una alta proporción de pacientes positivos para sarampión, rubéola, parotiditis, VVZ y tétanos ($>90\%$ de pacientes positivos), siendo más baja para VHA y VHB (73 y 42% de pacientes positivos,

respectivamente) y muy baja para neumococo y difteria (sólo 23 y 15% de pacientes positivos respectivamente). Las proporciones de pacientes positivos a nivel celular fueron mucho menores para todos los agentes, y las correlaciones entre las respuestas humoral y celular fueron en general bajas (cuantitativas y cualitativas). No se hallaron diferencias ni en el análisis cuantitativo ni en la proporción de pacientes positivos basalmente a los diferentes antígenos vacunales.

1.5.2. Cambios durante el periodo vacunal

El calendario vacunal fue bien tolerado y no se registró ningún efecto secundario local ni sistémico.

Ni el calendario vacunal administrado en general y ninguna vacuna en particular se asociaron a una mayor frecuencia de CV detectables ≥ 200 copias/mL ó ≥ 20 copias/mL ($p > 0,05$ entre grupos para ambas técnicas). El análisis no mostró diferencias ni cuando se realizó en función de las determinaciones ni en función de los pacientes, así como tampoco cuando se realizó sin determinaciones que pudieran inducir a error por ser detectables en el contexto de ausencia de tratamiento o al inicio del estudio, antes de recibir ninguna vacuna. Tampoco se vieron diferencias en la influencia de la vacunación sobre la CV cuando el paciente era seronegativo para el antígeno contra el que se inmunizaba.

Desde el punto de vista inmunológico, mientras que el GP presentó el aumento habitual de la población linfocitaria $CD4^+$ con TARGA (aumentó un 5,2% ($\pm 14,6\%$) durante los 12 meses de tratamiento), en el GV se produjo un descenso de los linfocitos T $CD4^+$ de un 9,1% ($\pm 18,9\%$).

Las vacunaciones se asociaron a un aumento de las subpoblaciones linfocitarias con marcadores de activación, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$ ($CD38^+$, $CD38^+HLADR^+$, $CCR5^+$) y a un aumento en las respuestas proliferativas a mitógenos, tétanos y proteínas del VIH.

Además se produjeron cambios en las subpoblaciones *naïve* y memoria, fundamentalmente con un aumento de estas últimas.

Por el contrario, las vacunaciones no se asociaron a cambios en la proliferación celular, en las frecuencias de respuestas $CD8^+$ específicas frente al VIH, en la función tímica o en las concentraciones séricas de IL-7, aunque sí indujeron un aumento en la expresión del receptor de IL-7.

Finalmente, las vacunaciones se asociaron a un aumento de las respuestas humorales frente a todas las vacunas administradas que pudieron ser evaluadas a este respecto. Sólo se hallaron aumentos específicos en las respuestas celulares tras la vacunación de VHB y gripe.

1.5.3. Cambios tras la interrupción

Tras la interrupción, se produjo un rebote de la CV en todos los pacientes, sin diferencias significativas entre grupos, de forma que el calendario vacunal no se asoció a un mejor control de la CV, aunque tampoco a una mayor replicación viral.

El calendario vacunal que recibieron los pacientes del GV durante la fase de tratamiento influyó en la evolución de los parámetros del sistema inmune tras la interrupción del TARGA, fundamentalmente en los dos primeros meses tras la suspensión (del mes 12 al 14), de forma que los pacientes del GV presentaron una menor (y más tardía) activación linfocitaria $CD4^+$, pérdida de linfocitos T $CD4^+$ totales y aumento de las respuestas linfoproliferativas (tanto las específicas frente al VIH como a mitógenos), mientras que presentaron mayores (y más precoces) aumentos en la activación linfocitaria $CD8^+$, aumento de los linfocitos T $CD8^+$ totales y aumento de las respuestas específicas $CD8^+$ anti-VIH. Sin embargo, al final de los 6 meses de la interrupción, los diferentes parámetros tendieron a igualarse en los dos grupos.

No influyeron de manera significativa las vacunas en la evolución tras la interrupción de los parámetros de función tímica, del sistema IL-7/IL-7R o de las respuestas humorales y celulares a las vacunas recibidas.

2. SUBESTUDIO A: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE EPISODIOS DE CARGA VIRAL DETECTABLE SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE EL TARGA Y TRAS SU INTERRUPCIÓN

2.1. INTRODUCCIÓN

A continuación se expone el subanálisis de la potencial influencia de los episodios de viremia intermitente en los diferentes parámetros inmunológicos, la función tímica, el sistema IL-7/IL-7R y las respuestas vacunales.

Para ello se clasificaron los pacientes en función de si presentaron episodios detectables de CV o no en un grupo detectable (GD) o indetectable (GI) respectivamente. A este respecto se realizaron dos análisis. Uno, incluyendo en el GD a aquellos pacientes con CV detectables con un ensayo cuyo límite inferior de sensibilidad era de 200 copias/mL (n = 10; Subestudio A1, **apartado 2.2. de Resultados**). Y otro (Subestudio A2, **apartado 2.3. de Resultados**), incluyendo a aquellos pacientes con CV detectables con un ensayo cuyo límite inferior de sensibilidad era de 20 copias/mL (n = 14).

El análisis se hizo para todo aquel paciente con CV detectable, y por tanto se incluyeron aquellos pacientes con EVI (episodios de CV detectable que vuelven a la indetectabilidad sin cambios en el TARGA) y también los pacientes que presentaron CV detectables en otro contexto (por haber abandonado transitoriamente el TARGA, o VPBN). El análisis se repitió también sin estos pacientes.

2.2. SUBESTUDIO A1: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE EPISODIOS DE CARGA VIRAL DETECTABLE \geq 200 COPIAS/ML SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE EL TARGA Y TRAS SU INTERRUPCIÓN

2.2.1. Características epidemiológicas basales

Resultados

Los pacientes se dividieron en dos grupos, el GD, con 10 pacientes que presentaron en algún momento alguna CV detectable > 200 copias/mL, y el GI, en el que los pacientes se mantuvieron indetectables durante los 12 meses de tratamiento (< 200 copias/mL).

En general, no existían diferencias significativas en las características basales demográficas (edad, sexo, infección por el VHC) ni en las relacionadas con la infección por el VIH (factor de riesgo, duración de la infección, CV pico pretratamiento, linfocitos T CD4⁺ nadir) y su tratamiento (duración del tratamiento, pautas de tratamiento previas, uso de mono o biterapia) (Tabla R.2.1.).

Tabla R.2.1. Características basales de los pacientes. Para las variables cuantitativas se expone la media y la desviación típica. Para las cualitativas, el número de pacientes y el porcentaje que supone dentro de su grupo (VHC: Virus hepatitis C; ADVP: Adictos a drogas por vía parenteral; TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad; CV: Carga viral; EVI: Episodio de viremia intermitente; * Test exacto de Fisher)

Variable	Grupo Indetectable (<200 copias/mL) (n = 16)	Grupo Detectable (>200 copias/mL) (n = 10)	P
Edad (años)	40,94	38	0,43
Sexo (Varones:Mujeres)	11:5	10:0	0,12*
VHC +, n (%)	2 (12,5)	2 (20)	0,62*
Factor de riesgo n (%)			
Homosexual	9 (56,25)	5 (50)	1*
Heterosexual	6 (37,5)	3 (30)	1*
ADVP	1 (6,25)	2 (20)	0,54*
Duración infección (días)	2181,69 ± 1316,76	2570,33 ± 2400,52	0,66
Duración TARGA (días)	1498,62 ± 1139,06	1048,55 ± 834,85	0,31
Número de pautas tratamiento previas	2,44 ± 1,71	2,67 ± 2,65	0,79
Había recibido ≥ 3 pautas TARGA previas, n (%)	7 (43,75)	3 (30)	0,69*
Había recibido mono o biterapia previas, n (%)	3 (18,75)	1 (10)	1*
TARGA actual con inhibidor de la proteasa, n (%)	7 (43,75)	7 (70)	0,25*
CV más alta (log ₁₀ copias/mL)	4,81 ± 0,81	4,72 ± 0,80	0,79
Había tenido EVI previos, n (%)	4 (25)	3 (30)	0,63*
CD4 ⁺ Nadir			
Absoluto (células/mm ³)	459,69 ± 113,07	433,78 ± 113,75	0,59
Porcentaje	25,69 ± 7,24	21,54 ± 6,93	0,18
Pertenecía al grupo vacunado, n (%)	8 (50)	5 (50)	1*

Cabe decir que, aunque no fuese estadísticamente significativo, en el GD sólo había hombres, de forma que todas las mujeres del estudio (5) formaban parte del GI. Y que también, aunque no alcanzó la significación estadística, el porcentaje de pautas que incluían un IP en el GD fue mayor que en el GI (70 vs 43,75%, p = 0,69, test exacto de Fisher).

El número previo de EVI tampoco fue diferente. En el GI habían presentado EVI con anterioridad 4 pacientes, por 3 en el GD. Todos los pacientes excepto uno en el GI (que había presentado 3 EVI) habían presentado un único episodio.

El 50% de los pacientes en GD y el 50% de los pacientes en el GI estaban incluidos en el grupo que recibió vacunas durante el estudio.

2.2.2. Características virológicas basales y evolución de la replicación viral

No se encontraron diferencias en los niveles de la CV más alta antes de cualquier tratamiento. Sin embargo, cabe decir que existían pacientes que habían iniciado TARGA antes de disponer de las técnicas de cuantificación de ARN plasmático viral, por lo que se tomó el valor de CV más alta que tuviesen durante el TARGA, o bien si se había suspendido temporalmente en algún momento.

La evolución de la CV en los pacientes del GD se ha descrito con detalle en el **apartado 1.3.2**. Brevemente, se obtuvieron durante los 12 meses de tratamiento un total de 314 determinaciones de CV. De éstas, se obtuvo una $CV \geq 200$ copias/mL en 22 determinaciones (incidencia de 0,07 [95% IC 0,044-0,104]). Se presentaron 4 series de CV detectables consecutivas y 6 episodios aislados. Globalmente, el rango de CV detectables fue de 210 a 51.200 copias/mL, con una media de 4076,04 copias/mL y una mediana de 544,5 copias/mL.

Cuando se valoraron únicamente los episodios que cumplían la definición de EVI, con una elevación de la CV por encima del límite de sensibilidad de forma transitoria, es decir, precedida y seguida de otra determinación de CV indetectable sin haber realizado cambios en el TARGA, teniendo en cuenta que un EVI podía incluir varias CV detectables consecutivas, se hallaron 7 episodios (0,26 episodios/paciente/año, 7 de 292 determinaciones valorables). Todos consistieron en una única determinación de CV detectable (duración máxima por tanto de 60 días), excepto uno que constó de dos determinaciones. La media, mediana y el rango de los EVI fue de 370,12, 320 y 210-631 copias/mL.

Tras la retirada del TARGA la evolución que presentaron los pacientes de cada grupo fue significativamente diferente. Los pacientes del GD tuvieron un mayor rebote de la CV, definido por una CV pico más elevada (5,33 vs 4,68 log₁₀, p = 0,022), una CV más elevada en el mes 14 (4,85 vs 4,08 log₁₀, p = 0,005) y un AUC tras la retirada mayor (13,51 vs 9,57, p = 0,007) (Tabla R.2.2. y Figuras R.2.1.-R.2.2.).

Tabla R.2.2. Comparación de variables virológicas en el rebote tras la interrupción del tratamiento entre los grupos que presentaron CV detectables por encima de 200 copias/mL y los se mantuvieron por debajo de dicho nivel. Se muestran las medias y las desviaciones típicas de cada variable

Variables virológicas en el rebote	Grupo Indetectable (< 200 copias/mL)	Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL)	P
Carga viral mes 13 (copias/mL log ₁₀)	3,76 ± 1,4	4,69 ± 1,14	0,12
Carga viral mes 14 (copias/mL log ₁₀)	4,08 ± 0,76	4,85 ± 0,35	0,005
Carga viral mes 18 (copias/mL log ₁₀)	4,22 ± 0,76	4,62 ± 0,57	0,18
Carga viral pico (copias/mL log ₁₀)	4,68 ± 0,77	5,33 ± 0,38	0,022
Mes de carga viral pico	15,27 ± 2,19	14,6 ± 1,78	0,43
Área neta bajo la curva de carga viral	9,57 ± 4,48	13,51 ± 2,08	0,007

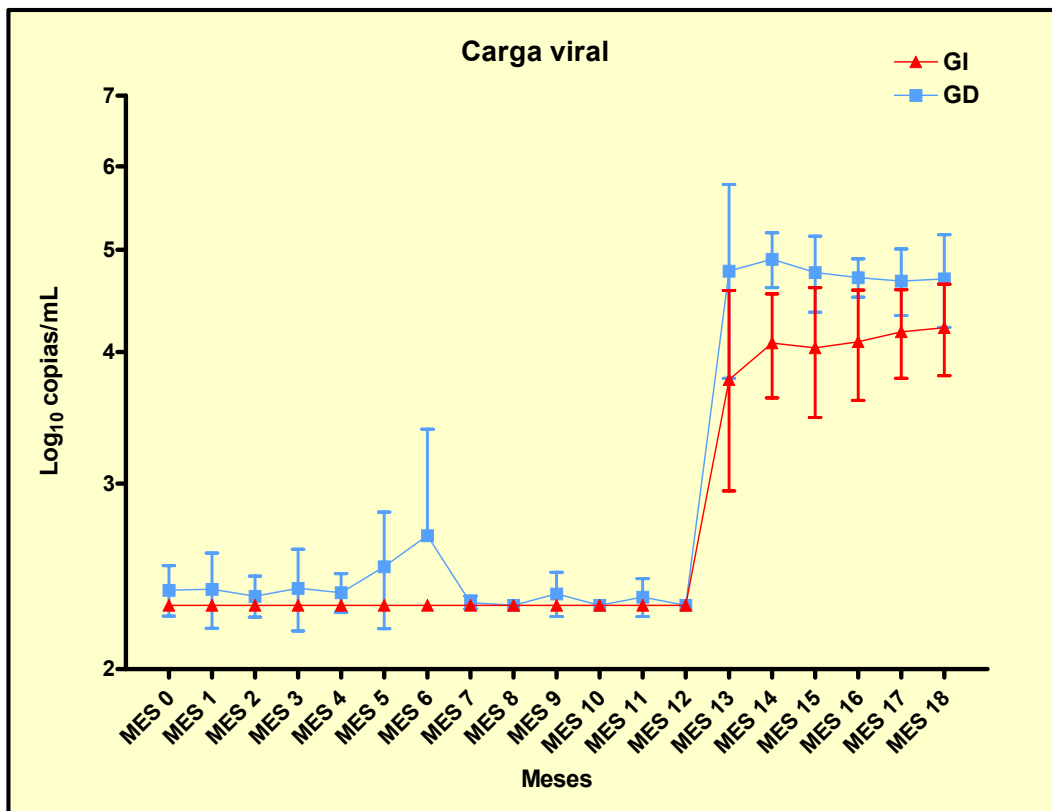


Figura R.2.1. Cargas virales durante el tratamiento y en el rebote de los GD y GI con el ensayo con límite de detección de 200 copias/mL. Se muestra la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

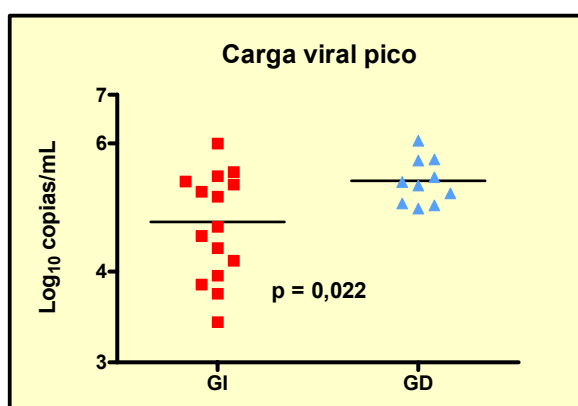


Figura R.2.2. Comparación de la carga viral pico (\log_{10}) tras la interrupción del tratamiento. El GD presenta una CV significativamente mayor que el GI (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

Cuando se analizó la proporción de pacientes que al final del estudio tenían menos de 5000 copias/mL, criterio descrito en el protocolo para reiniciar TARGA al final del mismo, se halló que, aunque no hubo diferencias entre los grupos ($p = 0,27$, test exacto de Fisher), los tres pacientes que en el mes 18 estaban por debajo de esa cifra de CV estaban en el GI (RR 1,25, 95% IC 0,97-1,61).

Cuando el análisis se realizó para los grupos vacunado o placebo por separado, los pacientes con EVI siguieron siendo los que presentaron un mayor rebote viral, sobre todo dentro del grupo de vacunados, aunque la significación estadística disminuyó, (**Tablas R.2.3-R.2.4** y **Figuras R.2.3-R.2.4**).

Tabla R.2.3. Comparación de variables virológicas en el rebote tras la interrupción del tratamiento entre los grupos que presentaron CV detectables ≥ 200 copias ($n = 5$) y los se mantuvieron por debajo de dicho nivel ($n = 8$) dentro del grupo de pacientes que habían recibido placebo durante el tratamiento. Se muestran la media y la desviación típica de cada variable

Variabes virológicas en el rebote	Grupo indetectable + placebo	Grupo detectable + placebo	P
Carga viral mes 13 (copias/mL \log_{10})	3,27 \pm 1,57	4,46 \pm 1,4	0,21
Carga viral mes 14 (copias/mL \log_{10})	3,89 \pm 0,77	4,74 \pm 0,44	0,054
Carga viral pico (copias/mL \log_{10})	4,58 \pm 0,92	5,35 \pm 0,42	0,11
Área neta bajo la curva de carga viral	8,43 \pm 4,99	12,73 \pm 1,44	0,066

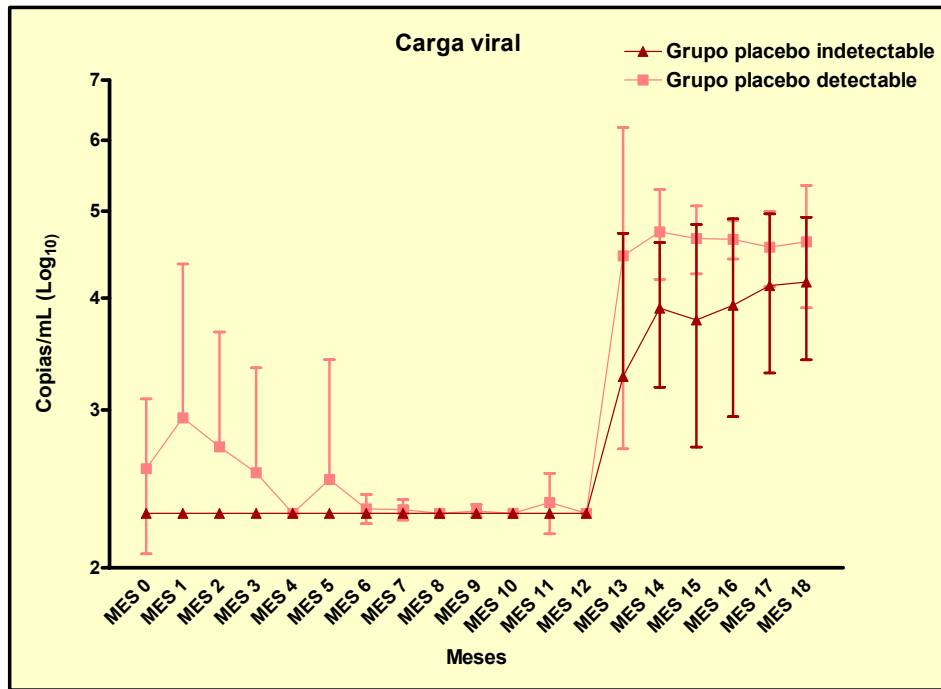


Figura R.2.3. Comparación de las cargas virales durante el tratamiento y en el rebote de los pacientes del grupo placebo en función de si presentaron CV detectables ≥ 200 copias/mL o no. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación

Tabla R.2.4. Comparación de variables virológicas en el rebote tras la interrupción del tratamiento entre los grupos que presentaron CV detectables ≥ 200 copias ($n = 8$) y los se mantuvieron por debajo de dicho nivel ($n = 5$), dentro del grupo de pacientes que habían recibido vacunaciones durante el tratamiento. Se muestran la media y la desviación típica de cada variable

Variabes virológicas en el rebote	Grupo indetectable + vacunado	Grupo detectable + vacunado	P
Carga viral mes 13 (copias/mL log ₁₀)	4,26 ± 1,1	4,98 ± 0,78	0,28
Carga viral mes 14 (copias/mL log ₁₀)	4,29 ± 0,76	4,98 ± 0,19	0,12
Carga viral pico (copias/mL log ₁₀)	4,7 ± 0,66	5,29 ± 0,39	0,13
Área neta bajo la curva de carga viral	10,8 ± 4,05	14,28 ± 2,48	0,094

Cuando se compararon las evoluciones sin TARGA en aquellos pacientes que habían sido vacunados y presentaron CV detectables ($n = 7$) y los que no habían sido vacunados y siempre estuvieron indetectables ($n = 5$), las diferencias en el rebote se magnificaron y fueron significativamente muy diferentes a pesar de lo limitado de la muestra (Tabla R.2.5. y Figura R.2.5.).

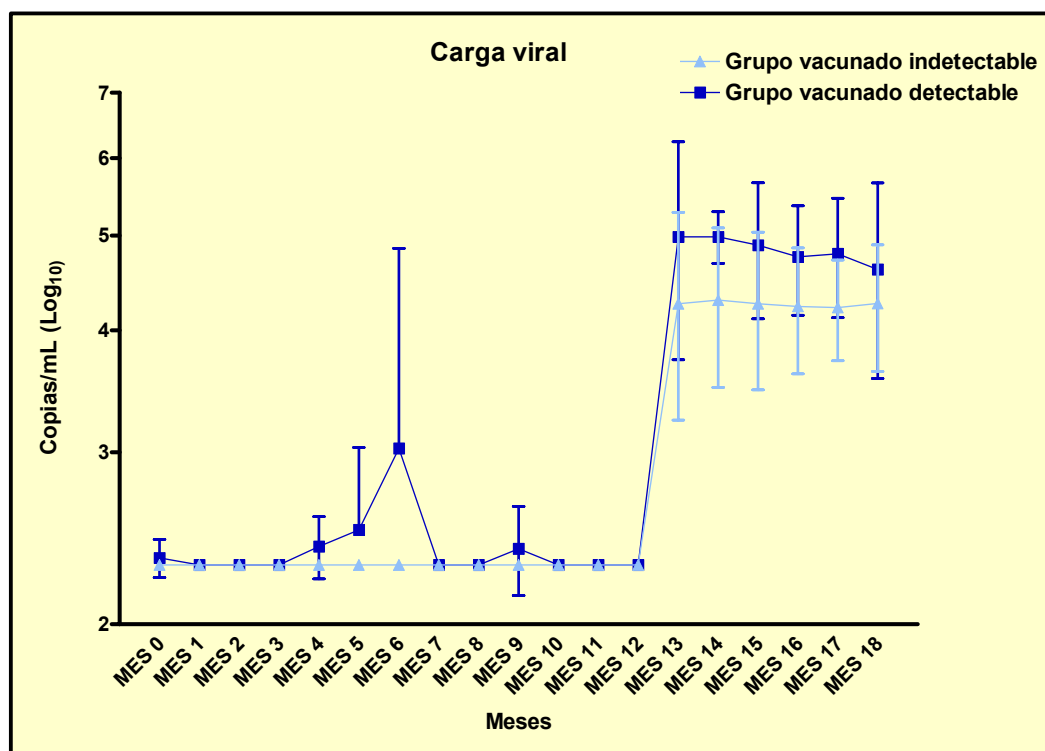


Figura R.2.4. Comparación de las cargas virales durante el tratamiento y en el rebote de los pacientes del grupo vacunado en función de si presentaron CV detectables ≥ 200 copias/mL o no. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación

Tabla R.2.5. Comparación de variables virológicas en el rebote tras la interrupción del tratamiento entre los grupos que presentaron CV detectables ≥ 200 copias y habían recibido vacunaciones ($n = 5$) y los se mantuvieron por debajo de dicho nivel y recibieron placebo ($n = 7$). Se muestran la media y la desviación típica de cada variable

Variables virológicas en el rebote	Grupo indetectable + placebo	Grupo detectable + vacunado	P
Carga viral mes 13 (copias/mL log ₁₀)	3,27 \pm 1,57	4,98 \pm 0,79	0,076
Carga viral mes 14 (copias/mL log ₁₀)	3,89 \pm 0,77	4,98 \pm 0,19	0,009
Carga viral pico (copias/mL log ₁₀)	4,58 \pm 0,92	5,29 \pm 0,39	0,14
Área neta bajo la curva de carga viral	8,43 \pm 4,99	14,28 \pm 2,48	0,038

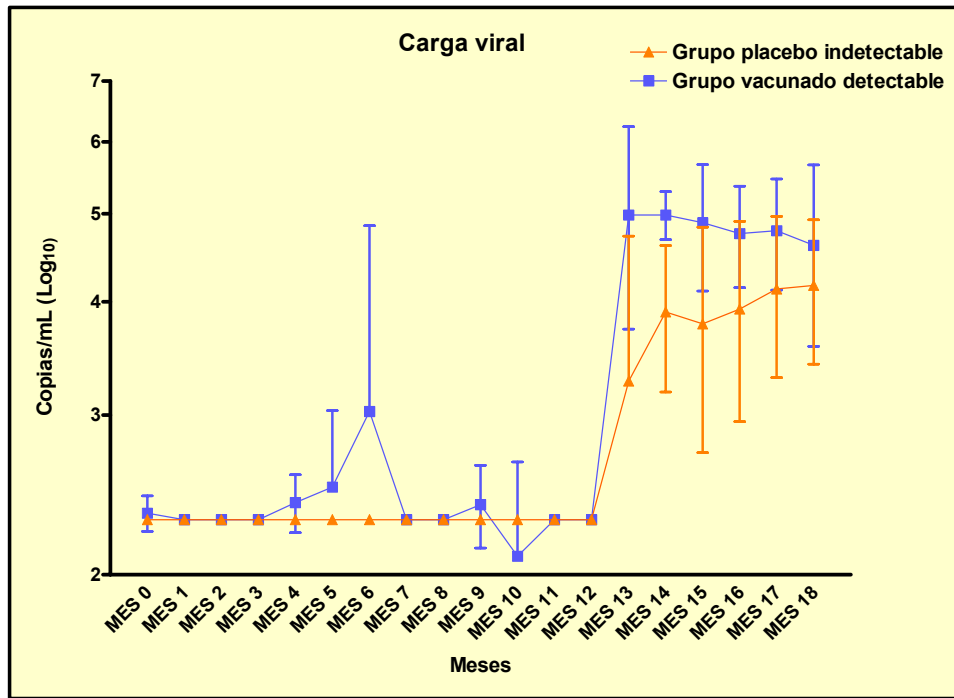


Figura R.2.5. Comparación de las cargas virales durante el tratamiento y en el rebote entre los pacientes del grupo vacunado que presentaron CV detectables ≥ 200 copias/mL y los pacientes del grupo placebo que no presentaron CV detectables ≥ 200 copias/mL. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación

2.2.3. Características del sistema inmune basales y evolución

2.2.3.1. Subpoblaciones linfocitarias

Los cambios experimentados por las diferentes subpoblaciones linfocitarias durante los periodos de tratamiento y parada en función del GI o GD se pueden observar en las **Figuras R.2.6.-R.2.13.** o en las **Tablas R.2.6.-R.2.8.**

Tabla R.2.6. Evolución de las subpoblaciones linfocitarias durante el período tratamiento e interrupción por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de proporción de cada población (* de la diferencia 12-18 intragrupos)

Subpoblaciones linfocitarias	Grupo Indetectable (< 200 copias/mL) (n = 16)					Grupo Detectable (> 200 copias/mL) (n = 10)				
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	P*	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	P*
Linfocitos totales (cel/mm ³)	2276,88 ± 635,31	1846,67 ± 497,3	0,004	1848,67 ± 634,2	0,99	2540 ± 995,99	2266 ± 865,72	0,14	2420 ± 809,97	0,54
CD4 ⁺	40,66 ± 7,83	39,61 ± 7,43	0,21	29,66 ± 7,93	< 0,001	34,34 ± 7,84	34 ± 9,48	0,89	25,68 ± 10,49	0,094
CD8 ⁺	37,52 ± 8,32	32,9 ± 8,42	0,024	41,69 ± 9,16	0,007	41,3 ± 5,4	35 ± 6,09	0,014	48,77 ± 9,34	< 0,001
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,16 ± 0,51	1,28 ± 0,44	0,37	0,73 ± 0,28	< 0,001	0,83 ± 0,21	0,99 ± 0,34	0,17	0,53 ± 0,25	0,009
CD4 ⁺ CD28 ⁺	90,32 ± 10,54	93,14 ± 6,92	0,19	92,72 ± 6,87	0,56	94,24 ± 4,55	94,77 ± 4,58	0,47	95,22 ± 4,16	0,51
CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	7,73 ± 9,14	5,6 ± 6,11	0,47	5,27 ± 5,73	0,62	4,91 ± 4,09	4,57 ± 4,46	0,62	4,12 ± 4,01	0,53
CD4 ⁺ CD38 ⁺	46,18 ± 10,3	51,76 ± 11,36	0,15	54,91 ± 12,89	0,36	41,72 ± 12,55	42,95 ± 15,67	0,66	52,52 ± 12,24	0,11
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	2,39 ± 1,29	2,75 ± 1,95	0,41	4,56 ± 3,11	0,017	2,39 ± 1,72	2,43 ± 1,35	0,95	4,82 ± 3	0,039
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	2,84 ± 5,32	4,23 ± 4,33	0,52	4,01 ± 3,4	0,9	1,2 ± 0,82	4,84 ± 6,9	0,15	3,64 ± 1,43	0,54
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁻	36,27 ± 11,48	39,05 ± 13,04	0,24	40,5 ± 11,35	0,52	28,06 ± 10,09	29,61 ± 10,36	0,41	33,19 ± 9,61	0,36
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	48,97 ± 9,46	51,9 ± 13,59	0,095	52,5 ± 13,78	0,79	51,78 ± 12,54	61,05 ± 13,79	0,017	60,7 ± 9,93	0,81
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺	33,92 ± 13,47	38,73 ± 16,01	0,34	42,24 ± 12,91	0,27	27,73 ± 10,65	31,84 ± 14,4	0,22	34,87 ± 10,35	0,47
CD4 ⁺ CD25 ⁺	2,78 ± 0,93	5,09 ± 3,09	0,39	4,9 ± 3,78	0,89	1,48	3,34 ± 1,34	-	3,67 ± 2,33	0,67
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	19,73 ± 22,13	39,35 ± 22,96	0,058	33,5 ± 25,62	0,51	21,63 ± 21,68	29,89 ± 29,64	0,56	26,37 ± 12,29	0,58
CD4 ⁺ CCR5 ⁻	3,69 ± 2,37	3,56 ± 2,88	0,8	4,77 ± 3,6	0,33	1,8 ± 1,32	3,89 ± 3,35	0,045	4,15 ± 3,1	0,49

Tabla R.2.6. (continuación)

Subpoblaciones linfocitarias	Grupo Indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL)				P*
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	
CD8 ⁺ CD28 ⁺	51,72 ± 14,69	56,74 ± 14,7	0,003	48,79 ± 7,69	51,13 ± 6,92	55,11 ± 11,29	0,26	45,03 ± 9,56	0,13
CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	35,97 ± 12,8	33,16 ± 12,72	0,14	31,49 ± 7,91	35,85 ± 10,3	35,97 ± 9,75	0,95	33,97 ± 8,19	0,25
CD8 ⁺ CD38 ⁺	32,29 ± 9,09	37,92 ± 11,83	0,12	56,71 ± 12,66	24,14 ± 8,63	33,31 ± 11,74	0,003	56,55 ± 8,28	0,003
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	6,7 ± 3,42	10,21 ± 6,64	0,05	26,61 ± 10,88	5,6 ± 2,39	8,88 ± 2,98	0,006	26,4 ± 9,15	0,001
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	5,11 ± 6,61	10,66 ± 6,74	0,83	12,39 ± 10,45	1,55 ± 1,39	11,88 ± 9,17	0,007	11,66 ± 5,2	0,73
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	52,6 ± 11,64	52,65 ± 12,6	0,63	40,45 ± 10,24	54,9 ± 14,9	53,27 ± 13,87	0,48	42,01 ± 15,99	<0,001
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺	27,12 ± 15,12	35,66 ± 16,46	0,17	27,79 ± 6,72	26,98 ± 10,37	27,37 ± 8,35	0,81	23,26 ± 9,7	0,2
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	33,36 ± 11,26	34,14 ± 11,08	0,098	45,9 ± 13,12	28,07 ± 9,59	31,92 ± 11,93	0,079	45,3 ± 15,28	0,001
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	14,48 ± 18,96	31,63 ± 12	0,021	20,38 ± 14,83	17,22 ± 25,37	31,17 ± 26,52	0,33	17,31 ± 7,66	0,09
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	10,52 ± 3,69	11,31 ± 6,73	0,76	13,42 ± 12	9,55 ± 7,32	13,3 ± 8,56	0,038	17,85 ± 10,93	0,28

Tabla R.2.7. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de las subpoblaciones celulares en los grupos detectable e indetectable con límite de 200 copias/mL

Subpoblaciones linfocitarias	Mes 0 (basal)	Periodo tratamiento (meses 0-12)	Periodo sin tratamiento (meses 12-18)
	P	P	P
Linfocitos totales (cel/mm ³)	0,47	0,63	0,62
CD4 ⁺	0,057	0,55	0,71
CD8 ⁺	0,22	0,44	0,11
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,065	0,59	0,7
CD4 ⁺ CD28 ⁺	0,2	0,58	0,93
CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	0,29	0,8	0,44
CD4 ⁺ CD38 ⁺	0,33	0,49	0,35
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	0,1	0,62	0,54
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	0,34	0,44	0,67
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	0,076	0,74	0,73
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	0,52	0,1	0,96
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	0,23	0,91	0,75
CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,35	0,85	0,8
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	0,83	0,51	0,97
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	0,031	0,11	0,83
CD8 ⁺ CD28 ⁺	0,91	0,98	0,78
CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	0,98	0,32	0,74
CD8 ⁺ CD38 ⁺	0,033	0,32	0,6
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	0,38	0,87	0,72
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	0,053	0,25	0,87
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	0,66	0,87	0,8
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	0,98	0,29	0,4
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	0,23	0,41	0,77
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	0,76	0,86	0,53
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	0,65	0,21	0,57

- Linfocitos totales: Durante todo el periodo de tratamiento los linfocitos totales fueron superiores en el GD que el GI, y durante los 12 meses de tratamiento estas diferencias aumentaron por un descenso significativo en el GI ($p = 0,004$ para la diferencia 0-12). Sin embargo las diferencias entre grupos no fueron significativas. Tras la parada las tendencias en ambos grupos fueron similares, sin diferencias entre ellos.

Resultados

Tabla R.2.8. Áreas netas bajo la curva de las diferentes subpoblaciones linfocitarias durante el periodo con y sin tratamiento para los grupos detectable e indetectable con límite de 200 copias/mL. Se muestran la media y la desviación típica de cada variable (P* Diferencia 0-12 entre grupos; P ** Diferencia 12-18 entre grupos)

Subpoblaciones linfocitarias	Grupo Indetectable (<200 copias/mL)		Grupo Detectable (>200 copias/mL)		P*	P**
	Meses 0-12	Meses 12-18	Meses 0-12	Meses 12-18		
Linfocitos totales (cel/mm ³)	-1663,97 ± 3284,45	743 ± 2616,27	-632,8 ± 5523,08	408,1 ± 2856,61	0,6	0,76
CD4 ⁺	-0,53 ± 64,20	-42,51 ± 21,16	-21,57 ± 46,16	-46,53 ± 33,65	0,38	0,72
CD8 ⁺	-36,75 ± 38,92	40,57 ± 46,9	-25 ± 24,63	67,44 ± 31,11	0,4	0,12
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,93 ± 2,2	-2,35 ± 1,66	-0,18 ± 1,41	-2,38 ± 1,58	0,17	0,96
CD4 ⁺ CD28 ⁺	1 ± 21,01	-9,56 ± 14,44	-4,95 ± 20,04	-4,4 ± 24,52	0,48	0,51
CD4 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	1,34 ± 19,04	2,19 ± 13,72	0,22 ± 23,43	1,3 ± 21,61	0,89	0,9
CD4 ⁺ CD38 ⁺	-0,12 ± 65,82	4,08 ± 49,44	12,47 ± 42,02	39,98 ± 71,58	0,6	0,15
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	-3,62 ± 15,15	5,82 ± 12,28	5,08 ± 22,89	15,72 ± 16,22	0,25	0,096
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	0,77 ± 61,8	-4,52 ± 26,24	25,27 ± 40,45	-1,96 ± 38,84	0,28	0,84
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	-3,28 ± 107,38	-0,42 ± 36,03	9,41 ± 82,03	10,3 ± 49,81	0,75	0,54
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	62,49 ± 98,47	4,64 ± 39,96	54,8 ± 77,02	-6,8 ± 51,98	0,84	0,53
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	20,2 ± 136,79	4,65 ± 60,56	-4,81 ± 88,89	0,65 ± 59,61	0,61	0,87
CD4 ⁺ CD25 ⁺	4,82 ± 10,03	-4,38 ± 17,18	2,76 ± 3,65	-0,31 ± 6,23	0,58	0,48
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	94,55 ± 233,28	-43,33 ± 124,17	25,13 ± 320,15	-17,32 ± 183,28	0,53	0,67
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	6,81 ± 45,34	2,69 ± 12,58	15,51 ± 19,21	-0,094 ± 17,48	0,57	0,65
CD8 ⁺ CD28 ⁺	12,65 ± 48,67	-45,74 ± 39,09	-28,23 ± 38,08	-62,33 ± 71,63	0,034	0,46
CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	-15,4 ± 50,61	-3,06 ± 42,35	13,69 ± 52,34	-11,1 ± 47,33	0,17	0,66
CD8 ⁺ CD38 ⁺	-8,44 ± 82,51	95,47 ± 64,85	56,37 ± 80,52	124,25 ± 86,48	0,061	0,35
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	12,92 ± 36,26	82,39 ± 41,61	26,81 ± 47,15	113,1 ± 90,04	0,4	0,33
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	26,32 ± 86,01	6,84 ± 49,64	73,22 ± 62,18	-1,64 ± 53,35	0,15	0,69
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	7,9 ± 46,76	-58,44 ± 34,73	-21,99 ± 107,43	-61,17 ± 36,93	0,34	0,85
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	76,28 ± 141,2	-30,23 ± 60,8	-51,83 ± 84,83	-33,12 ± 33,44	0,016	0,89
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁻	24,88 ± 42,57	53,24 ± 32,62	50,72 ± 58,76	65,98 ± 56,87	0,21	0,48
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	134,24 ± 201,26	-61,94 ± 73,54	96,8 ± 329,36	-71,69 ± 157,4	0,72	0,84
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	13,46 ± 70,93	5,69 ± 27,07	23,37 ± 42,86	4,67 ± 47,49	0,69	0,95

- Linfocitos CD4⁺: A diferencia de los linfocitos totales, básicamente el GI tenía más linfocitos T CD4⁺, con tendencia a la significación estadística sobre el GD (p = 0,057). Esta diferencia se mantuvo durante el tratamiento y en ambos grupos descendieron con la suspensión del TARGA de forma significativa, siendo la caída más precoz y marcada en el GD, presentando una pérdida significativamente mayor entre el mes 12 y 13 que el GI (p = 0,026), mientras que el GI presentó la mayor caída entre los meses 13 y 14, superior en ese periodo que la que presentó el GD (p = 0,086). De este modo, la caída porcentual de la proporción de linfocitos T CD4⁺ entre los meses 12 y 13 fue mayor significativamente en el GD que en el GI

($19,8 \pm 22\%$ vs $6,9\% \pm 18\%$ en GD y GI, respectivamente, $p = 0,039$), mientras que en la caída porcentual entre los meses 12 y 18 no hubieron diferencias significativas ($19,18 \pm 49,6\%$ vs $25,4 \pm 12,5\%$ en GD y GI, respectivamente, $p = 0,65$).

Cuando se analizó por medio de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier los pacientes que cayeron en al menos una determinación por debajo de $500 \text{ CD4}/\text{mm}^3$ totales a partir del mes 12, no se hallaron diferencias significativas ($p = 0,89$) (**Figura R.2.6**).

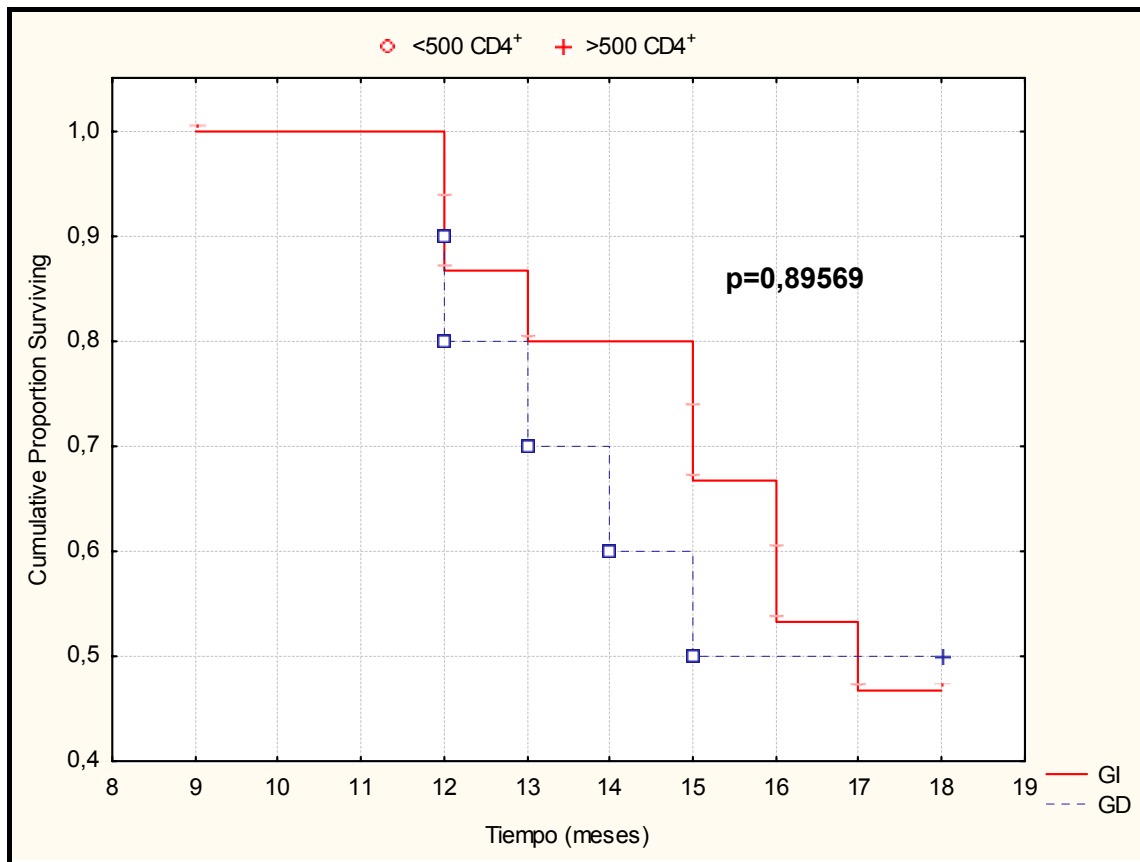


Figura R.2.6. Curva de Kaplan Meier en la que se observa la proporción de pacientes que permanecen con una cifra de linfocitos T CD4^+ totales superior a $500 \text{ células}/\text{m}^3$ tras la parada de tratamiento (mes 12) hasta el fin del protocolo (mes 18) (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

- Linfocitos CD8^+ : Basalmente eran más altos en el GD, aunque no de forma significativa, y presentaron durante el periodo de tratamiento un descenso significativo en ambos grupos ($p = 0,024$ y $0,014$ para GI y GD, respectivamente), con un ascenso posterior tras la suspensión del TARGA, sobre todo los primeros dos meses, también significativo ($p = 0,007$

y < 0,001 para GI y GD, respectivamente). Igual que en el caso de los linfocitos CD4⁺, el mayor cambio tras la parada en los CD8⁺ se dio de forma más precoz en el GD, entre el mes 12 y 13, mientras que el GI lo hizo entre el 13 y el 14.

- Cociente CD4⁺/CD8⁺: El cociente era mayor en el GI de forma basal, con tendencia a la significación estadística (p = 0,065). Durante el tratamiento aumentó en los dos grupos, y aunque en el GI el aumento fue más sostenido y en el GD más irregular, no existieron diferencias significativas entre los grupos. Tras la suspensión del TARGA se produjo un descenso significativo en los dos grupos (p < 0,001 y 0,009 para GI y GD, respectivamente), más precoz en el GD y más tardío y progresivo en el GI.

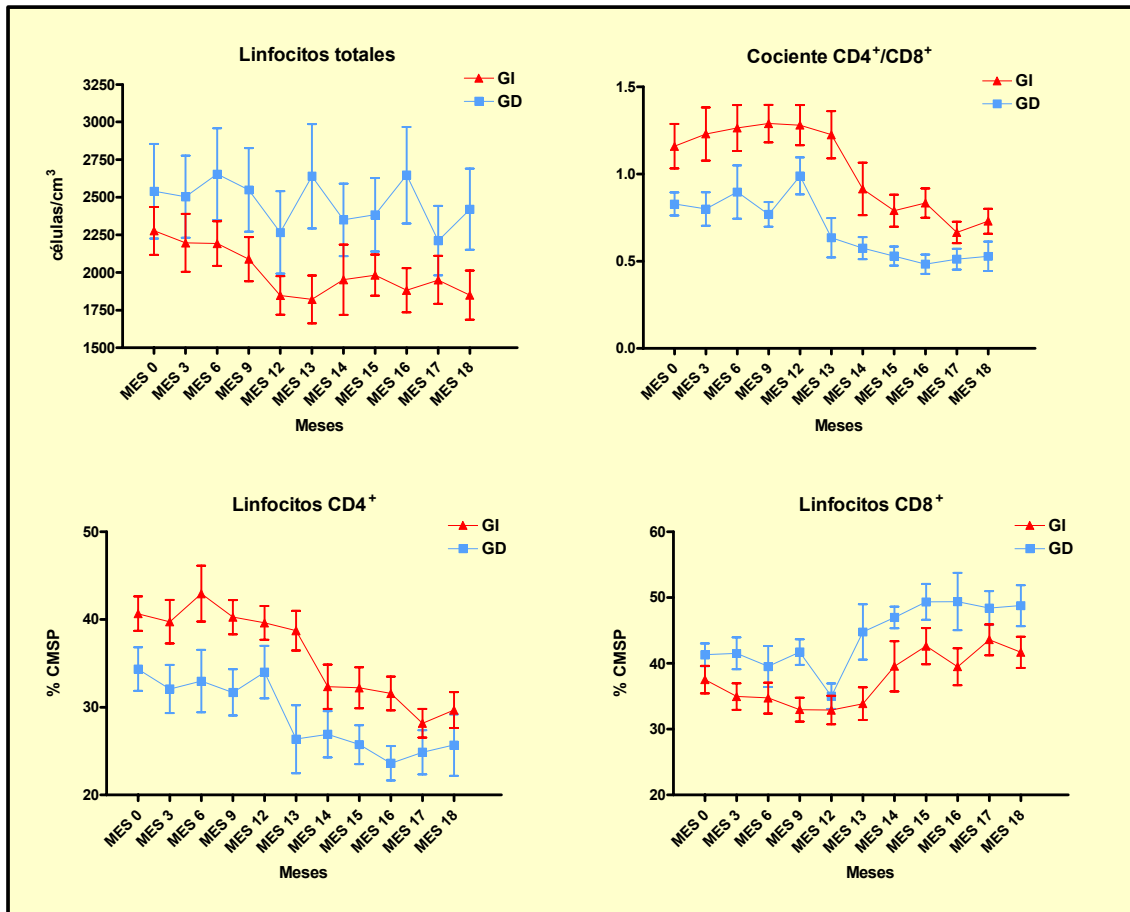


Figura R.2.7. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos totales, CD4⁺, CD8⁺ y su cociente. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

- Linfocitos CD4⁺CD28⁺: Esta subpoblación se mantuvo relativamente estable durante los periodos de tratamiento y parada, sin cambios significativos intra o intergrupos.
- Linfocitos CD4⁺CD28⁻CD57⁺: Al igual que la subpoblación anterior, se mantuvo estable sin cambios intra ni intergrupos significativos.
- Linfocitos CD4⁺CD38⁺: Se produjo un aumento paulatino de esta subpoblación tanto durante el periodo de tratamiento como tras la parada, significativo únicamente entre los meses 0 y 18 (p = 0,029 para GI y 0,027 para GD, respectivamente). En la comparación entre grupos entre los meses 12 y 13, en el GD aumentó y en el GI disminuyó (p = 0,038 para la diferencia).
- Linfocitos CD4⁺CD38⁺HLADR⁺: Como la subpoblación anterior, presentó un discreto aumento durante el periodo de tratamiento, no significativo en ninguno de los dos grupos. Sin embargo, cuando se comparó entre grupos, en el GD hubo un aumento en los 6 primeros meses y un descenso posterior, a la inversa que en el GI, siendo significativa la diferencia entre los gradientes 6-12 entre grupos (p = 0,032). Cuando se suspendió el tratamiento, en ambos grupos se produjo un aumento significativo, sobre todo en los tres primeros meses (p = 0,05 y 0,036 para la diferencia 12-15 en GI y GD, respectivamente). Este aumento fue significativamente más precoz y de mayor magnitud en el GD (p = 0,007 para la diferencia de gradientes entre los meses 12 y 13 entre grupos, p = 0,079 para la diferencia entre los meses 12 y 15 y p = 0,096 para la comparación entre las AUC por grupo tras la parada).
- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺: Esta subpoblación aumentó durante el periodo de tratamiento en ambos grupos, y de forma más significativa en el GD (p = 0,054 para la diferencia 0-6). Tras los 6 meses de parada se produjo una estabilización, de forma que en el GD siguió siendo significativamente mayor que de forma basal (p = 0,002 para la diferencia 0-18). Entre grupos no se encontraron cambios significativos.

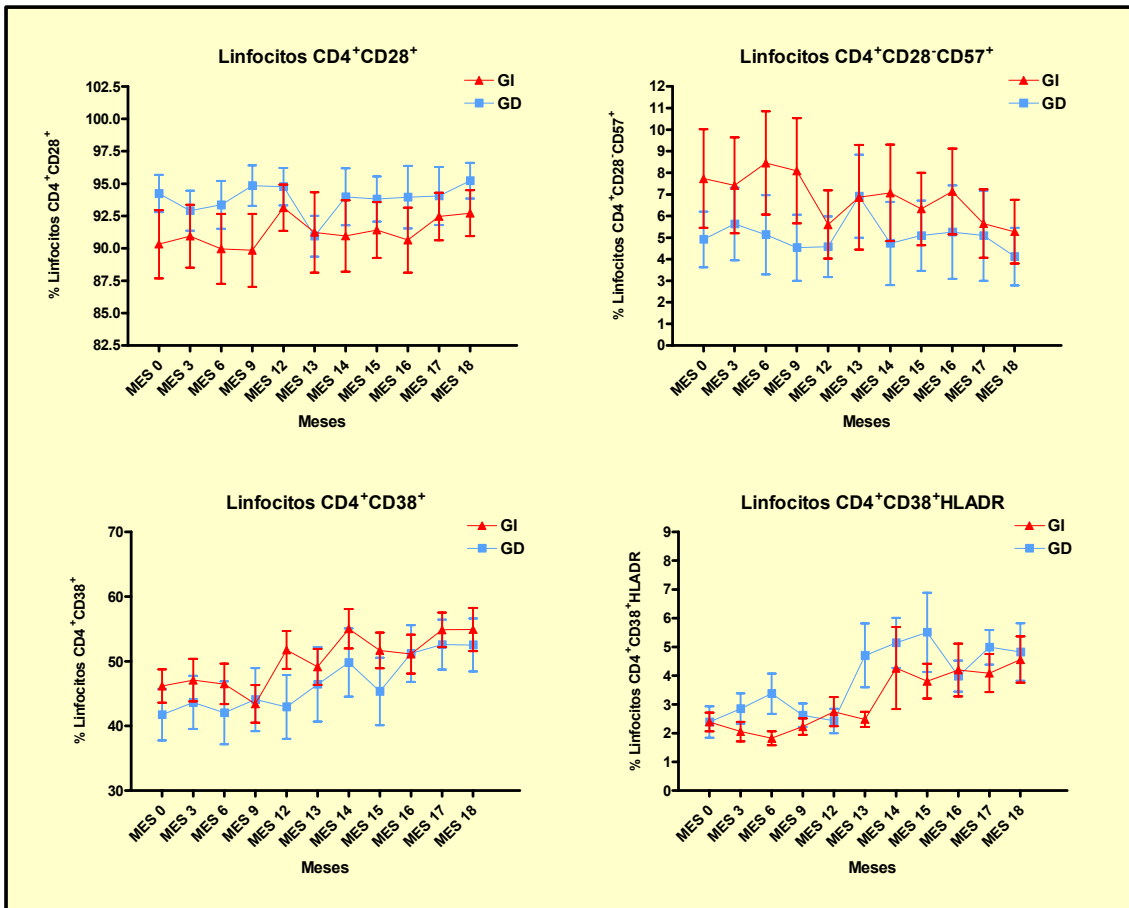


Figura R.2.8. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD28⁺CD57⁺, CD4⁺CD38⁺ y CD4⁺CD38⁺HLADR⁺. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: Basalmente existían diferencias entre grupos en esta población, de forma que el GD presentaba una tendencia significativa a tener una menor proporción de células con este marcaje *naïve* ($p = 0,076$). Estas diferencias se mantuvieron estables durante el periodo de tratamiento y el de parada, de forma que esta población aumentó en ambos grupos (aunque sólo con tendencia a la significación estadística en el GD ($p = 0,058$)).

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺: La subpoblación memoria de los linfocitos T CD4⁺ aumentó en ambos grupos durante el periodo de tratamiento ($p = 0,029$ y $0,023$ para la diferencia 0-6 en GI y GD, respectivamente), sin diferencias significativas entre

ellos. Posteriormente, tras la suspensión del TARGA, ambos grupos mantuvieron la proporción de esta población sin cambios significativos ni inter ni intragrupos.

- Linfocitos $CD4^+CD45RA^+CD62L^+$: Como en la subpoblación $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$, básicamente la proporción fue menor en el GD, y se produjo un aumento paulatino durante el periodo de tratamiento y parada manteniéndose las diferencias. El incremento global fue casi significativo en los dos grupos ($p = 0,079$ y $0,018$ en el gradiente 0-18 para GI y GD, respectivamente). No existieron diferencias significativas en los cambios intergrupos.

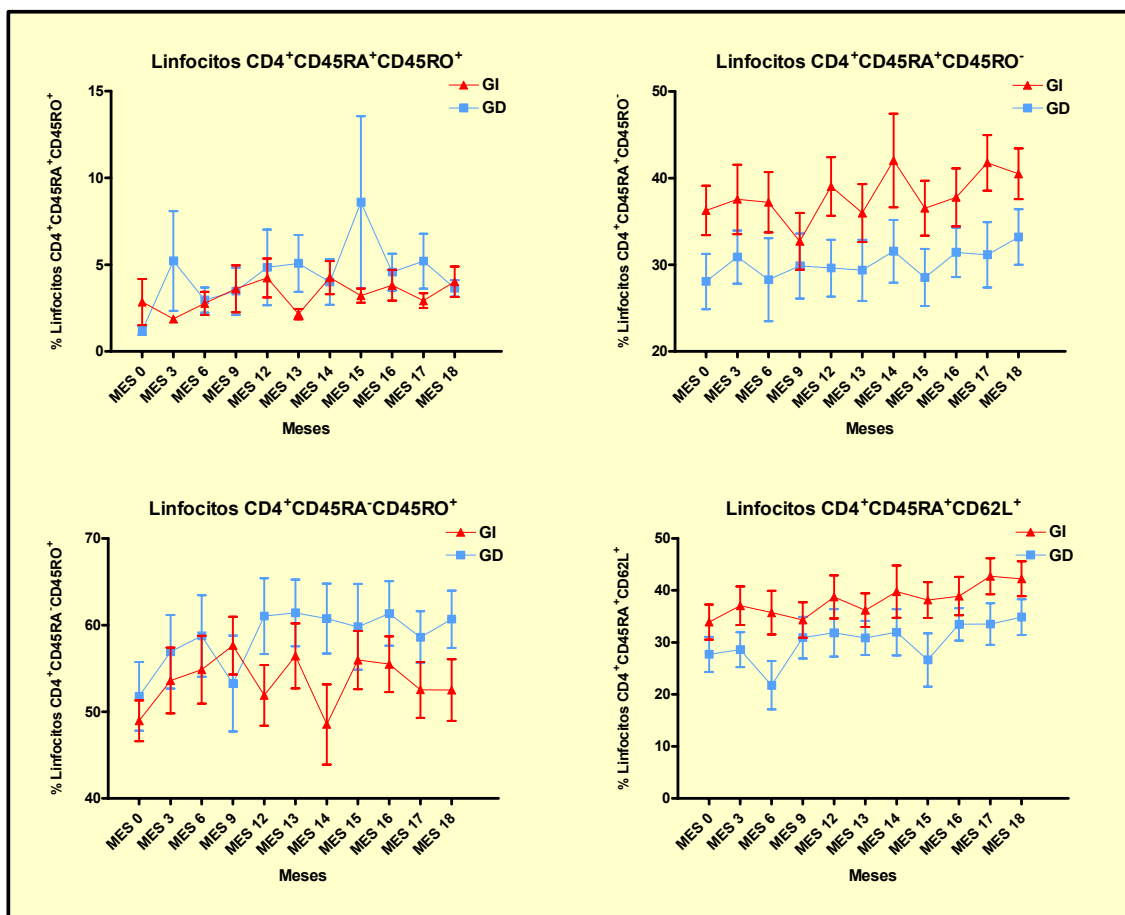


Figura R.2.9. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de $CD4^+CD45RA^+CD45RO^+$, $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$, $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$ y $CD4^+CD45RA^+CD62L^+$. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

- Linfocitos CD8⁺CD28⁺: Durante el periodo de tratamiento ambos grupos experimentaron un ascenso en esta población que sólo fue significativo en el GI ($p = 0,003$). Además, el GI presentó una mayor proporción de esta subpoblación en este periodo que el GD (AUC significativamente menor en el GD, $p = 0,034$). Tras la finalización del tratamiento se produjo un descenso significativo de esta población en los dos grupos ($p = 0,003$ y $0,013$ para la diferencia 12-15 en GI y GD, respectivamente), siendo más precoz y más marcado en el GD, aunque no se establecieron diferencias significativas. También se produjo entre los meses 0 y 3 un descenso en el GD significativo ($p = 0,001$) y significativamente diferente a la tendencia en el GI ($p = 0,003$ para la diferencia entre grupos).

- Linfocitos CD8⁺CD28⁻CD57⁺: Esta población se mantuvo durante los periodos de tratamiento y parada sin grandes cambios significativos ni intra ni intergrupos, superior en el GD, y con un aumento en el mes 3 en el GD significativamente diferente al GI ($p = 0,005$).

- Linfocitos CD8⁺CD38⁺: Basalmente existían diferencias en estas poblaciones, con una menor proporción en el GD ($p = 0,033$), pero con un aumento significativo en el mes 3 en ese grupo ($p = 0,007$), y significativamente diferente al GI ($p = 0,006$). Posteriormente, durante la fase de tratamiento, se produjo un aumento de esta subpoblación en ambos grupos (significativo en GD, $p = 0,003$), sin diferencias entre ellos. Y tras la suspensión del TARGA un ascenso todavía mayor, fundamentalmente en los tres primeros meses ($p < 0,001$ y $0,008$ en GI y GD respectivamente), más precoz en el GD, pero sin diferencias significativas con GI.

- Linfocitos CD8⁺CD38⁺HLADR⁺: Como en el caso anterior, se produjo un aumento pequeño aunque significativo durante la fase de tratamiento en ambos grupos ($p = 0,05$ y $0,006$ para la diferencia 0-12 en GI y GD respectivamente), con un incremento muy superior tras la suspensión del mismo, también significativo en ambos grupos ($p < 0,001$ y $0,001$ en GI y GD), fundamentalmente en los 3 primeros meses, y de forma más precoz y marcada en GD, aunque sin diferencias significativas entre grupos (AUC menor en GI, $p = 0,096$).

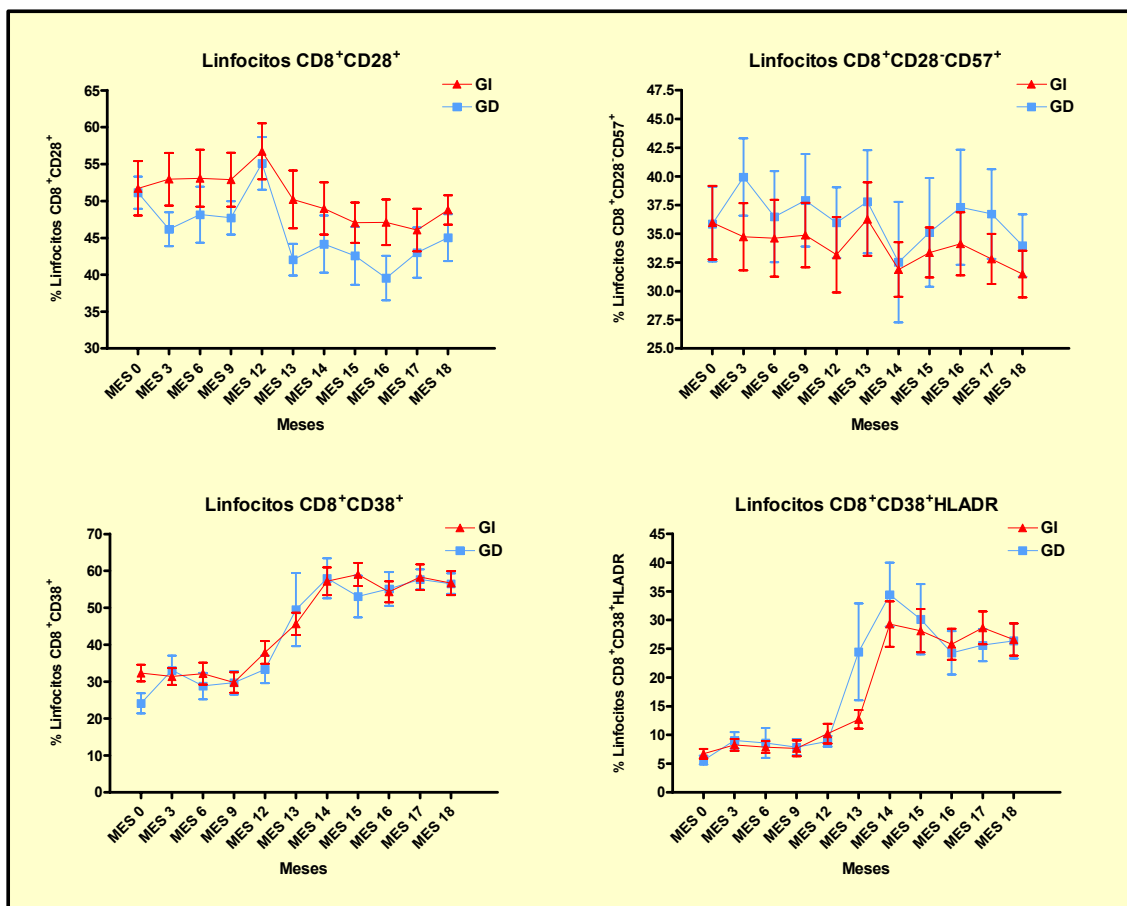


Figura R.2.10. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos CD8⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁻CD57⁺, CD8⁺CD38⁺ y CD8⁺CD38⁺HLADR⁺. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: Esta subpoblación basalmente presentó una tendencia a ser significativamente menor en GD que GI ($p = 0,053$), pero posteriormente aumentó durante el periodo de tratamiento en ambos grupos, aunque sólo de forma significativa en el GD ($p = 0,83$ y $0,007$ para GI y GD respectivamente entre los meses 0 y 12), sin hallar diferencias significativas entre grupos. En el periodo de parada de tratamiento se mantuvo estable, sin detectarse cambios significativos ni intra ni intergrupos.

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: La subpoblación con este marcaje se mantuvo sin cambios significativos durante el periodo de tratamiento ni intra ni intergrupos. Tras la suspensión del tratamiento se produjo un descenso significativo en ambos grupos, fundamentalmente en los 3 primeros meses ($p < 0,001$ para la diferencia 12-18 en ambos

grupos), más precoz y marcado en el GD, pero sin llegar a presentar diferencias significativas entre grupos.

- Linfocitos $CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$: Durante el periodo de tratamiento se produjo en ambos grupos un aumento con tendencia a la significación estadística en esta subpoblación ($p = 0,098$ y $0,079$ para GI y GD, respectivamente), sin diferencias significativas entre grupos. En el periodo de parada aumentó en ambos grupos de forma significativa ($p < 0,001$ y $0,001$ en GI y GD, respectivamente), sobre todo hasta el mes 15, de forma más marcada en GD.

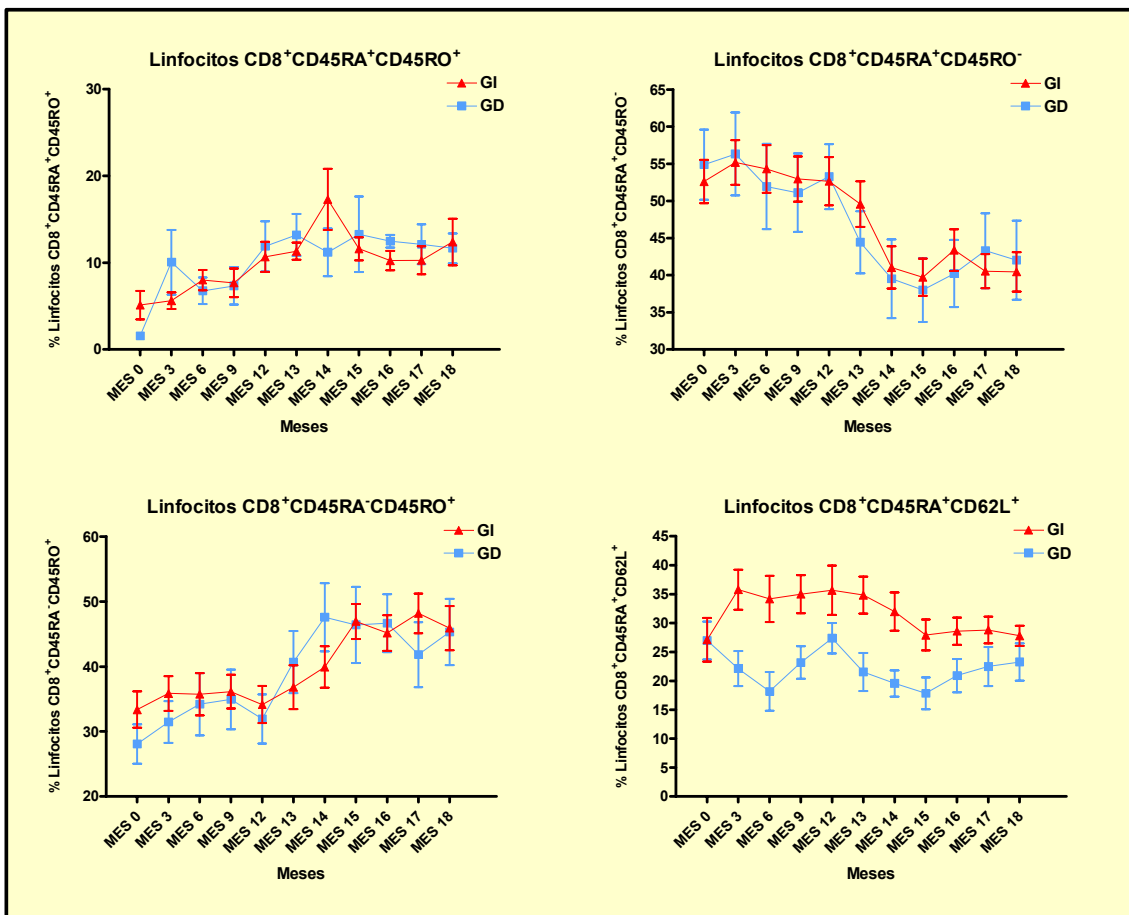


Figura R.2.11. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos $CD8^+CD45RA^+CD45RO^+$, $CD8^+CD45RA^+CD45RO^-$, $CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$ y $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺: Esta población, aunque basalmente similar, durante todo el periodo de tratamiento fue significativamente menor en el GD que en el GI ($p < 0,05$ en los meses 3, 6 y 9). Es por ello que las tendencias que presentaron durante este periodo fueron diferentes. Mientras que en el GI se produjo un aumento significativo entre los meses 0 y 3 ($p = 0,026$), en el GD se produjo un descenso también significativo ($p = 0,028$), siendo por tanto la diferencia de gradientes significativamente diferente ($p = 0,009$). Posteriormente, el GI se mantuvo estable y el GD descendió hasta el mes 6 para luego ascender hasta el mes 12, pero siempre por debajo del GI. Por ello, las AUC en este periodo fueron significativamente diferentes ($p = 0,016$). Tras la interrupción, ambas poblaciones disminuyeron inicialmente hasta el mes 15 de forma significativa ($p = 0,028$ y $0,09$ para GI y GD, respectivamente), de forma más marcada en el GD, manteniéndose después. Durante este periodo no se hallaron diferencias significativas entre grupos.

- Linfocitos CD4⁺CXCR4⁺: En ambos grupos se produjo un aumento de esta subpoblación, únicamente significativo en el GI ($p = 0,058$ y $p = 0,56$ para GI y GD, respectivamente), pero sin diferencias entre grupos. En el periodo de interrupción se produjo una tendencia al descenso en esta población, pero no significativo y sin diferencias entre grupos.

- Linfocitos CD4⁺CCR5⁺: Basalmente el GD presentó valores significativamente menores en esta población que el GI ($p = 0,031$), igualándose durante el periodo de tratamiento, de forma que en este grupo existió un aumento significativo ($p = 0,045$). Durante el periodo de suspensión del tratamiento no se produjeron cambios significativos ni inter ni intragrupo, aunque se elevó en el GD de forma más precoz.

- Linfocitos CD8⁺CXCR4⁺: Ambos grupos se comportaron de forma similar tanto durante el periodo de tratamiento, aumentando en ambos aunque sólo de forma significativa en el GI ($p = 0,021$ y $0,33$ en GI y GD, respectivamente), como en el periodo de parada, con un descenso en ambos grupos ($p = 0,027$ y $0,09$ en GI y GD, respectivamente). No se hallaron diferencias significativas en las tendencias entre grupos.

- Linfocitos CD8⁺CCR5⁺: Se produjo en esta población un aumento durante el periodo de tratamiento en ambos grupos, pero sólo significativo en el GD ($p = 0,76$ y $0,038$ para

GI y GD), sin diferencias entre grupos. Posteriormente, durante el periodo de interrupción, ambos grupos también aumentaron, pero de forma mayor y más precoz en el GD. No se establecieron sin embargo diferencias significativas entre grupos.

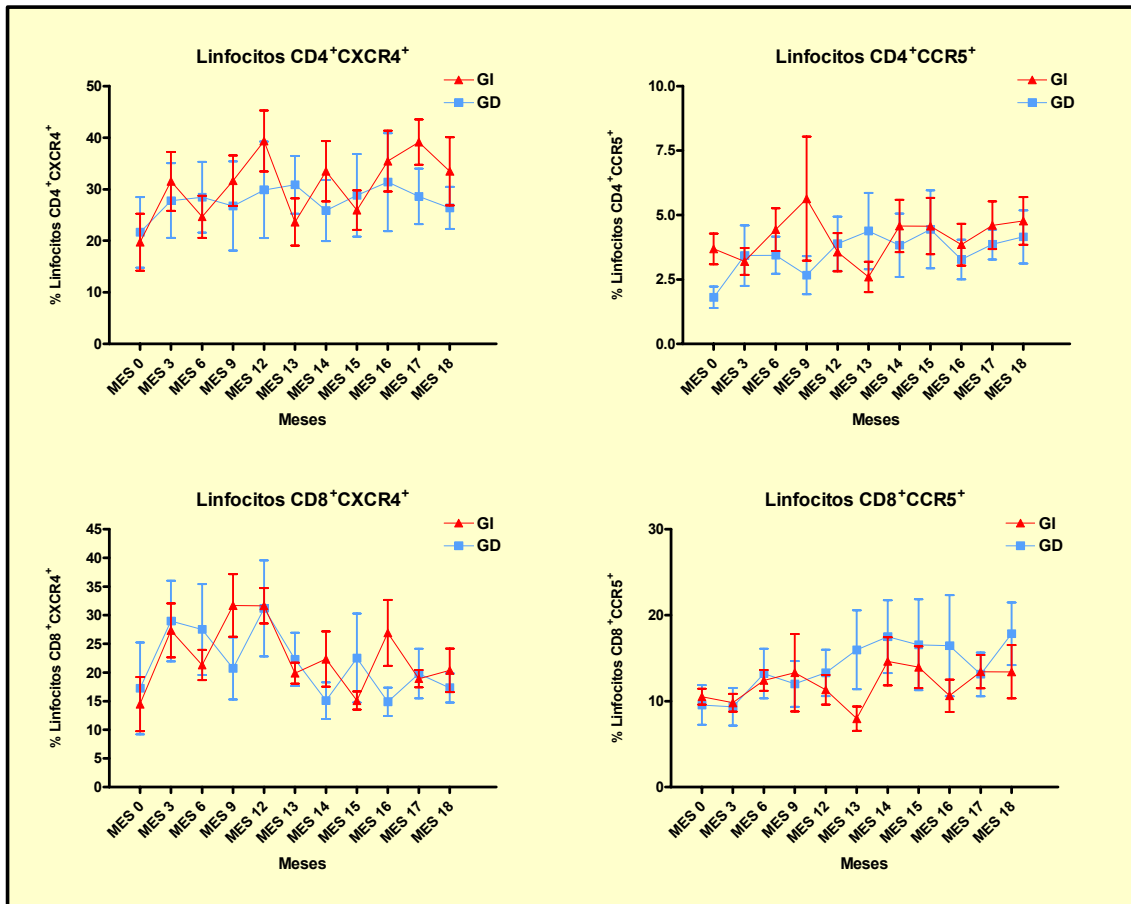


Figura R.2.12. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos CD4⁺CXCR4⁺, CD4⁺CCR5⁺, CD8⁺CXCR4⁺ y CD8⁺CCR5⁺. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

- Linfocitos CD4⁺CD25⁺: En ambos grupos aumentó durante tratamiento y se mantuvo sin TARGA, pero sin hallar diferencias significativas intra o intergrupos.

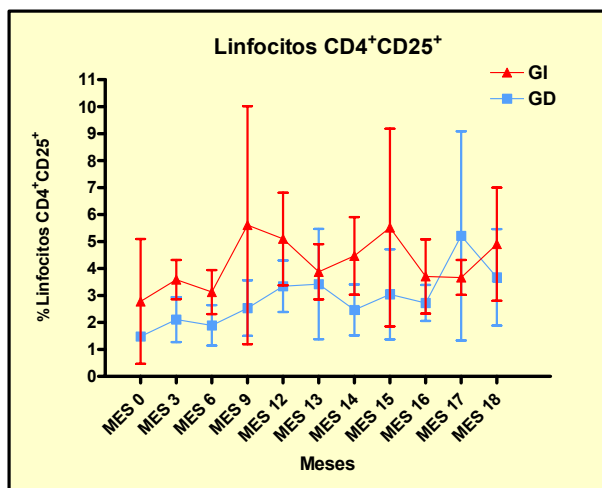


Figura R.2.13. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de la subpoblación celular de linfocitos CD4+CD25+. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

2.2.3.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación

Los cambios experimentados en la proliferación de las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo *naïve* se pueden observar en la **Figura R.2.14.** y las **Tablas R.2.9-R.2.11.**

- CD4⁺CD45RA⁺Ki-67⁺: Esta población era mayor de forma basal en el GD ($p = 0,066$), y aumentó de forma significativa durante la fase de tratamiento en el GI ($p = 0,003$). Durante la fase sin TARGA disminuyó en ambos grupos de forma no significativa al final del 6^o mes, pero en el GD se produjo un aumento inicial hasta el mes 15, aunque no significativo. No se hallaron diferencias entre grupos en los cambios.

- CD8⁺CD45RA⁺Ki-67⁺: Como la población anterior, aumentó durante el periodo de tratamiento pero sólo de forma significativa en el GI ($p = 0,003$ y $0,46$ para GI y GD respectivamente), teniendo el aumento del GI respecto al GD tendencia a ser significativamente mayor ($p = 0,079$). Al parar el tratamiento los dos primeros meses se elevó esta población en los dos grupos, más en el GD, sin llegar a ser significativo, para después bajar y mantenerse similar al mes 12 en el GI y ser superior en el GD ($p = 0,014$), presentando tendencia a la significación estadística la diferencia de gradientes 12-18 entre grupos ($p = 0,081$).

Tabla R.2.11. Áreas netas bajo la curva de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en proliferación durante el periodo con y sin tratamiento (meses 12-18). P* Diferencia 0-12 entre grupos; P ** Diferencia 12-18 entre grupos. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable

Subpoblación linfocitaria en proliferación	Grupo Indetectable (<200 copias/mL)		Grupo Detectable (≥200 copias/mL)		P*	P**
	Meses 0-12	Meses 12-18	Meses 0-12	Meses 12-18		
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	4,87 ± 7,19	10,81 ± 6,23	13,99 ± 10,9	20,46 ± 17,2	0,017	0,12
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	3,62 ± 6,74	-2,86 ± 9,55	8,22 ± 8,05	1,19 ± 4,13	0,13	0,22
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	6,06 ± 6,98	8,43 ± 10,86	7,05 ± 8,76	22,29 ± 26,37	0,75	0,08
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	4,31 ± 9,49	-1,98 ± 3,66	4,86 ± 10,55	4,42 ± 14,14	0,89	0,11
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	4,7 ± 11,17	-0,02 ± 12,8	5,22 ± 10,19	8,1 ± 22,92	0,91	0,27

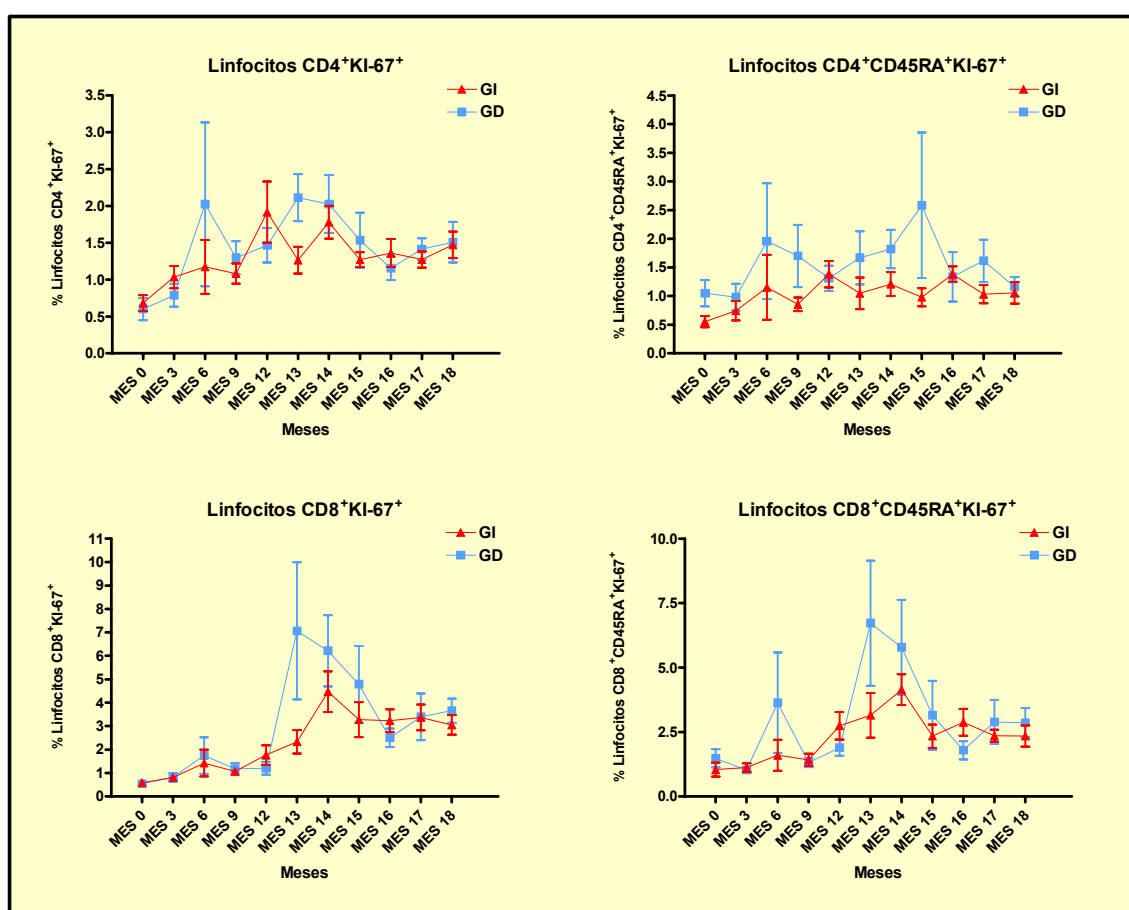


Figura R.2.14. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) e interrupción (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ CD45RA⁺ en proliferación (con el marcaje Ki-67⁺). Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

2.2.3.3. Respuestas linfoproliferativas

Los cambios experimentados en las respuestas linfoproliferativas durante los periodos de tratamiento e interrupción en el GD y el GI se pueden observar en las Figuras R.2.15.-R.2.17. o en las Tablas R.2.12.-R.2.14.

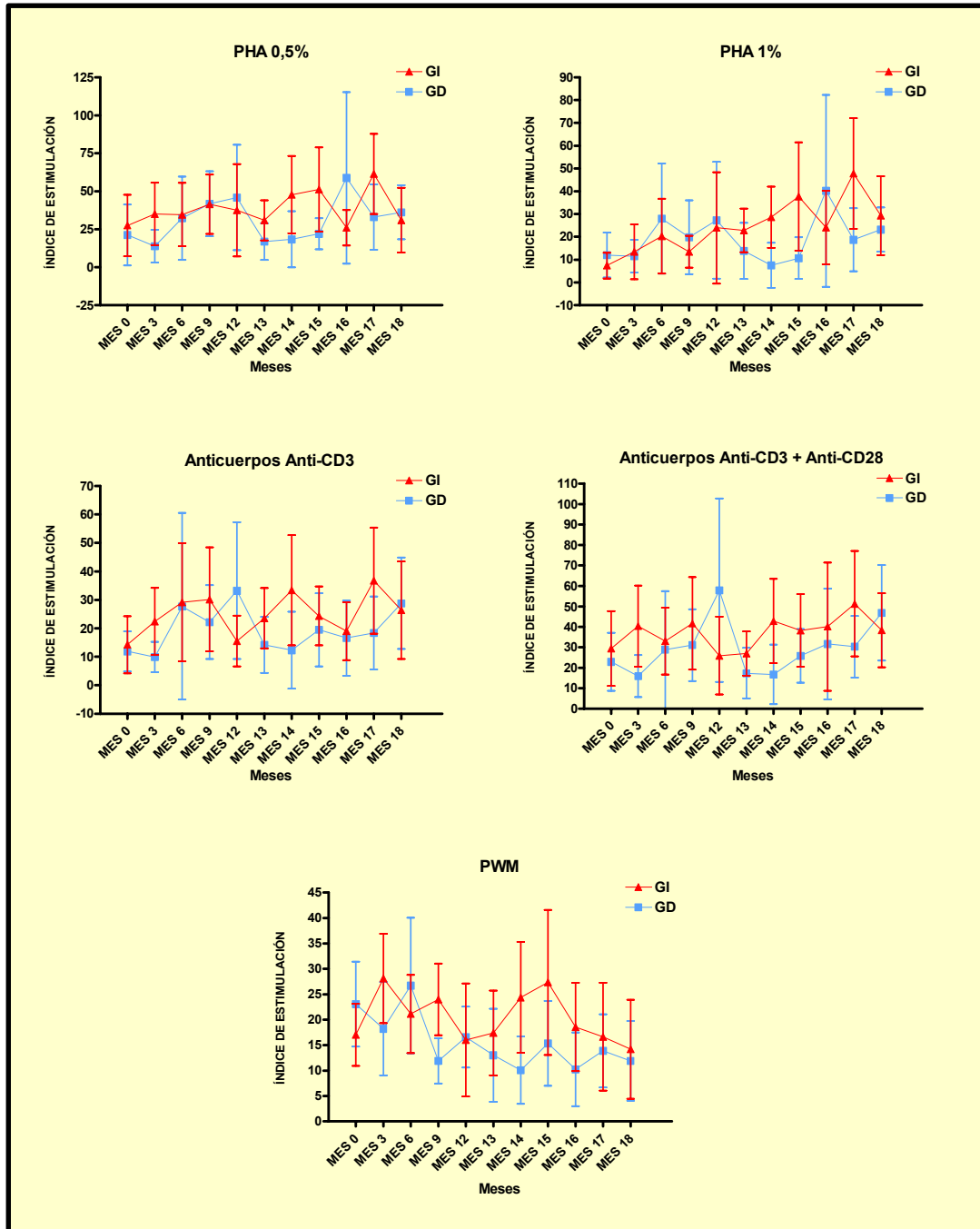


Figura R.2.15. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) e interrupción (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a mitógenos. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL; PHA: Fitohemaglutinina; PWM: Mitógeno Pokeweed)

Tabla R.2.12. Evolución de las respuestas linfoproliferativas durante el periodo de tratamiento y tras su interrupción en los grupos detectable e indetectable en función del límite de 200 copias/mL. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable

Índice de estimulación	Grupo Indetectable (<200 copias/mL)			Grupo Detectable (≥200 copias/mL)		
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 0	Mes 12	P
Fitoheماغlutinina 0,5	27,44 ± 31,97	37,5 ± 50,32	0,6	21,22 ± 26,09	45,86 ± 45,11	0,24
Fitoheماغlutinina 1%	7,38 ± 8,89	23,93 ± 40,39	0,18	11,98 ± 12,84	27,24 ± 33,4	0,29
Anticuerpo anti-CD3	12,24 ± 15,78	15,51 ± 14,77	0,92	11,89 ± 9,19	33,25 ± 31,23	0,089
AntiCD3 + antiCD28	29,42 ± 28,72	25,93 ± 31,53	0,76	22,89 ± 18,44	57,83 ± 53,58	0,17
Mitógeno Pokeweed	17,02 ± 10,57	16 ± 18,37	0,35	23,07 ± 10,88	16,6 ± 7,77	0,13
Toxóide Tetánico	4,87 ± 9,66	1,95 ± 1,44	0,88	4,24 ± 6,53	1,86 ± 1,3	0,27
Citomegalovirus	2,7 ± 1,23	1,93 ± 1,29	0,19	1,67 ± 0,62	2,34 ± 2,46	0,69
gp160	1,71 ± 1,32	1,48 ± 0,82	0,64	2,5 ± 2,49	1,9 ± 1,51	0,55
p24	2,94 ± 2,75	1,66 ± 1,34	0,28	5,73 ± 8,02	2,02 ± 1,34	0,21

Tabla R.2.13. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de las respuestas linfoproliferativas entre los grupos detectable e indetectable con límite de 200 copias/mL. (PHA: Fitoheماغlutinina; PWM: Mitógeno pokeweed; TT: Toxóide tetánico; CMV: Citomegalovirus)

Respuestas linfoproliferativas	Mes 0 (basal)		Periodo tratamiento (meses 0-12)		Periodo sin tratamiento (meses 12-18)	
	P	P	P	P	P	P
PHA 0,5	0,64	0,69			0,66	
PHA 1%	0,34	0,7			0,56	
Ac anti-CD3	0,69	0,14			0,19	
AntiCD3 -antiCD28	0,56	0,16			0,32	
PWM	0,2	0,61			0,76	
TT	0,87	0,27			0,56	
CMV	0,031	0,25			0,43	
gp160	0,33	0,41			0,7	
p24	0,34	0,26			0,46	

Tabla R.2.14. Áreas netas bajo la curva de las respuestas linfoproliferativas durante el periodo con y sin tratamiento (meses 12-18). Se expresa la media y la desviación típica de cada variable. P* Diferencia 0-12 entre grupos; P ** Diferencia 12-18 entre grupos

Respuestas linfoproliferativas	Grupo Indetectable (<200 copias/mL)		Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL)		P*	P**
	Meses 0-12	Meses 12-18	Meses 0-12	Meses 12-18		
Fitoheamaglutinina 0,5	43,47 ± 293,25	25,08 ± 270,8	72,91 ± 280,33	-90,46 ± 235,49	0,8	0,28
Fitoheamaglutinina 1%	76,31 ± 140,13	35,52 ± 210,75	88,47 ± 207,64	-56,34 ± 172,79	0,86	0,26
Anticuerpo anti-CD3	78,23 ± 183,38	47,85 ± 103,76	131,78 ± 162,2	-87,52 ± 168,35	0,46	0,02
AntiCD3 + antiCD28	40,85 ± 256,65	69,98 ± 213,64	124,28 ± 241,63	-147,13 ± 281,58	0,42	0,039
Mitógeno Pokeweed	50,39 ± 115,68	24,73 ± 119,09	-37,17 ± 120,79	-22,83 ± 44,69	0,077	0,24
Toxoide Tetánico	-12,68 ± 103,74	7,09 ± 24,03	-24,03 ± 56,82	0,78 ± 15,82	0,75	0,47
Citomegalovirus	-8,04 ± 37,66	11,08 ± 11,24	11 ± 27,4	1,07 ± 12,52	0,18	0,048
gp160	2,22 ± 21,39	1,85 ± 6,99	1,95 ± 30,74	5,51 ± 19,45	0,98	0,58
p24	1,26 ± 40,35	7,33 ± 17,08	-29,8 ± 78,23	4,82 ± 16,2	0,19	0,72

- Respuestas linfoproliferativas a mitógenos:

- Fitoheamaglutinina al 0,5%: Se produjo en ambos grupos durante el periodo de tratamiento un aumento en las respuestas linfoproliferativas a PHA 0,5%, no significativo. Durante este periodo no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Tras la parada de tratamiento se produjo una tendencia a disminuir las respuestas en ambos grupos (no significativo), pero el GD presentó un mayor descenso durante los 3 primeros meses (12-15) (no significativo). Sin embargo, no se pudieron hallar diferencias significativas entre los grupos.

- Fitoheamaglutinina al 1%: La evolución de las respuestas frente a PHA 1% fueron similares a las obtenidas con PHA 0,5%. Se produjo durante el periodo de tratamiento un aumento no significativo en ambos grupos, sólo con tendencia a la significación estadística en el GI ($p = 0,071$ para el aumento entre los meses 0 y 6), sin diferencias entre grupos. Posteriormente, en el periodo sin tratamiento, hubo una tendencia a disminuir las respuestas en el GD, más marcada en los primeros 3 meses, y un mantenimiento en el GI, sin hallar diferencias significativas entre grupos.

- Anticuerpos anti-CD3: De forma paralela a las anteriores, se produjo un aumento en ambos grupos con tendencia a la significación estadística ($p = 0,06$ para la diferencia 0-9 en ambos grupos), sin existir diferencias entre grupos. Tras la retirada de

tratamiento, en el GD disminuyeron las respuestas, aunque no de forma significativa intragrupo, pero sí de forma superior al GI ($p = 0,045$ para la diferencia de gradientes entre los meses 12-14). De hecho, el AUC tras la parada fue significativamente menor en el GD que el GI ($p = 0,02$).

- Anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28: Durante el periodo de tratamiento existió una tendencia al aumento en el GD y un mantenimiento en el GI, siendo la diferencia significativa entre grupos para el periodo entre los meses 3 y 9 ($p = 0,043$) por ser mayor el aumento en el GD. Durante la interrupción, igual que las respuestas frente a anti-CD3 solo, la tendencia en el GD fue al descenso, sobre todo en los primeros 2 meses (significativo entre mes 12 y 13, $p = 0,028$), mientras que en el GI fue al aumento (no significativo). Al comparar entre grupos, estas tendencias fueron significativamente diferentes, tanto en el AUC tras la interrupción, menor en el GD ($p = 0,039$), como en la diferencia de gradientes ($p = 0,008$ para la diferencia entre los meses 12 y 13).

- Mitógeno Pokeweed: A diferencia de los anteriores, se produjo un descenso aunque no significativo durante el periodo de tratamiento, mayor en el GD. Por ello, el AUC en el GD fue menor que en el GI, con tendencia a la significación estadística ($p = 0,077$), y los gradientes 0-12 fueron significativamente diferentes entre grupos, creciente en GI y decreciente en GD ($p < 0,001$). Durante la interrupción, en el GD se produjo una disminución de las respuestas, sobre todo los primero dos meses, aunque no significativa, mientras que el GI se mantuvieron e incluso aumentaron en los primeros 3 meses, de forma tampoco significativa. Al comparar entre grupos, no se hallaron diferencias significativas.

- Respuestas linfoproliferativas a antígenos comunes:

- Toxoide tetánico: Durante el periodo de TARGA se produjeron en ambos grupos descensos no significativos, sin diferencias entre grupos salvo que en el GD entre los meses 9 y 12 se produjo un ascenso significativo ($p = 0,017$) que no hubo en el GI, significativamente diferente entre grupos ($p = 0,034$). Tras la interrupción se produjo un

aumento en ambos grupos transitorio y no significativo entre los meses 12 y 14-15, más precoz en el GD, y sin diferencias significativas entre grupos.

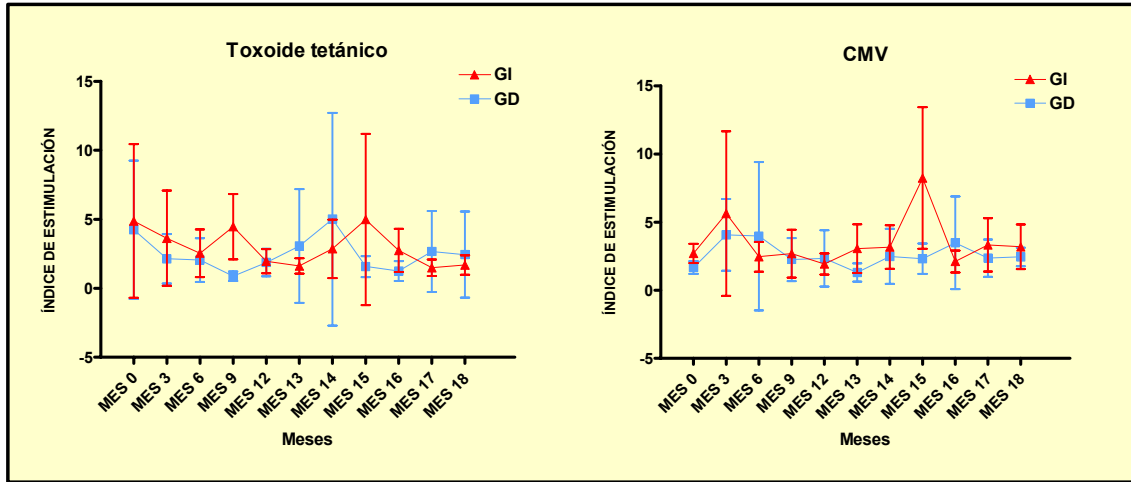


Figura R.2.16. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a antígenos comunes. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL; CMV: Citomegalovirus)

- Antígenos del CMV: Basalmente las respuestas proliferativas frente a antígenos del CMV fueron mayores de forma significativa en el GI ($p = 0,031$). Durante el periodo de tratamiento presentaron una tendencia a disminuir, aunque sólo se halló un descenso significativo en el GI entre los meses 6 y 12 ($p = 0,043$). No se hallaron diferencias significativas intergrupos en estas respuestas. Al suspender el tratamiento, existió una tendencia en el GI al aumento y en el GD a mantenerse estable. Esta diferencia fue significativa entre grupos de forma precoz, entre los meses 12 y 13 ($p = 0,052$), y globalmente, de forma que el AUC en el GI fue significativamente mayor ($p = 0,048$) que en el GD.

- Respuestas linfoproliferativas a proteínas del VIH.
 - gp160: El GD presentó tanto frente a gp160 como p24 un mayor rango de respuestas. Durante la fase de tratamiento, no se produjeron cambios significativos en las respuestas ni intra ni intergrupos, excepto entre los meses 6 y 9, en que en el GD hubo un descenso y en el GI un aumento, no significativos pero que comparados fueron

significativamente diferentes ($p = 0,026$). Tras la interrupción el GD presentó una tendencia no significativa a presentar respuestas mayores.

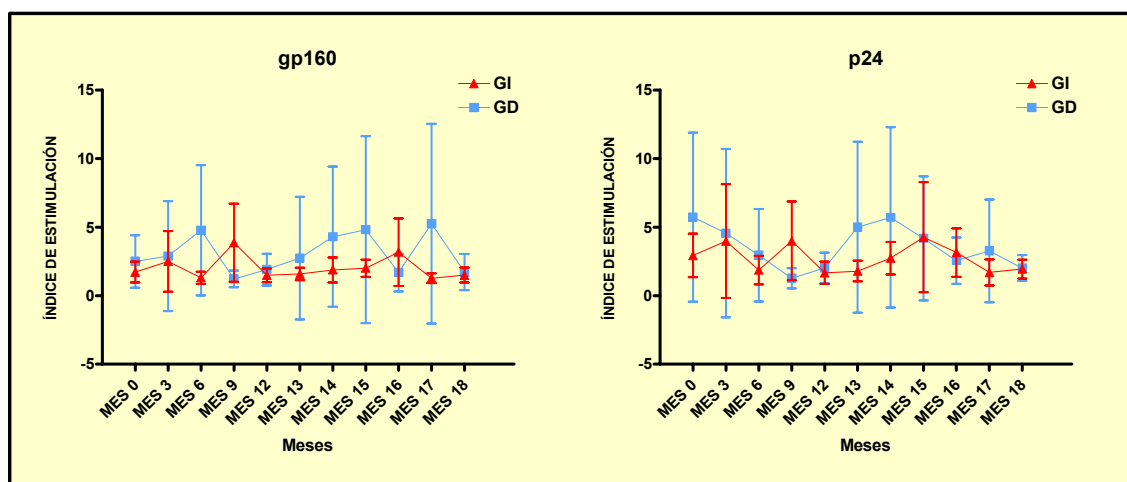


Figura R.2.17. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a proteínas del VIH. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

- p24: Durante el periodo de tratamiento presentaron ambos grupos una disminución no significativa de las respuestas frente a p24, mayor en el GD ($p = 0,051$ para la diferencia de gradientes entre los meses 0 y 9 entre grupos). Tras la interrupción se produjo un aumento transitorio no significativo en las respuestas hasta el mes 15, mayor y más precoz en el GD, pero sin existir diferencias significativas entre grupos.

2.2.3.4. Respuestas $CD8^+$ específicas frente al VIH

Los cambios experimentados en las respuestas $CD8^+$ específicas anti-VIH en los GD y GI se pueden observar en la Figura R.2.18. o en las Tablas R.2.15-R.2.16.

- Respuestas $CD8^+$ específicas frente al VIH totales (magnitud de la respuesta): En general, el GD presentó durante todo el periodo de tratamiento niveles más elevados de respuestas $CD8^+$ específicas contra el VIH, aunque sólo alcanzaron la significación estadística las diferencias en alguna determinación en concreto como en el mes 9 ($p = 0,022$). Las tendencias en este periodo dentro de cada grupo fueron similares, sin cambios significativos ni

intra ni intergrupos. Tras la interrupción, en el GD las respuestas se mantuvieron, y en el GI aumentaron hasta igualarse con el GD en el mes 15, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística intra o intergrupos.

- Número de péptidos reconocidos (amplitud de la respuesta): El número de péptidos reconocidos se mantuvo relativamente estable durante los periodos de tratamiento y parada en ambos grupos, con tendencia a un aumento tras la interrupción pero sin cambios significativos ni intra ni intergrupos.

- Cociente respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH/péptidos: El GD presentó durante todo el periodo de tratamiento niveles de respuesta mayores que el GI, alcanzando casi la significación estadística en los meses 0 ($p = 0,061$) y 9 ($p = 0,049$). En este periodo de tratamiento, la evolución en ambos grupos fue paralela, sin cambios significativos intra o intergrupos. Tras la suspensión del tratamiento, el GD mantuvo sus respuestas, mientras que el GI las aumentó ($p = 0,09$) hasta alcanzar el nivel del GD, siendo la diferencia de tendencias significativa ($p = 0,045$ la diferencia de gradientes entre los meses 9-18).

- Respuestas específicas anti-p24: Aunque sin ser estadísticamente significativo, el GD presentó durante todo el periodo de tratamiento un mayor nivel de respuestas p24 que el GI, manteniéndose estables durante el periodo de tratamiento sin cambios intra ni intergrupos. Tras la suspensión, se produjo un aumento no significativo en ambos grupos, sin diferencias entre ellos.

- Respuestas específicas anti-small: Durante el periodo de tratamiento el GD presentó en todo momento mayores respuestas anti-small que el GI, alcanzando la significación estadística en prácticamente todas las determinaciones ($p = 0,07$, $0,08$ y $0,056$ en los meses 0, 6 y 9 respectivamente), manteniéndose en ambos grupos estable durante este periodo sin diferencias intergrupos o intragrupos. Tras la interrupción existió una tendencia no significativa en ambos grupos al aumento de estas respuestas, sin diferencias entre grupos.

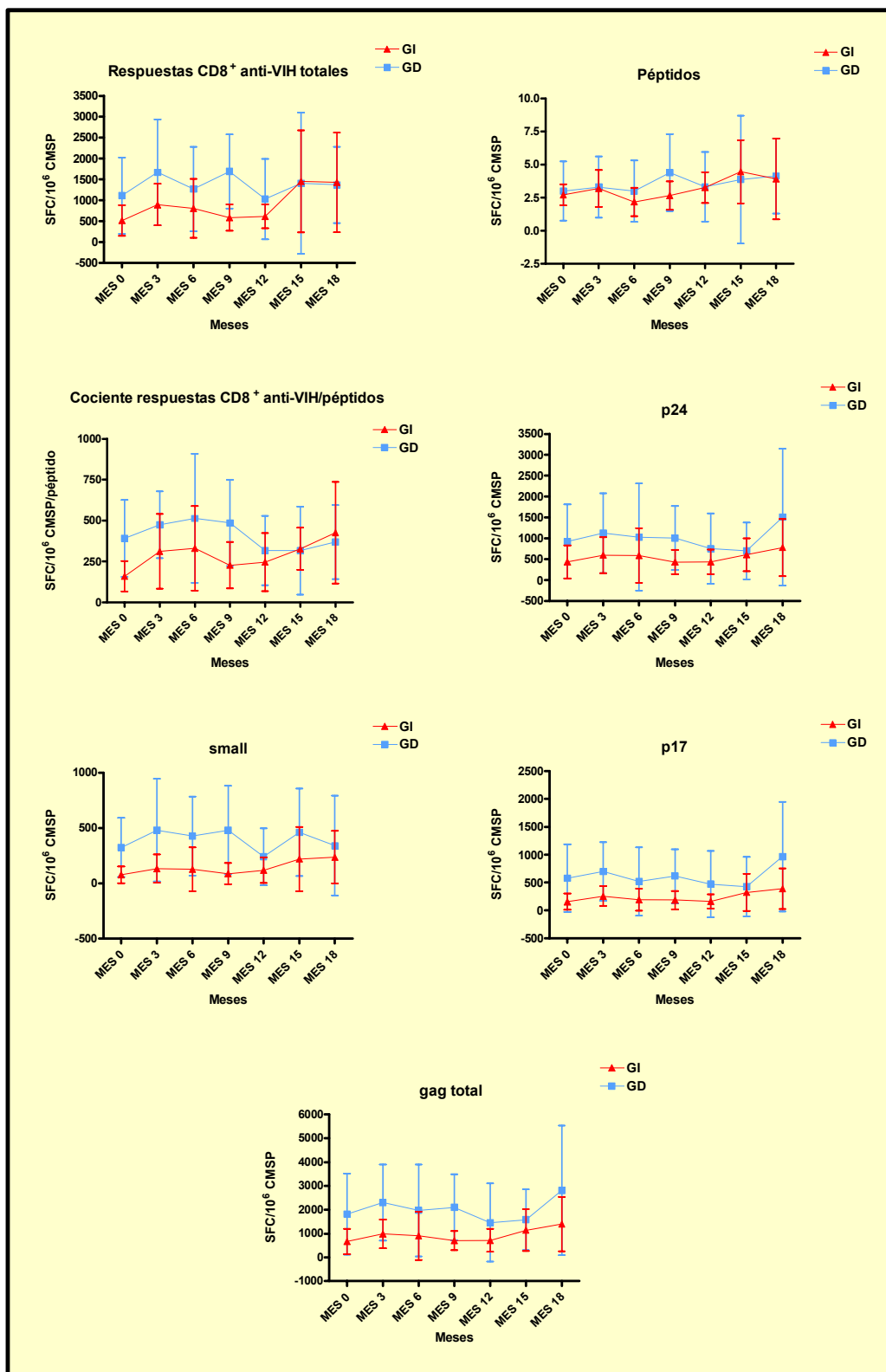


Figura R.2.18. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas específicas CD8⁺ frente a diferentes antígenos del VIH. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL; SFC/10⁶ CMSP: Células formadoras de Spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.2.15. Evolución de las respuestas CD8⁺ específicas anti-VIH durante el periodo de tratamiento y tras su interrupción en los grupos detectable e indetectable en función del límite de 200 copias/mL. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable en SFC/10⁶ CMSP (células formadoras de spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

Respuestas CD8 ⁺ anti-VIH	Grupo Indetectable (<200 copias/mL)				Grupo Detectable (≥200 copias/mL)			
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18
Respuesta CD8 ⁺ total	513,28 ± 636,53	613,45 ± 422,61	0,95	1428,69 ± 1967,25	1111,22 ± 1188,63	1029,78 ± 1253,28	0,73	1368,43 ± 986,38
Nº péptidos	2,71 ± 1,38	3,27 ± 1,74	0,47	3,92 ± 5,07	3 ± 2,91	3,33 ± 3,43	0,73	4,14 ± 3,08
Respuestas CD8 ⁺ /péptidos	159,78 ± 158,84	246,36 ± 264,98	0,94	426,38 ± 512,59	391,33 ± 306,47	316,78 ± 275,49	0,45	368,57 ± 244,33
p24	433,36 ± 676,73	433,18 ± 440,26	0,73	776,92 ± 1130,87	921,44 ± 1159,02	749,55 ± 1099,42	0,6	1505 ± 1770,82
Small	77,78 ± 131,33	119,09 ± 172,46	0,86	236,46 ± 393,22	325,44 ± 348,86	241,22 ± 334,35	0,52	341,86 ± 488,87
p17	154,57 ± 249,74	161,18 ± 187,85	0,52	386,85 ± 607,13	575,33 ± 789	470,22 ± 774,9	0,78	964,14 ± 1064,69
Gag total	665,79 ± 917,2	713,36 ± 712,31	0,92	1400,15 ± 1894,63	1822,11 ± 2213,328	1460,89 ± 2132,56	0,64	2810,57 ± 2945,37

Tabla R.2.16. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de las respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH entre los grupos detectable e indetectable con límite de 200 copias/mL

Respuestas CD8 ⁺ anti-VIH	Mes 0 (basal)		Periodo tratamiento (meses 0-12)		Periodo sin tratamiento (meses 12-18)	
	P	P	P	P	P	P
Respuesta CD8 ⁺ total	0,19	0,75	0,75	0,32		
Nº péptidos	0,75	0,6	0,6	0,9		
Respuestas CD8 ⁺ /péptidos	0,061	0,44	0,44	0,17		
p24	0,21	0,84	0,84	0,55		
Small	0,07	0,54	0,54	0,34		
p17	0,15	0,63	0,63	0,88		
Gag total	0,17	0,71	0,71	0,87		

- Respuestas específicas anti-p17: Como en las anteriores, en el periodo de tratamiento se mantuvieron siempre por encima en el GD que el GI, con tendencia a la significación estadística en alguna determinación ($p = 0,083$ en mes 9). En este periodo no se produjeron cambios significativos intra o intergrupos. Durante los 6 meses del periodo sin TARGA, aumentaron las respuestas anti-p17 en ambos grupos, aunque de forma no significativa y sin diferencias entre grupos.

- Respuestas específicas anti-gag: Durante el periodo de tratamiento el GD presentó niveles superiores de esta respuesta que el GI, significativo en el mes 9 ($p = 0,018$). En este periodo se produjo un mantenimiento de las respuestas en ambos grupos, sin diferencias entre ellos. Tras la suspensión aumentaron las respuestas también en ambos grupos, aunque los aumentos no fueron significativos y no hubo diferencias entre grupos.

2.2.4. Cambios en la función tímica

Los cambios en los parámetros de función tímica durante el tratamiento y tras la interrupción en el GI y el GD se pueden ver en la **Figura R.2.19.** y las **Tablas R.2.17-R.2.18.**

2.2.4.1. Copias de TRECs

- *TRECs*/ μ L: Durante el periodo de tratamiento se produjo un aumento en el número total de *TRECs* en ambos grupos, significativo únicamente en el GI ($p = 0,005$), pero sin diferencias en la comparación entre grupos. En el periodo de parada hubo un descenso en el número de *TRECs* en ambos grupos, fundamentalmente en la primera mitad del periodo, significativa en los dos grupos ($p < 0,001$ y $p = 0,048$ para GI y GD respectivamente en el periodo 12-15) y con una recuperación posterior significativa en el GD ($p = 0,042$). Cuando se realizaron comparaciones entre grupos no se hallaron diferencias significativas.

Tabla R.2.17. Evolución de los parámetros de función tímica durante el periodo de tratamiento y tras su interrupción por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable (TRECOS: Círculos de escisión del receptor celular T)

Parámetros de función tímica	Grupo Indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo Detectable (> 200 copias/mL)				
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	P
Copias TRECOS/μL	118,24 ± 111,82	286,37 ± 192,92	0,005	156,32 ± 157,68	169,08 ± 85,32	213,29 ± 243,6	0,59	61,31 ± 97,67	0,16
Copias TRECOS/ 10 ⁶ células	50920,56 ± 40339,68	61772,86 ± 33235,08	0,27	53227,92 ± 39967,62	67638,25 ± 35959,25	41798,24 ± 34852,48	0,073	30570,52 ± 19408,7	0,28
Volumen tímico (cm ³)	5,12 ± 3,31	5,29 ± 3,52	0,31	5,37 ± 3,3	7,69 ± 3,68	7,86 ± 3,53	0,042	7,66 ± 3,49	0,34
Índice tímico	2,25 ± 1,12	2,27 ± 1,1	0,33	2 ± 1,19	1,78 ± 1,2	1,7 ± 1,16	1	1,7 ± 1,16	1
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	36,27 ± 11,48	39,05 ± 13,04	0,24	40,5 ± 11,35	28,06 ± 10,09	29,61 ± 10,36	0,41	33,19 ± 9,61	0,36
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	33,92 ± 13,47	38,73 ± 16,01	0,34	42,24 ± 12,91	27,73 ± 10,65	31,84 ± 14,4	0,22	34,87 ± 10,35	0,47
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	52,6 ± 11,64	52,65 ± 12,6	0,63	40,45 ± 10,24	54,9 ± 14,9	53,27 ± 13,87	0,48	42,01 ± 15,99	<0,001
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	27,12 ± 15,12	35,66 ± 16,46	0,17	27,79 ± 6,72	26,98 ± 10,37	27,37 ± 8,35	0,81	23,26 ± 9,7	0,2
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	0,55 ± 0,37	1,38 ± 0,89	0,003	1,05 ± 0,73	1,05 ± 0,71	1,31 ± 0,7	0,5	1,16 ± 0,52	0,69
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	1,04 ± 1,06	2,74 ± 2,05	0,003	2,34 ± 1,58	1,48 ± 1,11	1,89 ± 0,99	0,46	2,86 ± 1,71	0,014

Tabla R.2.18. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de los parámetros de función tímica entre los grupos detectable e indetectable con límite de 200 copias/mL. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable (TRECOS: Círculos de escisión del receptor celular T)

Parámetros de función tímica	Mes 0 (basal)		Periodo tratamiento (meses 0-12)		Periodo sin tratamiento (meses 12-18)	
	P	P	P	P	P	P
Copias TRECOS/μL	0,23	0,18	0,98			
Copias TRECOS/ 10 ⁶ células	0,29	0,027	0,8			
Volumen tímico (cm ³)	0,086	0,063	0,23			
Índice tímico	0,34	-	-			
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	0,076	0,74	0,73			
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	0,23	0,91	0,75			
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	0,66	0,87	0,8			
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	0,98	0,29	0,4			
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	0,066	0,13	0,59			
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	0,32	0,079	0,081			

• *TRECs* por célula: A diferencia de los *TRECs* totales, los *TRECs* por célula durante el periodo de tratamiento se comportaron de forma diferente en ambos grupos. Así, mientras que en el GI aumentaron, aunque de forma no significativa ($p = 0,27$), en el GD disminuyeron de forma significativa ($p = 0,002$ entre 0-6 y $p = 0,073$ entre 0 y 12). La diferencia de tendencias entre grupos fue significativamente diferente ($p = 0,005$ entre 0-6 y $p = 0,027$ entre 0 y 12). Tras la suspensión del tratamiento ambos grupos presentaron un descenso, fundamentalmente en la primera mitad del periodo, que prácticamente alcanzó la significación estadística en ambos grupos ($p = 0,074$ en GI y $p = 0,018$ en GD), sin diferencias entre ellos.

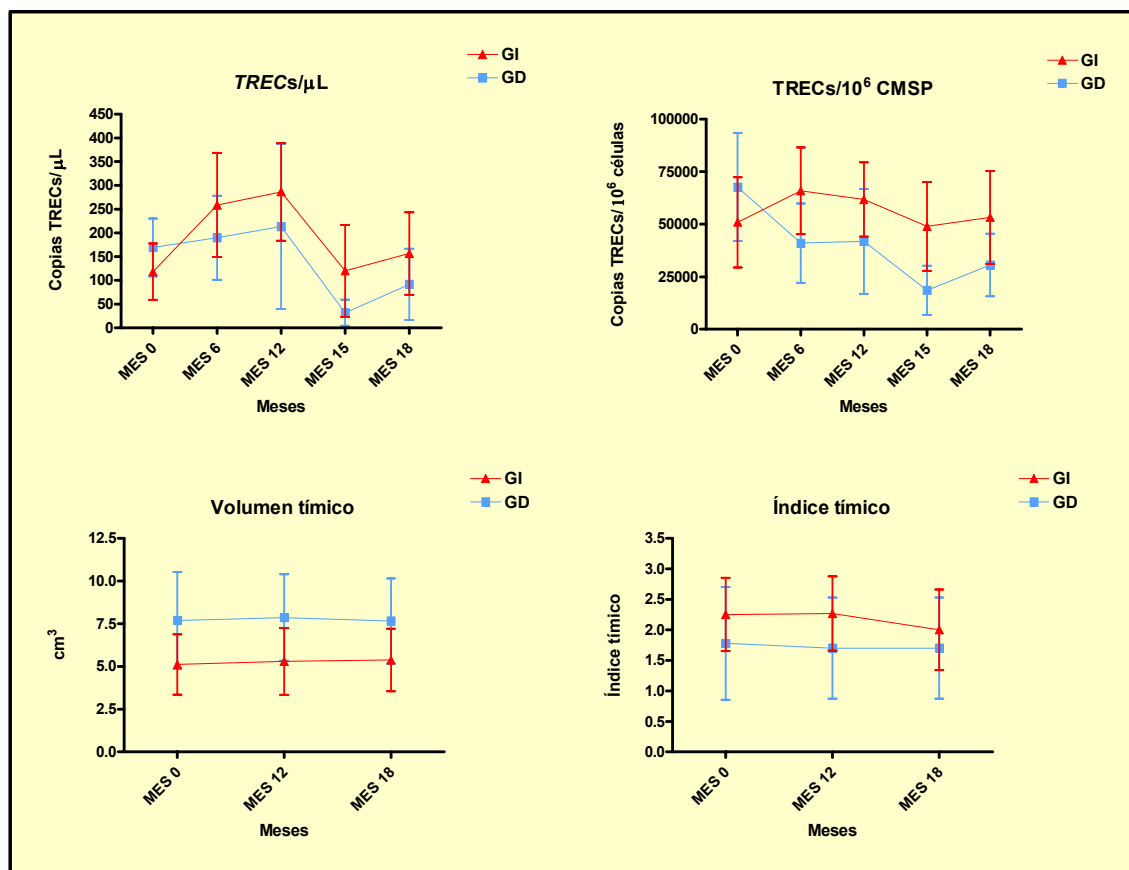


Figura R.2.19. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de los parámetros de función tímica. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (*TRECs*: Círculos de escisión del receptor celular T; GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

2.2.4.2. Tejido tímico

El volumen tímico presentó una tendencia a ser basalmente y durante todo el periodo mayor en el GD que el GI ($p = 0,086$). Durante el tratamiento aumentó en los dos grupos, siendo este aumento significativo únicamente en el GD ($p = 0,042$), y con una tendencia a ser significativamente mayor en el GD ($p = 0,063$), casi alcanzando significación estadística sin diferencias entre grupos. Tras la suspensión del tratamiento, no se llegaron a producir cambios significativos intra o intergrupos.

Por lo que respecta al índice tímico, no se produjeron cambios significativos intra o intergrupos durante los periodos de tratamiento o interrupción, si bien tras la suspensión del tratamiento hubo una tendencia en el GI a presentar un descenso en el índice, no significativo ($p = 0,1$).

2.2.4.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo naïve

Ya se comentó su evolución durante y tras la suspensión del TARGA en los **apartados 2.3.3.1 y 2.3.3.2**.

2.2.5. Cambios en el sistema IL-7/IL-7R

Los cambios en los parámetros del sistema IL-7/IL-7R durante el tratamiento y tras la interrupción en el GI y el GD se pueden ver en la **Figura R.2.20**. y las **Tablas R.2.17-R.2.18**.

2.2.5.1. Niveles séricos de IL-7

Basalmente ambos grupos presentaron niveles séricos similares. Durante el periodo de tratamiento se observó una elevación de las concentraciones en el GI con tendencia a la significación estadística ($p = 0,071$), manteniéndose estable en el GD. No se detectaron diferencias en la evolución entre grupos. Tras la suspensión, en ambos grupos se constató una elevación significativa de los niveles séricos ($p = 0,021$ y $0,028$ en GI y GD, respectivamente), sin diferencias entre grupos.

Tabla R.2.19. Evolución de las concentraciones séricas de IL-7 y de la expresión del IL-7R durante el período de tratamiento y tras su interrupción por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable (IL-7: Interleucina 7; IL-7R: Receptor de la IL-7)

Sistema IL-7/IL-7R	Grupo Indetectable (< 200 copias/mL)			Grupo Detectable (> 200 copias/mL)			P
	Mes 0	Mes 12	Mes 18	Mes 0	Mes 12	Mes 18	
Concentración IL-7 (pg/mL)	10,29 ± 4,79	12,07 ± 4,51	14,54 ± 5,9	10,86 ± 3,7	10,85 ± 2,27	12,61 ± 3,69	0,028
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	19,74 ± 9,5	24,27 ± 14,76	27,31 ± 14,62	16,81 ± 6,89	28,69 ± 21,6	26,26 ± 17,13	0,69
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	25,09 ± 12,61	30,18 ± 15,78	27,74 ± 16,64	24,24 ± 9,33	31,66 ± 17,74	33,1 ± 14,65	0,37
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	13,73 ± 8,32	13,79 ± 10,62	11,22 ± 11,5	15,99 ± 12,83	16,89 ± 13,92	11,3 ± 9	0,27
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	9,33 ± 5,01	9,88 ± 9,68	6,21 ± 5,41	8,77 ± 5,83	12,12 ± 6,77	10,86 ± 4,76	0,98

Tabla R.2.20. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución del sistema IL-7/IL-7R entre los grupos detectable e indetectable con límite de 200 copias/mL (IL-7: Interleucina 7; IL-7R: Receptor de la IL-7)

Sistema IL-7/IL-7R	Mes 0 (basal)		Período de tratamiento (meses 0-12)		Período sin tratamiento (meses 12-18)	
	P	P	P	P	P	P
Concentración IL-7 (pg/mL)	0,75	0,22	0,82			
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	0,41	0,41	0,25			
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	0,86	0,77	0,24			
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	0,6	0,92	0,96			
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	0,8	0,55	0,2			

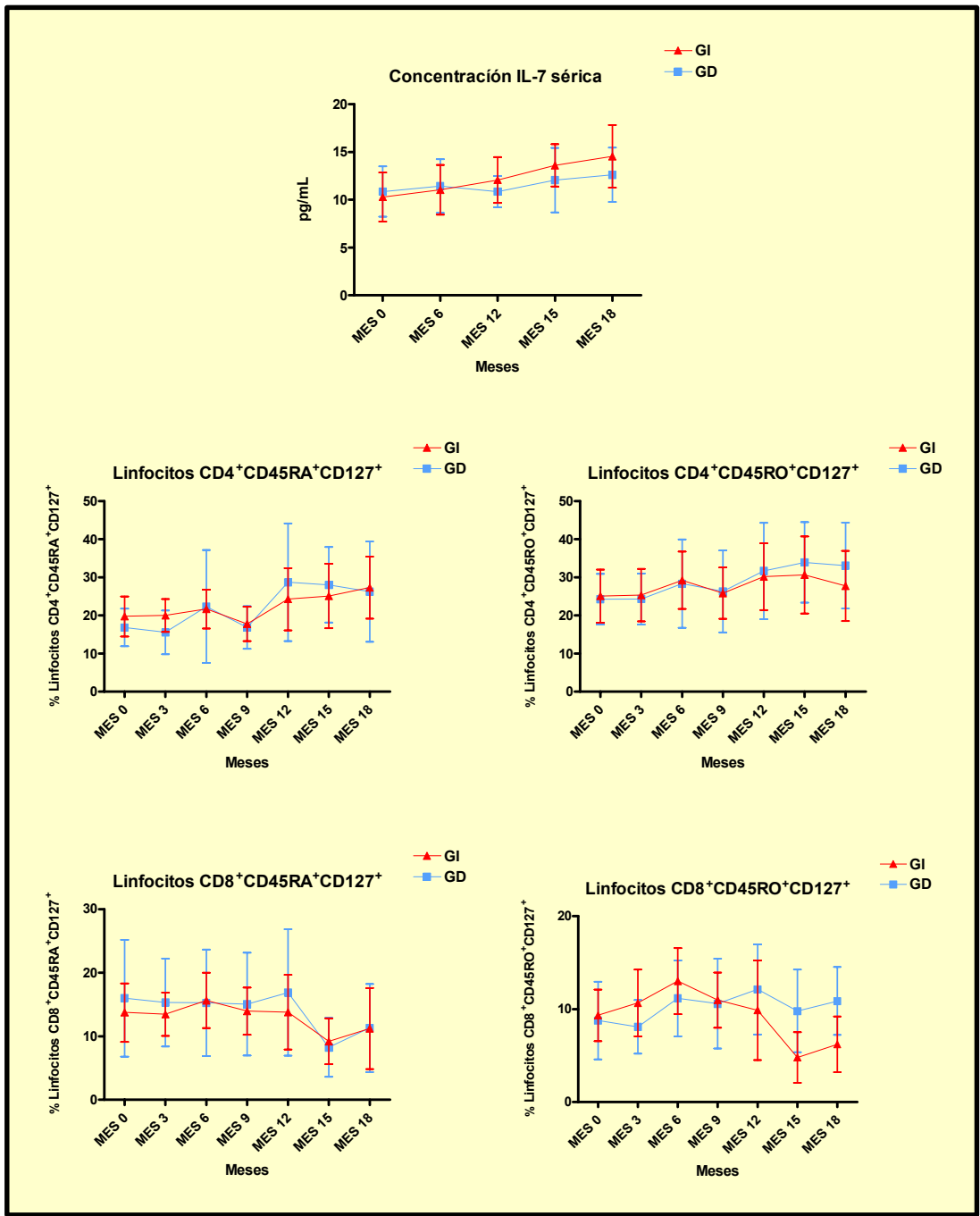


Figura R.2.20. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) del sistema IL-7/IL-7R. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI: Grupo Indetectable para 200 copias/mL; GD: Grupo Detectable para 200 copias/mL)

2.2.5.2. Expresión de IL-7R

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD127⁺: Esta subpoblación tuvo tendencia a aumentar durante el periodo de tratamiento, pero de forma no significativa en ninguno de los

dos grupos y sin diferencias entre ellos. Tras la suspensión del TARGA el GD presentó un descenso, aunque los cambios no fueron significativos ni intra ni intergrupos.

- Linfocitos CD4⁺CD45RO⁺CD127⁺: Durante el tratamiento la evolución de esta población en ambos grupos fue similar, con un aumento no significativo en ambos. Tras la parada, en el GD aumentó y en el GI disminuiría, pero los cambios no fueron significativos ni intra ni intergrupos ($p = 0,24$ para la diferencia de gradientes).

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺: Esta población se mantuvo relativamente estable durante el periodo de tratamiento, sin cambios intra o intergrupos. Cuando se suspendió el tratamiento se produjo un descenso marcado en los dos grupos, sobre todo en la primera mitad del periodo, significativo en el GI ($p = 0,043$ y $0,12$ para GI y GD respectivamente en el periodo 12-15). No se hallaron diferencias entre grupos.

- Linfocitos CD8⁺CD45RO⁺CD127⁺: Esta población presentó durante el periodo de tratamiento un aumento no significativo en ambos grupos, sin diferencias entre ellos. Durante el periodo sin tratamiento, el GD presentó una mayor expresión de CD127 que el GI, en el que descendió de forma significativa la expresión ($p < 0,001$ entre los meses 12-15), aunque no se alcanzaron diferencias significativas en los cambios entre los grupos ($p = 0,89$ para el gradiente 12-18 entre grupos).

2.2.6. Influencia en las respuestas a los antígenos vacunales

Se analizó si la presencia de CV detectables por encima de 200 copias/mL influía en la respuesta humoral y celular a antígenos vacunales, tanto desde el punto de vista basal, como tras la vacunación, y en la evolución de estas respuestas tras la interrupción de tratamiento.

2.2.6.1. Respuesta a VHA

- Respuesta humoral

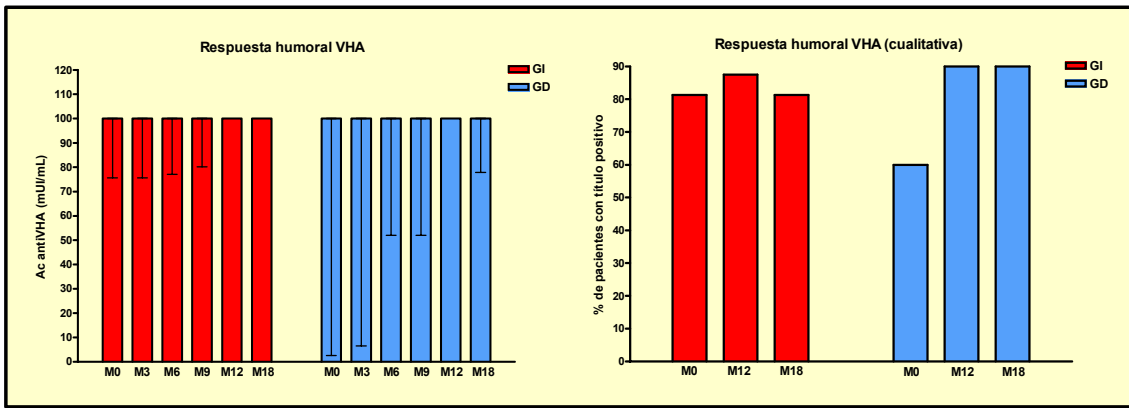


Figura R.2.21. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a VHA durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VHA: Virus hepatitis A; GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); Ac: Anticuerpos)

Aunque los títulos cuantitativos y la proporción de pacientes positivos para VHA en el GD fueron menores basalmente que en el GI, las diferencias no fueron significativas entre el GD y GI ni en los títulos de anticuerpos frente al VHA, ni en la proporción de pacientes positivos ($p = 0,55$ y $0,37$, respectivamente).

Durante el periodo de tratamiento el GD presentó un mayor aumento (tendencia a la significación estadística entre los meses 0 y 12, $p = 0,068$), pero no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en el aumento de títulos entre los meses 0-12, 3-6 y 9-12 (**Tabla R.2.21.** y **Figura R.2.21.**).

Finalmente, durante el periodo sin tratamiento no se detectaron diferencias en la evolución de los títulos de anticuerpos entre grupos ($p = 0,89$) (**Tabla R.2.21.** y **Figura R.2.21.**).

- Respuesta celular

Aunque la respuesta celular medida por ELISPOT y AMPLISPOT fue menor en el GD de forma basal, las diferencias no fueron significativas ni cuantitativa ni cualitativamente ($p = 0,4$ y $0,3$ para las respuestas cuantitativas por ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente).

Tabla R.2.21. Respuestas inmune humoral y celular a VHA, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a VHA	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P**	P***	
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	100 (63,4-100)	100 (100-100)	0,11	100 (100-100)	100 (3,02-100)	100 (100-100)	0,068	100 (88,92-100)	0,65	0,34	0,89
Humoral cualitativa	13 (81,3)	14 (87,5)	1	13 (81,3)	6 (60)	9 (90)	0,25	9 (90)	1	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	181 (28,5-509)	537,5 (28,5-911,25)	0,24	288,5 (5,5-721,5)	38 (23,5-219,5)	493 (72-1227,5)	0,68	433 (156-669)	0,34	0,92	0,38
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	392 (119-1629,5)	1296 (134-1852,5)	0,53	1963,5 (1153,75-2810,5)	176 (69,5-515)	1313 (409,25-1550,5)	0,12	1331 (660,5-2365,5)	0,14	0,89	0,28
Celular (ELISPOT) cualitativa	10 (62,5)	10 (62,5)	1	8 (50)	4 (40)	5 (50)	1	8 (80)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	11 (68,8)	11 (68,8)	1	9 (56,3)	8 (80)	5 (50)	1	8 (80)	1	-	-

La evolución de las respuestas durante el periodo de tratamiento fue similar, sin diferencias entre los grupos en los cambios de respuesta para los distintos periodos. Finalmente, tampoco se observaron diferencias en la evolución de las respuestas celulares al retirar el TARGA (Tabla R.2.21. y Figura R.2.22.).

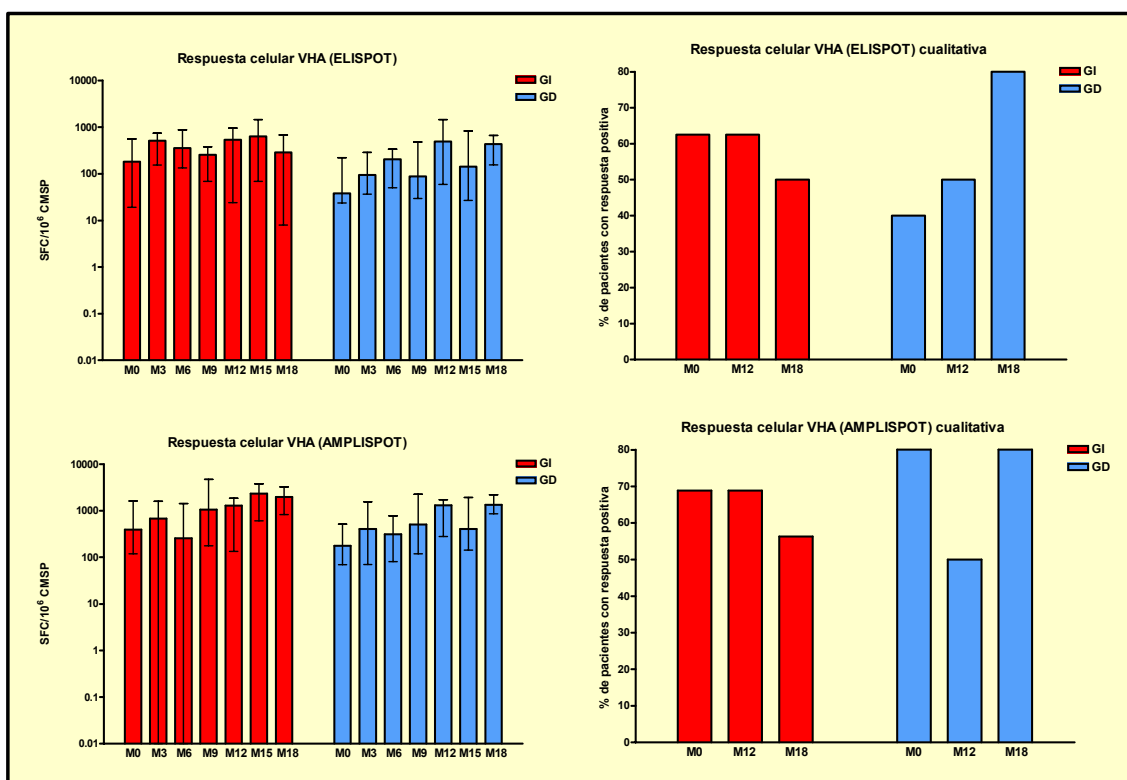


Figura R.2.22. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a VHA durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VHA: Virus hepatitis A; GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

2.2.6.2. Respuesta a VHB

- Respuesta humoral

En el mes 0 los títulos de anticuerpos anti-HBsAg fueron menores en el GD, pero sin ser estadísticamente significativo ($p = 0,62$). Igualmente no existieron diferencias en la evaluación cualitativa de la serología para el VHB.

Durante los 12 meses de tratamiento y vacunaciones/placebo ambos grupos experimentaron un aumento en los títulos de anticuerpos, no observando diferencias significativas en el aumento entre los dos grupos en ninguno de los tramos evaluados (meses 0-12, 0-3 y 6-9).

Tras la suspensión del TARGA tampoco se hallaron diferentes evoluciones entre el GD y el GI (Tabla R.2.22. y Figura R.2.23.).

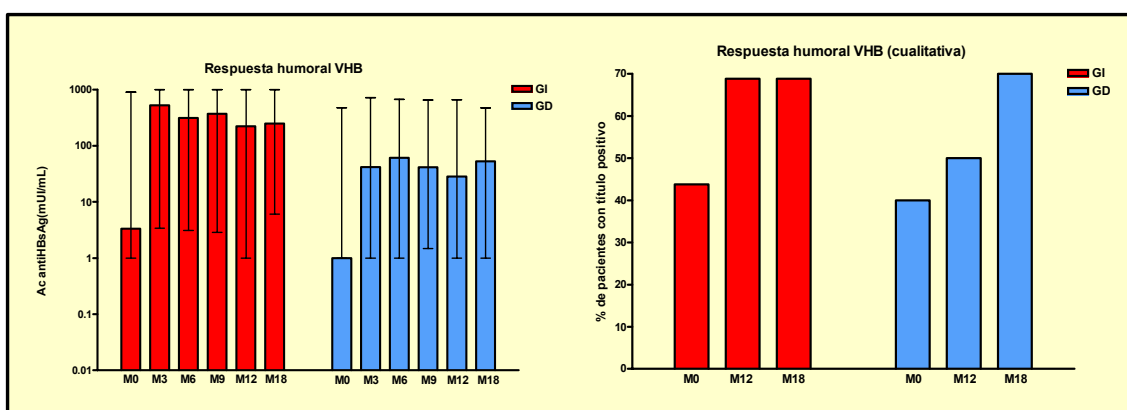


Figura R.2.23. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a VHB durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VHB: Virus hepatitis B; GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); Ac: Anticuerpos)

- Respuesta celular

Los dos grupos no presentaron diferencias basales en la respuesta celular a VHB ($p = 0,16$ y $0,5$ para ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente), pero entre los meses 0 y 3 las medidas por ELISPOT dieron un aumento de respuesta en el GI y una disminución en el GD ($p = 0,021$). No se hallaron otras diferencias ni por ELISPOT ni por AMPLISPOT, ni durante el tratamiento (meses 0-12 ó 6-9), ni tras la suspensión del mismo (Tabla R.2.22. y Figura R.2.24.).

Tabla R.2.22. Respuestas inmune humoral y celular a VHB, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (VHB: Virus hepatitis B; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a virus hepatitis B	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P**	P***	
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	3,32 (1-922,85)	221,97 (1-1000)	0,066	248,2 (6,05-1000)	1 (1-337,55)	28,3 (1-490,75)	0,075	52,54 (1-290,32)	0,5	0,98	0,98
Humoral cualitativa	7 (43,8)	11 (68,8)	0,12	11 (68,8)	4 (40)	5 (50)	1	7 (70)	0,5	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-6,75)	9,5 (0-48,25)	0,14	1,5 (0-40,25)	6 (0-54)	10,5 (2,25-36,75)	0,42	5 (0-31)	0,71	0,39	0,91
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-101)	0 (0-160,5)	0,89	2,5 (0-22,75)	0 (0-4)	0 (0-32,75)	0,18	0 (0-40,75)	0,28	0,75	0,43
Celular (ELISPOT) cualitativa	1 (6,3)	2 (12,5)	1	2 (12,5)	2 (20)	1 (10)	0,5	1 (10)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	4 (25)	5 (31,3)	1	1 (6,3)	0 (0)	0 (0)	1	1 (10)	1	-	-

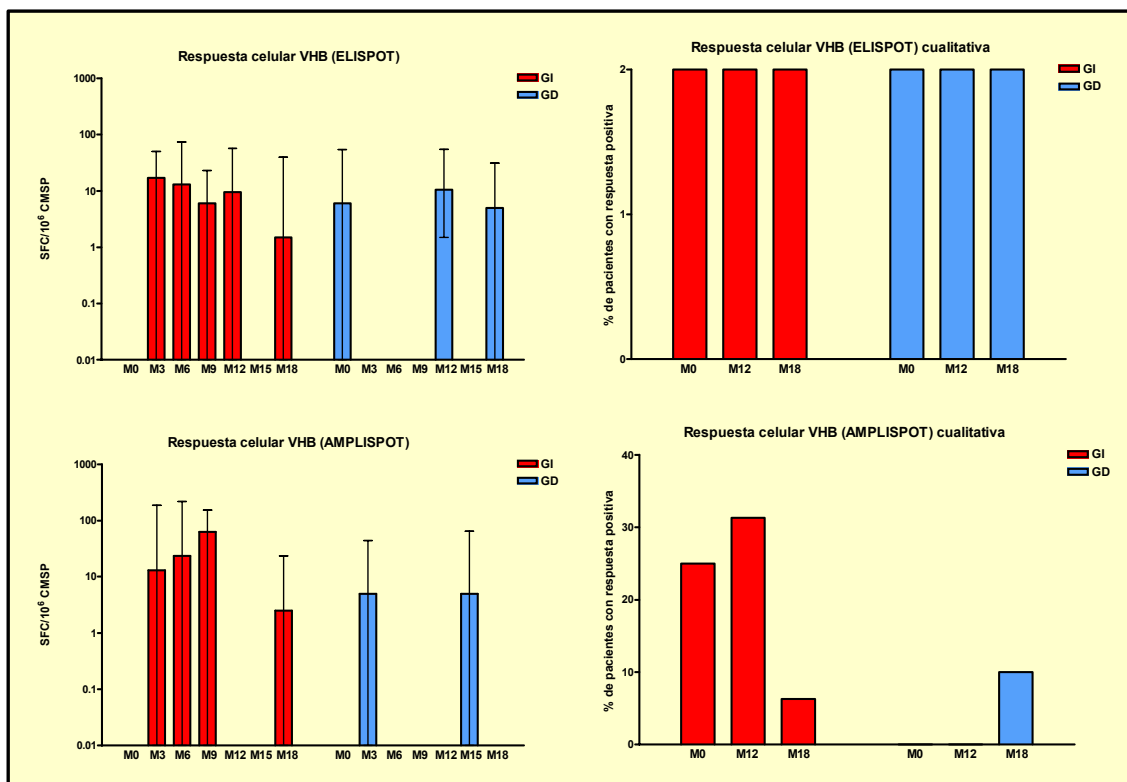


Figura R.2.24. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a VHB durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VHB: Virus hepatitis B; GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

2.2.6.3. Respuesta a gripe

Ni en las determinaciones basales, ni durante el tratamiento y tampoco tras la interrupción los GD y GI presentaron una evolución significativamente diferente (Tabla R.2.23. y Figura R.2.25.).

Tabla R.2.23. Respuestas inmune humoral y celular a gripe, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a virus influenza	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P**	P***		
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18				
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	110,5 (53,5-213,2,5)	116,5 (0-303,5)	0,97	43,5 (0-189,75)	92 (36-230)	286 (140,25-475,75)	0,22	138 (64-274)	0,44	0,043	0,25	0,14
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	233 (57-566)	478 (71-865,5)	0,48	562,5 (259,75-728)	477 (234-974,5)	265,5 (0-686,5)	0,17	585 (199,5-981)	0,4	0,08	0,18	0,52
Celular (ELISPOT) cualitativa	11 (68,8)	8 (50)	0,45	6 (37,5)	6 (60)	6 (60)	0,5	9 (90)	1	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	10 (62,5)	11 (68,8)	1	10 (62,5)	8 (80)	4 (40)	0,5	8 (80)	1	0,5	-	-

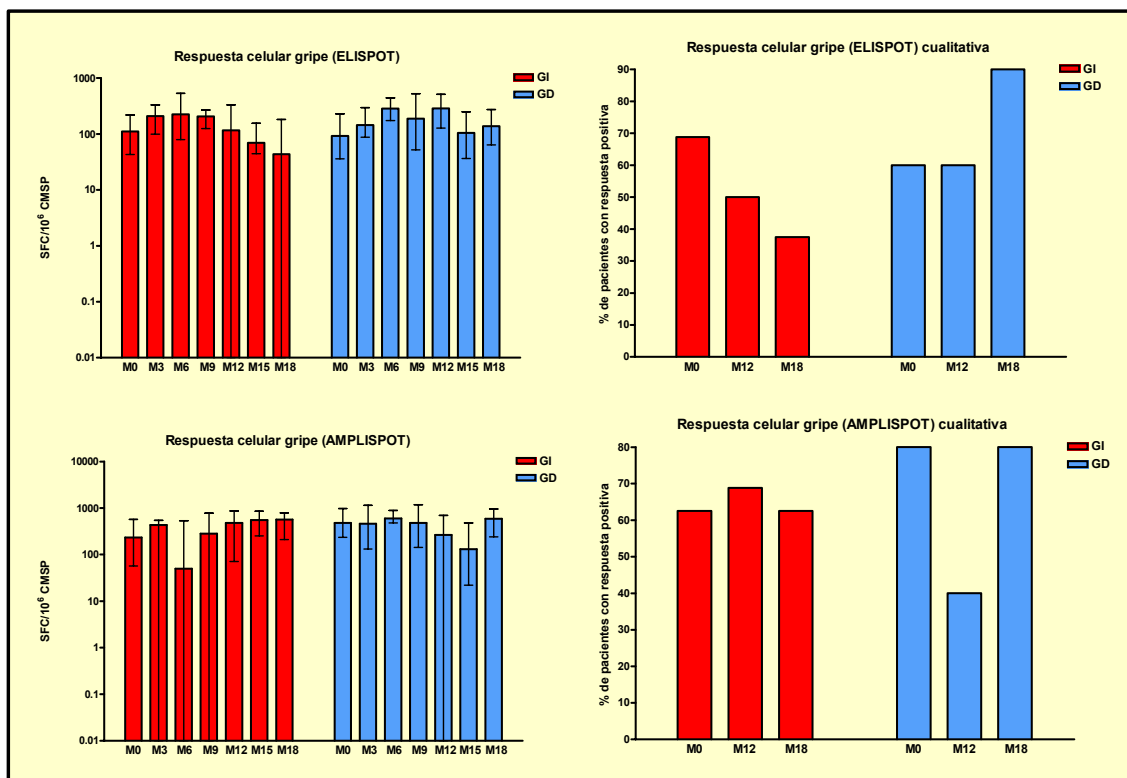


Figura R.2.25. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a gripe durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

2.2.6.4. Respuesta a varicela

- Respuesta humoral

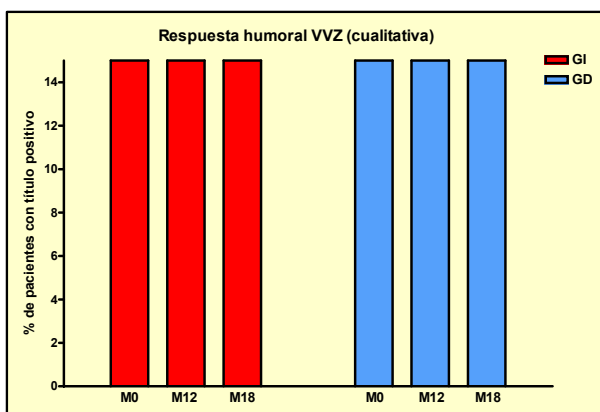


Figura R.2.26. Evolución de la respuesta humoral cualitativa a VVZ durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestra la proporción de pacientes positivos (VVZ: Virus Varicela Zoster; GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL))

No se hallaron diferencias significativas cualitativas en la respuesta humoral a varicela basalmente entre los GI y GD ($p = 1$), ni se produjeron diferencias en la evolución durante el periodo de TARGA o en la interrupción (Tabla R.2.24. y Figura R.2.26.).

- Respuesta celular

Si bien no existían diferencias basales en la respuesta celular cuantitativa o cualitativa a VVZ por ELISPOT ($p = 0,73$ y $0,34$, respectivamente), sí se detectaron diferencias en las mediciones por AMPLISPOT, de forma que el GD tenía basalmente y de forma significativa una respuesta celular superior al GI ($p = 0,051$ para la valoración cuantitativa y $0,08$ para la cualitativa).

Con el tratamiento se observó que, en la medición por ELISPOT, el GD presentó una elevación significativamente mayor a la que presentó el GI entre los meses 9 y 12 ($p = 0,046$), mientras que se produjo un aumento mayor en el GI entre los meses 0 y 12 ($p = 0,043$). No se hallaron otras diferencias evolutivas ni cuantitativas ni cualitativas por ELISPOT o AMPLISPOT, así como tampoco tras la interrupción del TARGA (Tabla R.2.24. y Figura R.2.27.).

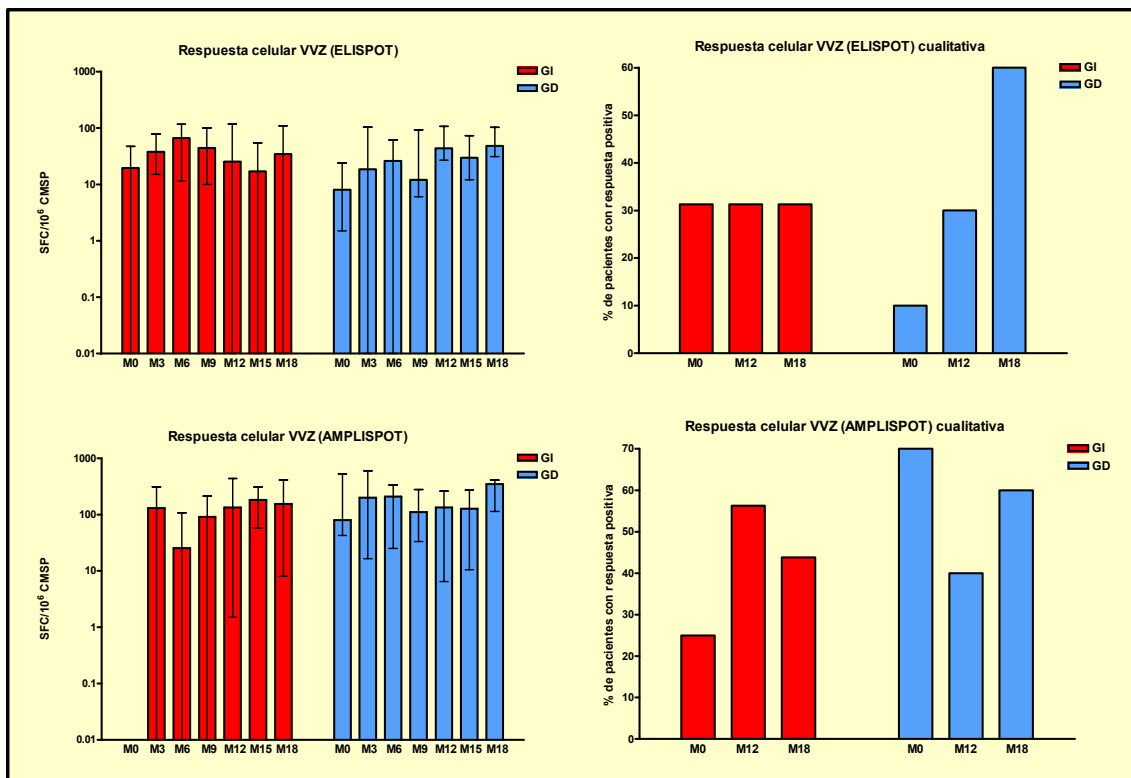


Figura R.2.27. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a VVZ durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VVZ: Virus Varicela Zoster; GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.2.24. Respuestas inmune humoral y celular a varicela, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a varicela	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P**	P***		
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18				
Humoral cualitativa	14 (87,5)	15 (93,8)	1	13 (81,3)	10 (100)	1	10 (100)	1	-	-		
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	19,5 (0-46,25)	25,5 (0-95)	0,78	34,5 (0-136,5)	8 (1,5-24)	0,093	43,5 (31-103,5)	0,14	48 (31-102,5)	0,89	0,5	0,27
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-135,5)	133 (1,5-437,5)	0,28	154,5 (12-353,5)	80 (42,5-527)	1	134 (9,75-257,75)	0,46	348 (58,75-422,75)	0,043	0,21	0,17
Celular (ELISPOT) cualitativa	5 (31,3)	5 (31,3)	1	5 (31,3)	1 (10)	0,25	3 (30)	1	6 (60)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	4 (25)	9 (56,3)	0,29	7 (43,8)	7 (70)	1	4 (40)	1	6 (60)	1	-	-

2.2.6.5. Respuesta a parotiditis

- Respuesta humoral

Aunque las respuestas basales a parotiditis fueron inferiores en el GD, no se observaron diferencias significativas en la respuesta humoral cualitativa a parotiditis entre los GD y GI ni durante el periodo de tratamiento ni en la fase de interrupción (**Tabla R.2.25.** y **Figura R.2.28.**).

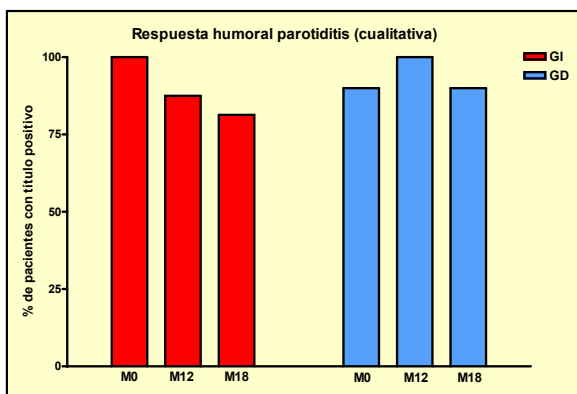


Figura R.2.28. Evolución de la respuesta humoral cualitativa a parotiditis durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestra la proporción de pacientes positivos (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL))

- Respuesta celular

No se detectó que las respuestas basales celulares a parotiditis fuesen diferentes ni de forma cuantitativa ni cualitativa por ELISPOT o AMPLISPOT.

Durante el periodo de tratamiento el GI presentó una tendencia a disminuir las respuestas por ELISPOT, mientras que aumentaron en el GD ($p = 0,087$ para la diferencia de razones de títulos entre estos meses).

Posteriormente, tras la interrupción, y también en la medida por ELISPOT, el GI presentó un aumento de la respuesta celular cuantitativa significativamente superior al que presentó el GD ($p = 0,052$).

Por AMPLISPOT no se detectaron diferencias significativas ni durante el tratamiento ni tras la interrupción (**Tabla R.5.21.** y **Figura R.5.26.**).

Tabla R.2.25. Respuestas inmune humoral y celular a parotiditis, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a parotiditis	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18		
Humoral cualitativa	16 (100)	14 (87,5)	1	13 (81,3)	9 (90)	10 (100)	1	9 (90)	1	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	6,5 (0-29,5)	0 (0-177)	0,79	55,5 (0-137,5)	19 (0-40,5)	62 (28,75-149,5)	0,34	46 (39-69,5)	0,08	0,29
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	71 (22-150)	115 (0-430,5)	0,53	160 (65,5-406)	140 (15-477,5)	108 (0-258)	0,6	339 (65,75-598,25)	0,11	0,49
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (12,5)	4 (25)	1	6 (37,5)	2 (20)	4 (40)	0,62	5 (50)	1	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	9 (56,3)	8 (50)	0,62	8 (50)	5 (50)	4 (40)	1	6 (60)	1	-

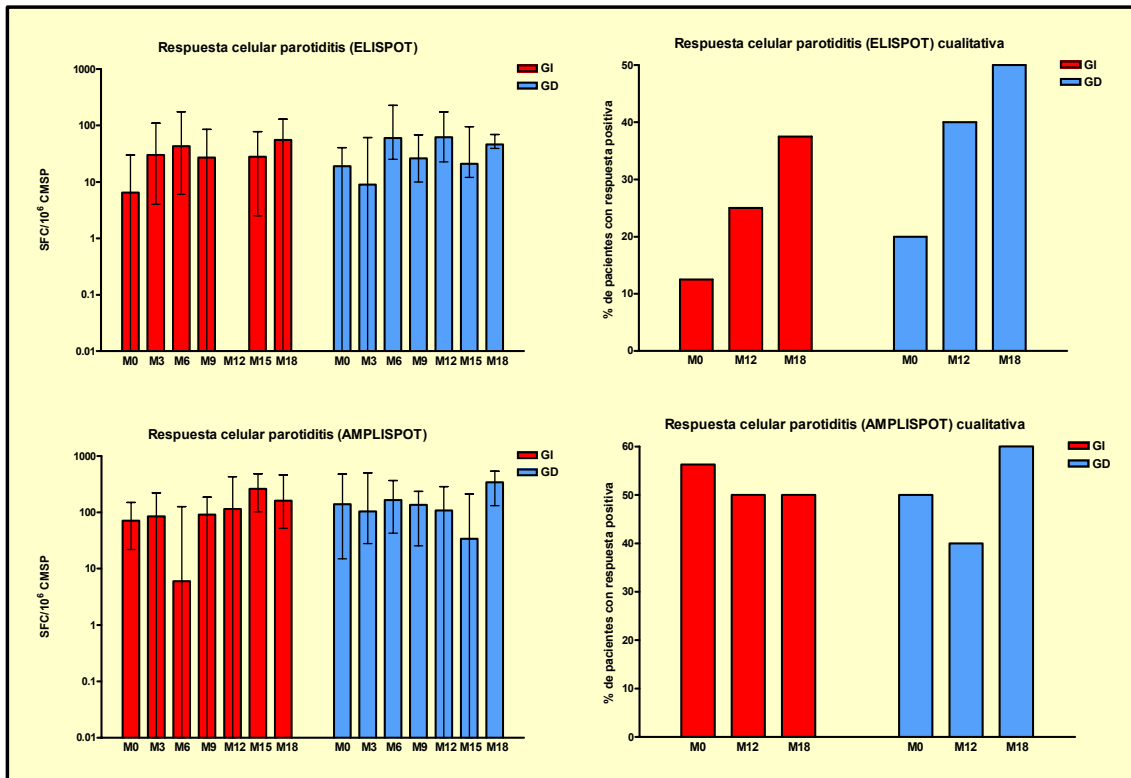


Figura R.2.29. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a parotiditis durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

2.2.6.6. Respuesta a rubéola

Aunque en el mes 0 el GD presentaba títulos inferiores de anticuerpos frente a rubéola, no se hallaron diferencias cuantitativas ni cualitativas en la respuesta humoral a rubéola entre grupos ($p = 0,26$ y 1 para la respuesta cuantitativa y cualitativa, respectivamente). Con las vacunaciones los títulos aumentaron más en el GI, pero tampoco se hallaron diferencias significativas. Finalmente, tras la retirada del tratamiento los títulos variaron en ambos grupos de forma similar, sin diferencias significativas entre ellos (Tabla R.2.26. y Figura R.2.30.).

Tabla R.2.26. Respuestas inmune humoral y celular a rubéola, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (P* de la diferencia 12-18 Intragrup; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a rubéola	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P**	P***		
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18				
Humoral cuantitativa (UI/mL)	89 (43-203)	104,5 (54-319,5)	0,33	48 (29-143)	55 (26,75-96)	63,5 (33-139,75)	0,33	36,5 (27-80,75)	0,001	0,093	0,86	0,4
Humoral cualitativa	16 (100)	16 (100)	1	15 (93,8)	10 (100)	10 (100)	1	10 (100)	1	1	-	-

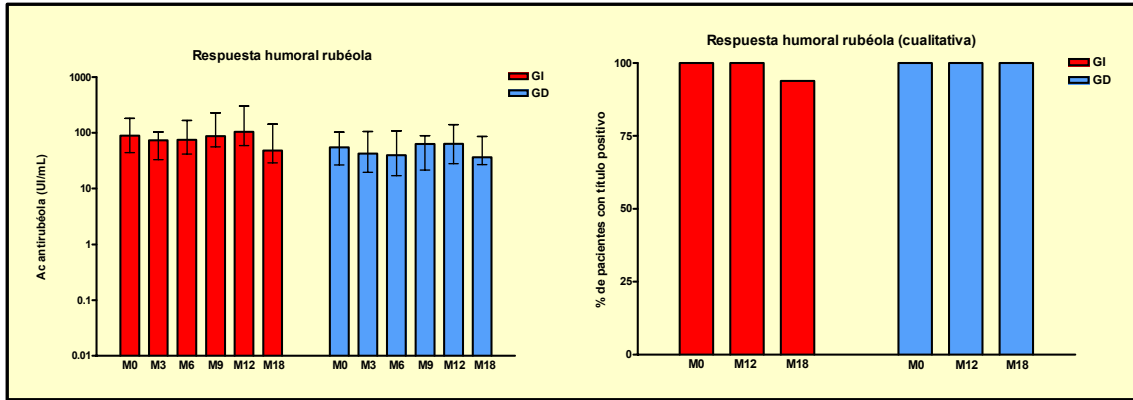


Figura R.2.30. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a rubéola durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); Ac: Anticuerpos)

2.2.6.7. Respuesta a sarampión

- Respuesta humoral

No se hallaron diferencias en la respuesta humoral a sarampión (cualitativa) entre los GI y GD ni basalmente, ni en la evolución con y sin tratamiento (**Tabla R.2.27.** y **Figura R.2.31.**).

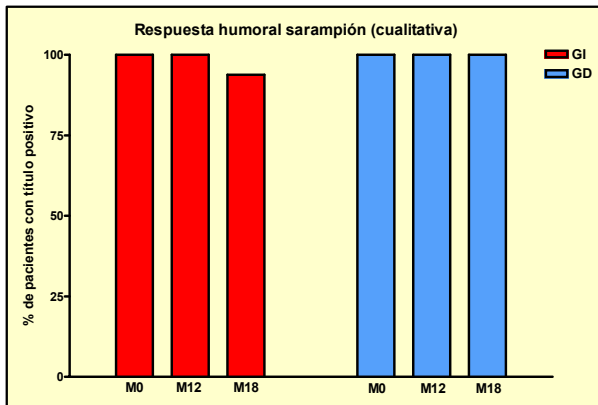


Figura R.2.31. Evolución de la respuesta humoral cualitativa a sarampión durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestra la proporción de pacientes positivos (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL))

- Respuesta celular

Basalmente no existían diferencias en las respuestas celulares (cuantitativa y cualitativa) a sarampión medidas por ELISPOT y AMPLISPOT entre los GD y GI ($p = 0,23$ y $0,28$ para las respuestas cuantitativas por ELISPOT y AMPLISPOT, y $0,5$ y 1 para las cualitativas por los mismos métodos, respectivamente).

Durante el periodo de tratamiento se hallaron diferencias en la respuesta celular por ELISPOT: el GI presentó entre los meses 0 y 12 un descenso, mientras que el GD aumentó, siendo estadísticamente significativo ($p = 0,035$). No se hallaron otras diferencias entre grupos ni cuantitativas ni cualitativas, ni en ELISPOT ni AMPLISPOT.

Finalmente, durante el periodo sin TARGA no se detectaron diferencias en la evolución entre los dos grupos (Tabla R.2.27. y Figura R.2.32.).

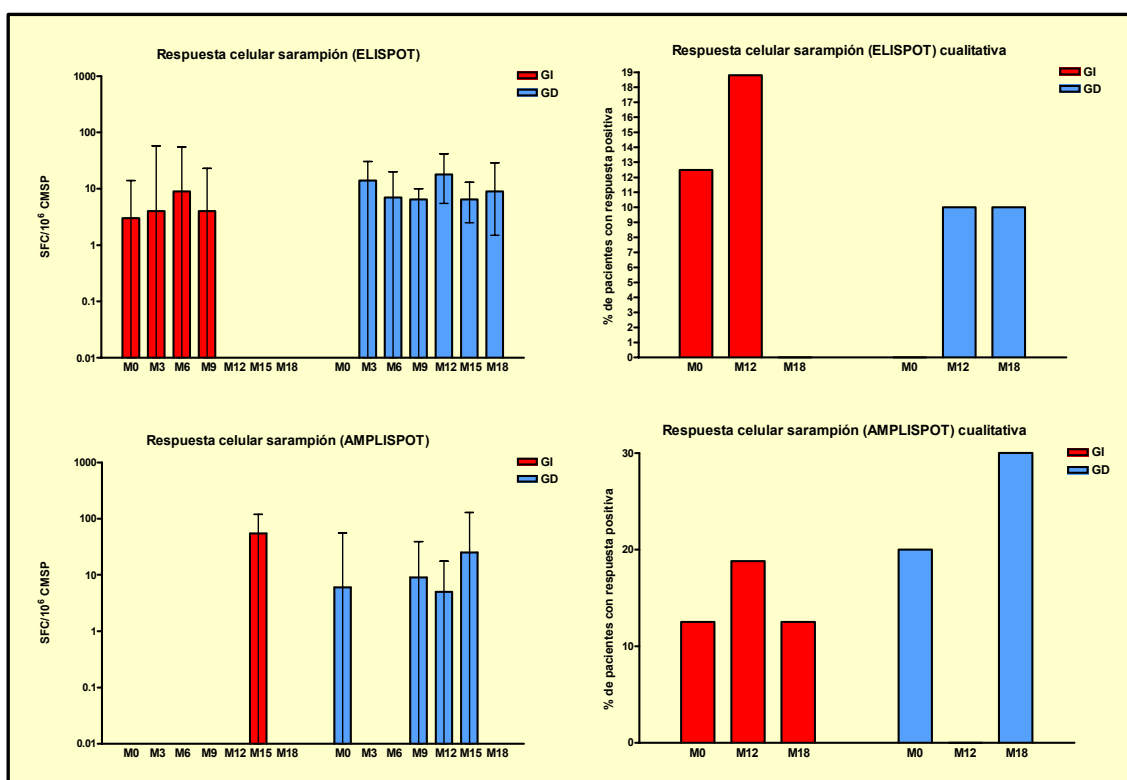


Figura R.2.32. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a sarampión durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); SFC: Células formadoras de *spots*; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.2.27. Respuestas inmune humoral y celular a sarampión, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a sarampión	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P*	P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cualitativa	16 (100)	16 (100)	1	15 (93,8)	10 (100)	10 (100)	1	10 (100)	1	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	3 (0-14)	0 (0-21,5)	0,62	0 (0-9)	0 (0-6,5)	18 (6,75-39,75)	0,043	9 (1,5-29)	0,043	0,035	0,11
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-9,5)	0 (0-39)	0,89	0 (0-49)	6 (0-56)	5 (0-17,25)	0,17	0 (0-193)	0,28	0,33	0,83
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (12,5)	3 (18,8)	1	0 (0)	0 (0)	1 (10)	1	1 (10)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	2 (12,5)	3 (18,8)	1	2 (12,5)	2 (20)	0 (0)	0,5	3 (30)	0,5	-	-

2.2.6.8. Respuesta a neumococo

- Respuesta humoral

No se hallaron diferencias a nivel basal entre los GD y GI en cuanto a la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa frente a neumococo ($p = 0,29$ y $0,64$, respectivamente), así como tampoco en la evolución durante los periodos de tratamiento e interrupción (**Tabla R.2.28.** y **Figura R.2.33.**).

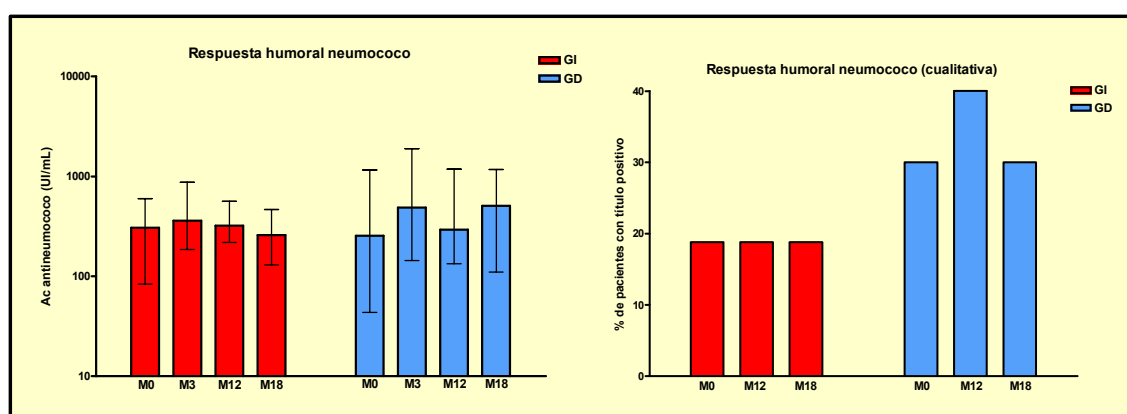


Figura R.2.33. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a neumococo durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); Ac: Anticuerpos)

- Respuesta celular

En el mes 0 las respuestas celulares a neumococo en los GD y GI no fueron significativamente diferentes, ni cuantitativas por ELISPOT ($p = 0,97$), ni cualitativas por ELISPOT o AMPLISPOT ($p = 0,13$ y $0,12$, respectivamente). Sin embargo, las respuestas cuantitativas por AMPLISPOT fueron significativamente menores en el GI ($p = 0,036$).

Durante el periodo de tratamiento, entre los meses 0 y 12 se observó una tendencia en el GD a disminuir las respuestas medidas por AMPLISPOT, mientras que en el GI aumentaron, teniendo el cambio entre los grupos tendencia a ser significativamente diferente ($p = 0,067$).

Durante la fase sin tratamiento no se observaron diferencias significativas en la evolución de las respuestas entre grupos (**Tabla R.2.28.** y **Figura R.2.34.**).

Tabla R.2.28. Respuestas inmune humoral y celular a neumococo, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a neumococo	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P**	P***		
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18				
Humoral cuantitativa (mIU/mL)	306,5 (74,25-618,25)	320 (218-563)	0,33	258 (130-466)	254 (65,25-908,75)	293 (134,75-982,5)	0,083	506 (110-1169)	0,002	0,14	0,53	0,86
Humoral cualitativa	3 (18,8)	3 (18,8)	1	3 (18,8)	3 (30)	4 (40)	1	3 (30)	1	1	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-62,5)	10,5 (0-29,25)	0,72	0 (0-11,5)	5 (0-10,5)	4,5 (0-38)	0,69	5 (0-16,5)	0,18	0,27	1	0,83
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-14,5)	8 (0-92)	0,12	31,5 (3,75-504,75)	39 (2,5-258)	9,5 (0-53,25)	0,075	61,5 (11,25-88,5)	0,24	0,068	0,067	0,72
Celular (ELISPOT) cualitativa	4 (25)	2 (12,5)	0,62	2 (12,5)	0 (0)	1 (10)	1	1 (10)	1	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1 (6,3)	4 (25)	0,37	5 (31,3)	4 (40)	2 (20)	0,62	5 (50)	1	0,5	-	-

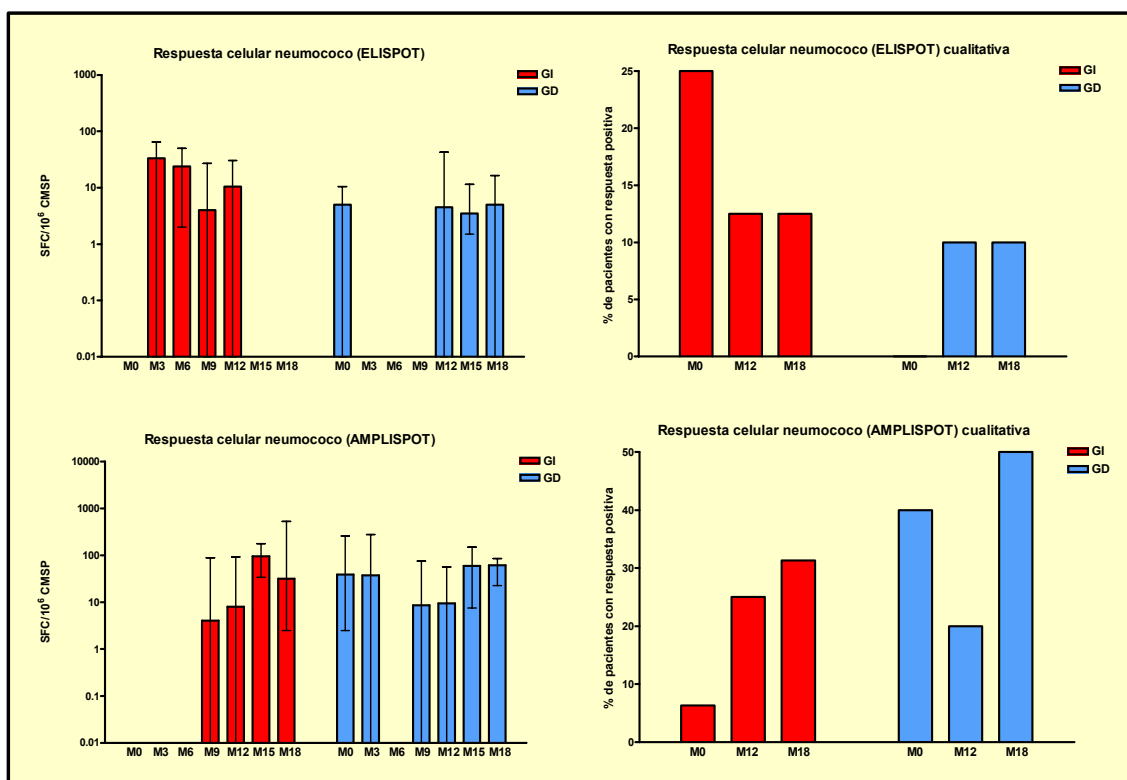


Figura R.2.34. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a neumococo durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

2.2.6.9. Respuesta a tétanos

- Respuesta humoral

Aunque basalmente el GD presentaba un título menor de anticuerpos anti-tétanos, las diferencias cuantitativas y cualitativas no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,29$ y $0,54$ respectivamente).

Ni durante el tratamiento ni durante la interrupción se detectaron diferencias significativas en la evolución de la respuesta humoral frente a tétanos, cuantitativa o cualitativa (Tabla R.2.28. y Figura R.2.35.).

Resultados

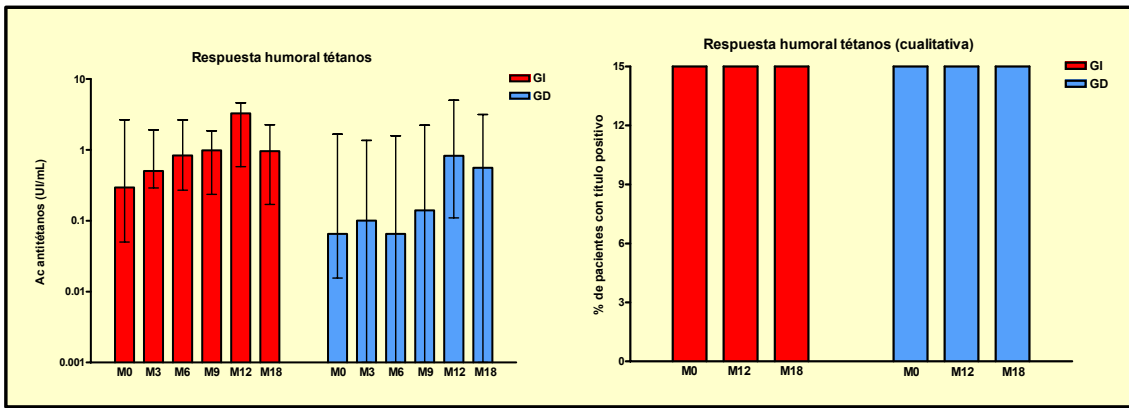


Figura R.2.35. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a tétanos durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); Ac: Anticuerpos)

- Respuesta celular

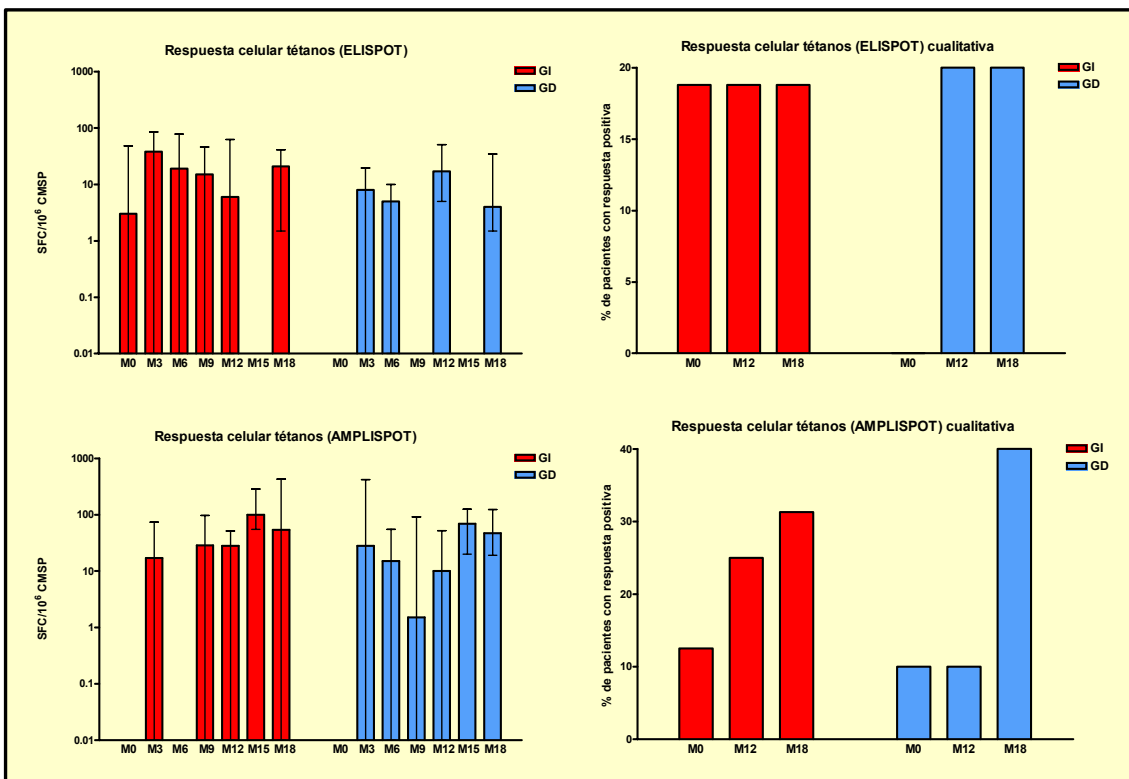


Figura R.2.36. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a tétanos durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.2.29. Respuestas inmune humoral y celular a tétanos, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a tétanos	Grupo indetectable (< 200 copias/mL)					Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)						
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	P*	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	P*	P**	P***
Humoral cuantitativa (UI/mL)	0,29 (0,04-3,08)	3,28 (0,43-4,6)	0,016	0,96 (0,17-2,27)	0,003	0,06 (0,02-1,44)	0,82 (0,11-5)	0,14	0,56 (0-2,98)	0,093	0,7	0,64
Humoral cualitativa	15 (93,8)	14 (87,5)	1	14 (87,5)	1	8 (80)	9 (90)	1	7 (70)	0,5	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	3 (0-43)	6 (0-43,75)	0,59	21 (0,75-42,5)	0,59	0 (0-5,5)	17 (5-49)	0,039	4 (1,5-34,5)	0,34	0,003	0,069
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-15,5)	28 (0-51,5)	0,086	54 (0-354,75)	0,063	0 (0-32,5)	10 (0-43,5)	0,46	47 (17,5-132,75)	0,043	0,29	0,065
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (18,8)	3 (18,8)	1	3 (18,8)	0,5	0 (0)	2 (20)	1	2 (20)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	2 (12,5)	4 (25)	0,37	5 (31,3)	1	1 (10)	1 (10)	1	4 (40)	0,5	-	-

Las respuestas celulares basales a tétanos no mostraron diferencias entre grupos ($p = 0,3$ y 1 para las cuantitativas y $p = 0,25$ y 1 para las cualitativas por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente). Sin embargo durante el tratamiento sí se observaron diferentes tendencias en los grupos, de forma que por ELISPOT se observó entre los meses 9 y 12 una disminución de la respuesta en el GI y un aumento en el GD ($p = 0,036$), mientras que entre los meses 0 y 12 la tendencia fue a aumentar en ambos pero mucho más de forma significativa en el GD ($p = 0,003$). Por AMPLISPOT no se observaron estas diferencias. Las respuestas cualitativas no mostraron diferencias significativas.

Durante la fase sin TARGA también se observaron diferencias. En las respuestas por ELISPOT se produjo un aumento en el GI y un descenso en el GD ($p = 0,069$). Y por AMPLISPOT aumentaron en los dos grupos, pero con tendencia a hacerlo significativamente más en el GD ($p = 0,065$) (Tabla R.2.29. y Figura R.2.36.).

2.2.6.10. Respuesta a difteria

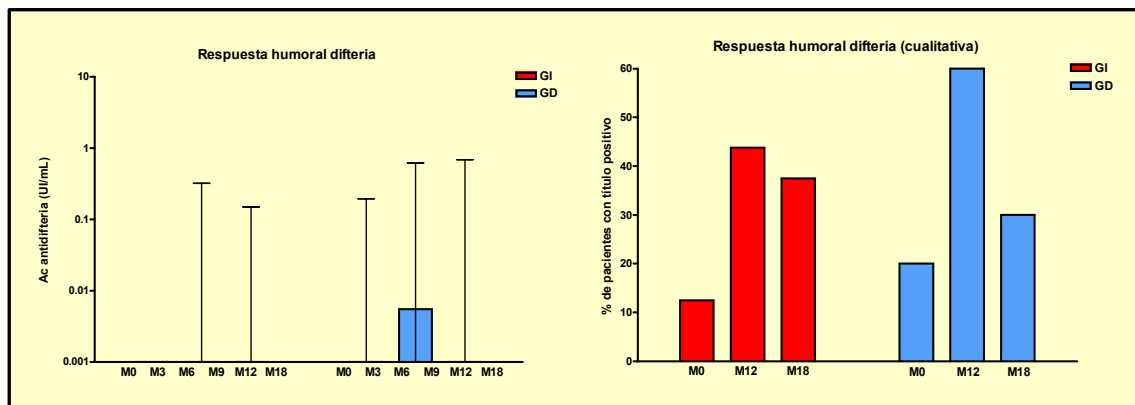


Figura R.2.37. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a difteria durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GD: Grupo Detectable (≥ 200 copias/mL); GI: Grupo Indetectable (< 200 copias/mL); Ac: Anticuerpos)

Las respuestas humorales a difteria en el mes 0 no fueron diferentes de forma significativa, ni cuantitativa ni cualitativamente ($p = 0,5$ y 1 , respectivamente).

Con el tratamiento y posteriormente con la interrupción no se produjeron cambios significativamente diferentes entre grupos (Tabla R.2.30. y Figura R.2.37.).

Tabla R.2.30. Respuestas inmune humoral y celular a differia, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 200 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P de la comparación entre los dos grupos de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)**

Respuesta a differia	Grupo indetectable (<200 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 200 copias/mL)				P**	P***	
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (UI/mL)	0,01 (0,01-0,01)	0,01 (0,01-0,32)	0,018	0,01 (0,01-0,15)	0,01 (0,01-0,098)	0,05 (0,01-0,43)	0,043	0,01 (0,01-0,53)	0,92	0,94	0,85
Humoral cualitativa	2 (12,5)	7 (43,8)	0,063	6 (37,5)	2 (20)	6 (60)	0,12	3 (30)	0,37	-	-

2.3. SUBESTUDIO A2: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE EPISODIOS DE CARGA VIRAL DETECTABLE ≥ 20 COPIAS/ML SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE EL TARGA Y TRAS SU INTERRUPCIÓN

En el apartado anterior se expuso el análisis de la potencial influencia de los episodios de viremia intermitente en los diferentes parámetros inmunológicos, la función tímica, el sistema IL-7/IL-7R y las respuestas vacunales, considerando en el GD aquellos pacientes con CV detectables en el ensayo que tenía como límite inferior de detectabilidad 200 copias/mL.

Dado que las técnicas más actuales y utilizadas con mayor frecuencia tienen su límite de sensibilidad en las 50 copias/mL, es éste el límite inferior de los EVI para la mayoría de autores recientes. Sin embargo, los ensayos de CV iniciales tenían un rango dinámico de alrededor de 3 \log_{10} , con límites inferiores de detección de 400 copias/mL primero y 200 copias/mL después, dependiendo de la técnica de determinación de CV utilizada. Este límite va a ser crucial en la definición del EVI, pues un determinado nivel permitirá detectar más o menos episodios de elevaciones por encima de una cifra determinada y establecer su duración. De este modo, la aparición de ensayos más sensibles ha hecho que algunos pacientes que eran indetectables cuando el límite de detección era de 200 copias/mL, hayan pasado a detectables cuando el límite se ha establecido en 50 copias/mL, aumentando el número de EVI de forma “súbita”.

Por ello también se realizó el mismo análisis, pero considerando aquellos pacientes con CV detectables según el ensayo con límite inferior de detectabilidad de 20 copias/mL. De este modo, los pacientes se clasificaron en dos grupos, el GD₂₀, donde se incluyeron todos los pacientes con CV detectables superiores a 20 copias/mL (n = 14), y el GI₂₀, formado por aquellos pacientes con CV indetectables por debajo de este nivel (n = 12).

2.3.1. Características generales basales

Los dos grupos por tanto fueron el GD₂₀, con 14 pacientes que presentaron en algún momento alguna CV detectable ≥ 20 copias/mL, y el GI₂₀, en el que los pacientes se mantuvieron indetectables durante los 12 meses de tratamiento.

A diferencia del análisis con pacientes con CV detectables ≥ 200 copias/mL, en este caso existieron diferencias basales en dos características. Por un lado, el sexo, de forma que todos los pacientes que presentaron una CV detectable ≥ 20 copias/mL eran hombres, y todas las mujeres del estudio se mantuvieron indetectables en todo momento ($p = 0,012$). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ nadir, significativamente más bajo en el GD₂₀ ($p = 0,012$) (Tabla R.2.31.).

Además, en el GD₂₀ se halló una mayor proporción de pacientes con IP, aunque sin alcanzar la significación estadística ($p = 0,12$).

Por lo que respecta a la recepción de vacunas y placebo, el 50% de los pacientes en cada grupo recibió una u otra estrategia.

Tabla R.2.31. Características basales de los pacientes del estudio. Se exponen la media y la desviación típica de las variables cuantitativas, y el número de pacientes y su proporción en las cualitativas (VHC: Virus hepatitis C; ADVP: Adicto a drogas por vía parenteral; TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad; CV: Carga viral; EVI: Episodio de viremia intermitente; * Test exacto de Fisher)

Variable	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL) (n = 12)	Grupo Detectable (≥ 20 copias/mL) (n = 14)	P
Edad (años)	40,82 \pm 9,77	38,95 \pm 8,49	0,6
Sexo (Varones:Mujeres)	7:5	14:0	0,012*
VHC +, n (%)	1 (8,33)	3 (21,43)	0,6*
Factor de riesgo n (%)			
Homosexual	6 (50)	8 (57,14)	0,97
Heterosexual	5 (41,67)	4 (28,57)	0,68*
ADVP	1 (8,33)	2 (14,28)	1*
Duración infección (días)	2424 \pm 1319,82	2227,08 \pm 2112,95	0,78
Duración TARGA (días)	1637,08 \pm 1212,71	1059,23 \pm 813,61	0,17
Número de pautas tratamiento previas (media)	2,42 \pm 1,78	2,62 \pm 2,33	0,81
Había recibido ≥ 3 pautas TARGA previas, n (%)	5 (41,67)	5 (35,71)	1*
Había recibido mono o biterapia previas, n (%)	3 (25)	1 (7,14)	0,31
TARGA actual con inhibidor de la proteasa, n (%)	4 (33,33)	10 (71,42)	0,12
CV más alta (log ₁₀ copias/mL)	4,66 \pm 0,82	4,87 \pm 0,79	0,51
Había presentado EVI previos, n (%)	3 (25)	4 (28,57)	1*
CD4 ⁺ nadir			
Absoluto (células/mm ³)	455 \pm 108,32	446,08 \pm 118,89	0,85
Porcentaje	27,87 \pm 6,49	20,81 \pm 6,41	0,012
Pertenecía al grupo vacunado, n (%)	6 (50)	7 (50)	1

2.3.2. Características virológicas basales y evolución de la replicación viral

No se encontraron diferencias en los niveles de la CV más alta antes de cualquier tratamiento. Sin embargo, cabe decir que existían pacientes que habían iniciado TARGA antes de disponer de las técnicas de cuantificación de ARN plasmático viral, por lo que se tomó el valor de CV más alta que tuviesen durante el TARGA, o bien si se había suspendido temporalmente en algún momento.

La evolución de la CV en los pacientes del GD₂₀ se ha descrito con detalle en el apartado **3.1.2.** de los **Resultados**. Brevemente, de 314 determinaciones, se obtuvo una CV ≥ 20 copias/mL en 49 casos (incidencia de 0,156, 95% IC 0,12-0,2). Por tanto, se detectaron 28 CV detectables que no se habían detectado con la técnica menos sensible. En 4 de las determinaciones el valor obtenido fue ≥ 200 copias/mL, a pesar que con el ensayo anterior habían resultado indetectables. Las 24 determinaciones restantes estaban entre las 20 y las 200 copias/mL. El número de pacientes con CV detectables ≥ 20 copias/mL fue de 13.

Globalmente, el rango de CV detectables fue de 21 a 51.200 copias/mL, con una media de 1878,77 copias/mL y una mediana de 210 copias/mL. Se presentaron como 8 series de más de 1 CV detectable consecutiva y 15 episodios aislados. Cuando se valoraron únicamente los episodios que cumplían la definición de EVI, se hallaron 21 episodios que se repartieron en 12 pacientes. Seis pacientes presentaron un único EVI, 3 dos EVI y 3 tres episodios. La duración mediana fue de 1 determinación (rango 1-3), con 14 episodios de 1 determinación, 4 de dos determinaciones y 3 de tres determinaciones. La media, mediana y el rango de los EVI fue de 156,26, 87 y 21-631 copias/mL.

Tras la retirada del TARGA la evolución que presentó el rebote viral en los dos grupos, a diferencia de lo que ocurría en el análisis para ≥ 200 copias/mL, fue menos diferente, pues no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados: CV en meses 13 a 18, CV más alta tras la parada, mes de CV más alta o AUC de la CV tras la parada (**Tabla R.2.32.** y **Figuras R.2.38.-R.2.39.**).

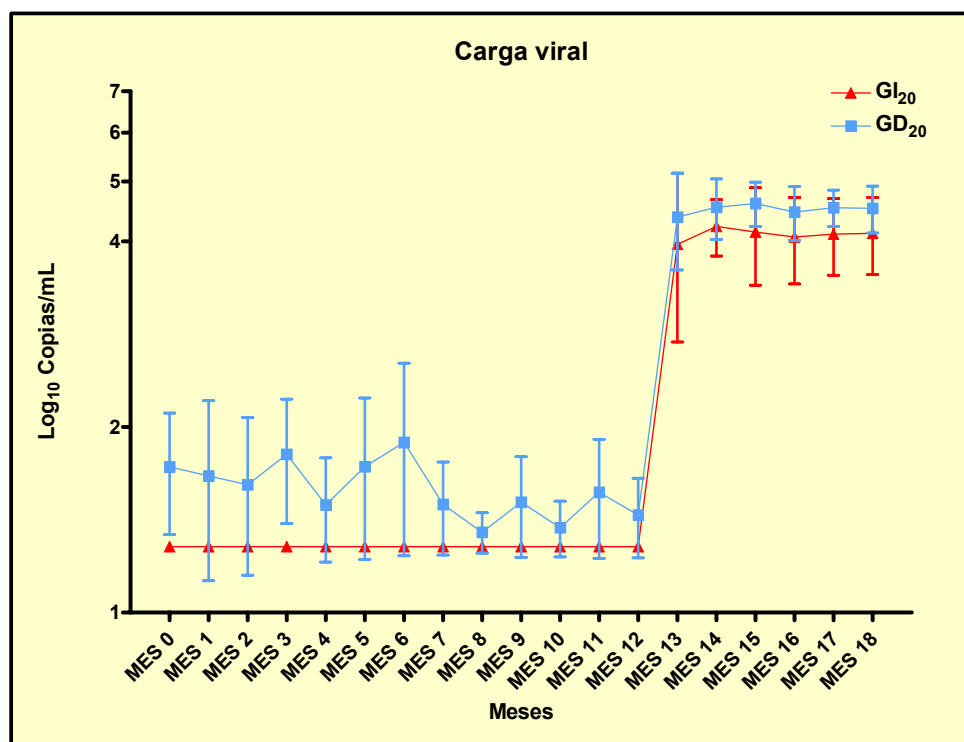


Figura R.238. Cargas virales durante el tratamiento y en el rebote de los grupos detectable e indetectable con el ensayo con límite de detección de 20 copias/mL. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

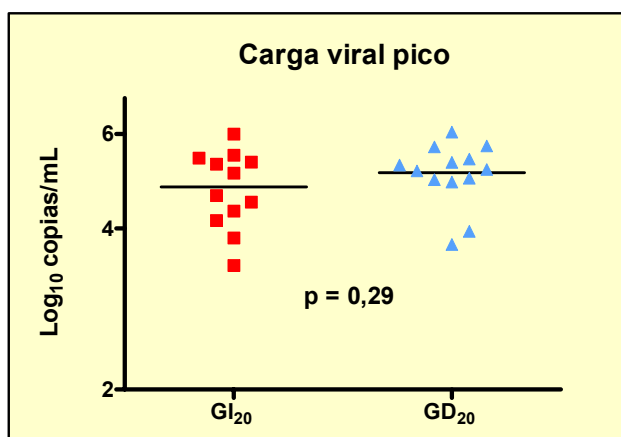


Figura R.239. Comparación de carga viral pico (log₁₀) tras la suspensión del tratamiento. GI₂₀ Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL

Cuando se analizó la proporción de pacientes que al final del estudio tenían menos de 5000 copias/mL, criterio descrito en el protocolo para reiniciar TARGA al final del mismo, se halló que no hubo diferencias entre los grupos: de los 3 pacientes que tenían CV por debajo de esa cifra en el mes 18, 2 pertenecían al GI₂₀ y 1 al GD₂₀ ($p = 1$, test exacto de Fisher).

Tabla R.2.32. Comparación de las características virológicas del rebote entre el grupo detectable para CV ≥ 20 copias/mL y el grupo indetectable para ese mismo límite. Se exponen la media y la desviación típica de cada variable

VARIABLES VIROLÓGICAS EN EL REBOTE	GRUPO INDETECTABLE (< 20 copias/mL)	GRUPO DETECTABLE (≥ 20 copias/mL)	P
Carga viral mes 13 (copias/mL log ₁₀)	3,86 ± 1,5	4,37 ± 1,23	0,38
Carga viral mes 14 (copias/mL log ₁₀)	4,25 ± 0,7	4,54 ± 7,62	0,36
Carga viral mes 18 (copias/mL log ₁₀)	4,21 ± 0,78	4,52 ± 0,62	0,3
Carga viral pico (copias/mL log ₁₀)	4,78 ± 0,77	5,08 ± 0,65	0,29
Mes de carga viral pico	14,83 ± 2,21	15,15 ± 1,91	0,7
Área neta bajo la curva de carga viral	9,81 ± 4,55	12,38 ± 3,47	0,125

Cuando se analizaron los resultados con otras cifras de detectabilidad entre 20 y 200 copias/mL, los resultados fueron intermedios, siempre con menor significación estadística. Así, cuando se compararon detectables con indetectables con límite a partir de 100 copias (número de detectables = 12), la significación estadística bajó (**Tabla R.2.33.**).

Tabla R.2.33. Comparación de variables virológicas en el rebote tras la interrupción del tratamiento entre los grupos que presentaron CV detectables por encima de 100 copias y los que se mantuvieron por debajo de dicho nivel. Se exponen la media y la desviación típica de cada variable

VARIABLES VIROLÓGICAS EN EL REBOTE	PACIENTES CON CV < 100 copias/mL (n = 13)	PACIENTES CON CV ≥ 100 copias/mL (n = 12)	P
Carga viral mes 13 (copias/mL log ₁₀)	3,82 ± 1,44	4,46 ± 1,25	0,26
Carga viral mes 14 (copias/mL log ₁₀)	4,15 ± 0,75	4,69 ± 0,61	0,08
Carga viral pico (copias/mL log ₁₀)	4,7 ± 0,79	5,2 ± 0,53	0,075
Área neta bajo la curva de carga viral	9,53 ± 4,47	12,89 ± 3,06	0,038

Análisis suplementarios mostraron que, cuando se dividieron los pacientes en tres grupos (pacientes sin EVI, pacientes con EVI > 200 copias/mL y pacientes con EVI entre 20 y 200 copias/mL), el rebote fue significativamente diferente entre los tres (p = 0,002 para la CV en el mes 14, p = 0,038 para la CV pico postparada y 0,053 para el área neta bajo la curva de la CV tras la parada) (**Tabla R.2.34.**). De hecho los valores de los pacientes que presentaron EVI entre 20 y 200 copias/mL fueron de un menor rebote viral que incluso los pacientes con CV indetectables.

Tabla R.2.34. Comparación del rebote viral entre los pacientes con CV < 20 copias/mL, 20-200 copias/mL y ≥ 200 copias/mL. Se exponen la media y la desviación típica de cada variable * ANOVA

VARIABLES VIROLÓGICAS EN EL REBOTE	PACIENTES CON CV < 20 copias/mL (n = 12)	PACIENTES CON CV 20- 200 copias/mL (n = 4)	PACIENTES CON CV ≥200 copias/mL (n = 10)	P*
Carga viral mes 13 (copias/mL log ₁₀)	3,86 ± 1,5	3,41 ± 1,14	4,69 ± 1,14	0,26
Carga viral mes 14 (copias/mL log ₁₀)	4,25 ± 0,7	3,14 ± 0,11	4,85 ± 0,35	0,002
Carga viral pico (copias/mL log ₁₀)	4,78 ± 0,77	4,28 ± 0,76	5,33 ± 0,38	0,038
AUC neta de carga viral	9,81 ± 4,55	8,6 ± 5	13,51 ± 2,08	0,053

Cuando se compararon los pacientes con EVI entre 20-200 copias/mL y los pacientes sin EVI, las diferencias del rebote no fueron significativas. Sin embargo, cabe decir que pacientes entre 20 y 200 copias en nuestro estudio sólo fueron 4, de los cuales uno fue *exitus* y por tanto no pudo ser analizado su rebote.

2.3.3. Características del sistema inmune basales y evolución

2.3.3.1. Subpoblaciones linfocitarias

Los cambios experimentados por las diferentes subpoblaciones linfocitarias durante los periodos de tratamiento y parada en función del GI₂₀ o GD₂₀ se pueden observar en las **Figuras R.2.41-R.2.47** y en las **Tablas R.2.35-R.2.37**.

- **Linfocitos totales:** El resultado del análisis fue similar al realizado entre GD y GI con límite de 200 copias/mL, con la única diferencia que el descenso de linfocitos durante la fase de tratamiento también fue significativa no sólo en el GI₂₀ (p = 0,018), sino también en GD₂₀ (p = 0,04), sin diferencias entre grupos.

- **Linfocitos CD4⁺:** Respecto al análisis con CV 200 copias/mL, el GD₂₀ presentó basalmente menos linfocitos T CD4⁺ de forma más significativa (p = 0,035), la caída global tras la parada de tratamiento en el GD₂₀ fue más significativa (p = 0,029), si bien no fue tan marcada al inicio del periodo, y fue más similar a la del GI₂₀. De hecho, cuando se compararon las caídas porcentuales de la proporción de linfocitos T CD4⁺ entre los meses 12 y 13 y los meses 12 y 18, no hubieron diferencias significativas (p = 0,52 y 0,61, respectivamente).

Cuando se analizó por medio de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier los pacientes que cayeron en al menos una determinación por debajo de 500 linfocitos T CD4⁺/mm³ a partir del mes 12, tampoco se hallaron diferencias significativas (p = 0,71) (Figura R.2.40.).

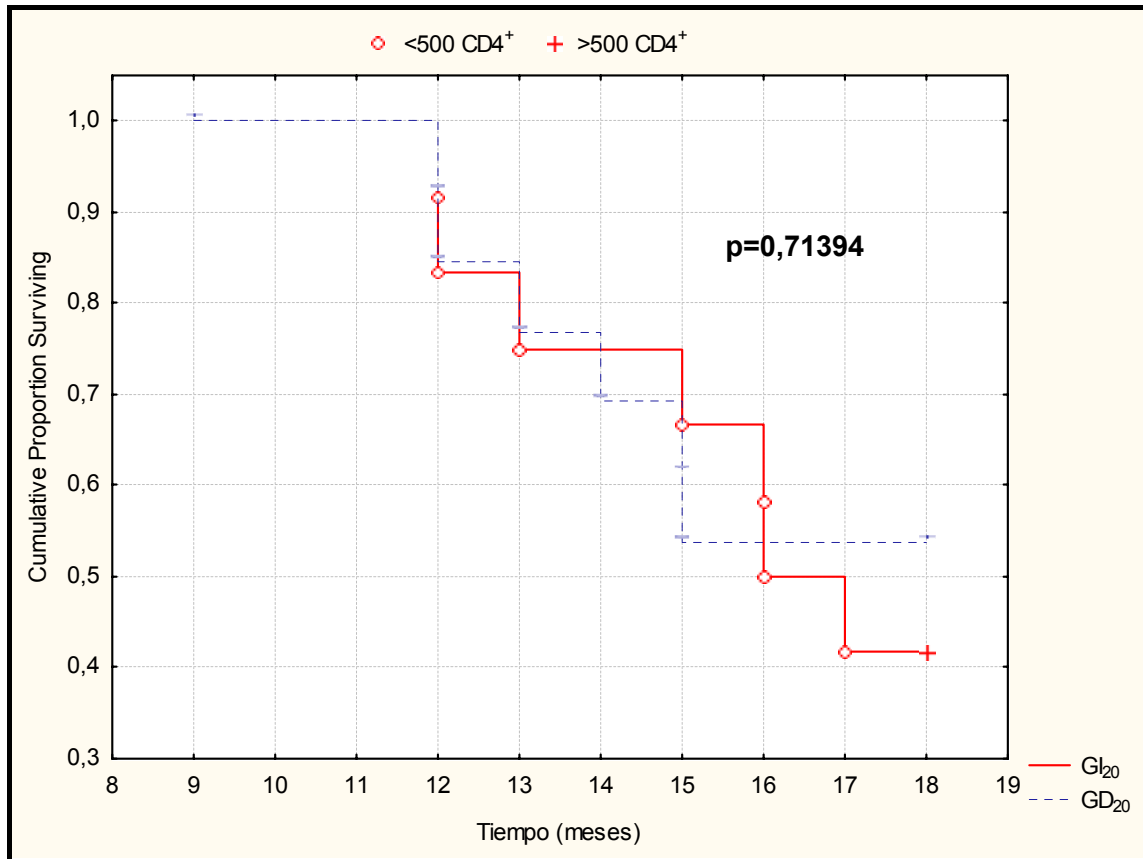


Figura R.2.40. Curva de Kaplan Meier en la que se observa la proporción de pacientes que permanecen con una cifra de linfocitos T CD4⁺ totales superior a 500 células/mm³ tras la parada de tratamiento (mes 12) hasta el fin del protocolo (mes 18) (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

- Linfocitos CD8⁺: El GD₂₀ presentó de forma basal una mayor proporción de linfocitos T CD8⁺ que el GI₂₀, diferencia que en esta ocasión sí llegó a ser significativa (p = 0,029). Además, durante el periodo de tratamiento, aunque como en el análisis para 200 copias/mL ambos grupos descendieron significativamente, el GD₂₀ no descendió tanto como en el GI₂₀, de forma que el AUC fue significativamente superior (p = 0,045). Asimismo, durante el periodo de parada, el aumento en el GD₂₀ tuvo tendencia a ser significativamente mayor cuando

se compararon las AUC en este periodo ($p = 0,065$) o las diferencias 12-18 entre grupos ($p = 0,082$).

- Cociente $CD4^+/CD8^+$: Como en el caso de los linfocitos T $CD8^+$, el cociente $CD4^+/CD8^+$ en el análisis para CV menores y mayores de 20 copias/mL fue básicamente mayor en el GI_{20} de forma significativa ($p = 0,012$). Y en este caso sí que, durante el periodo de tratamiento, aumentó significativamente más en el GI_{20} que el GD_{20} ($p = 0,041$ en la comparación de las AUC en el periodo de tratamiento). Tras la parada el análisis fue el mismo que para los GI y GD según el límite de 200 copias/mL.

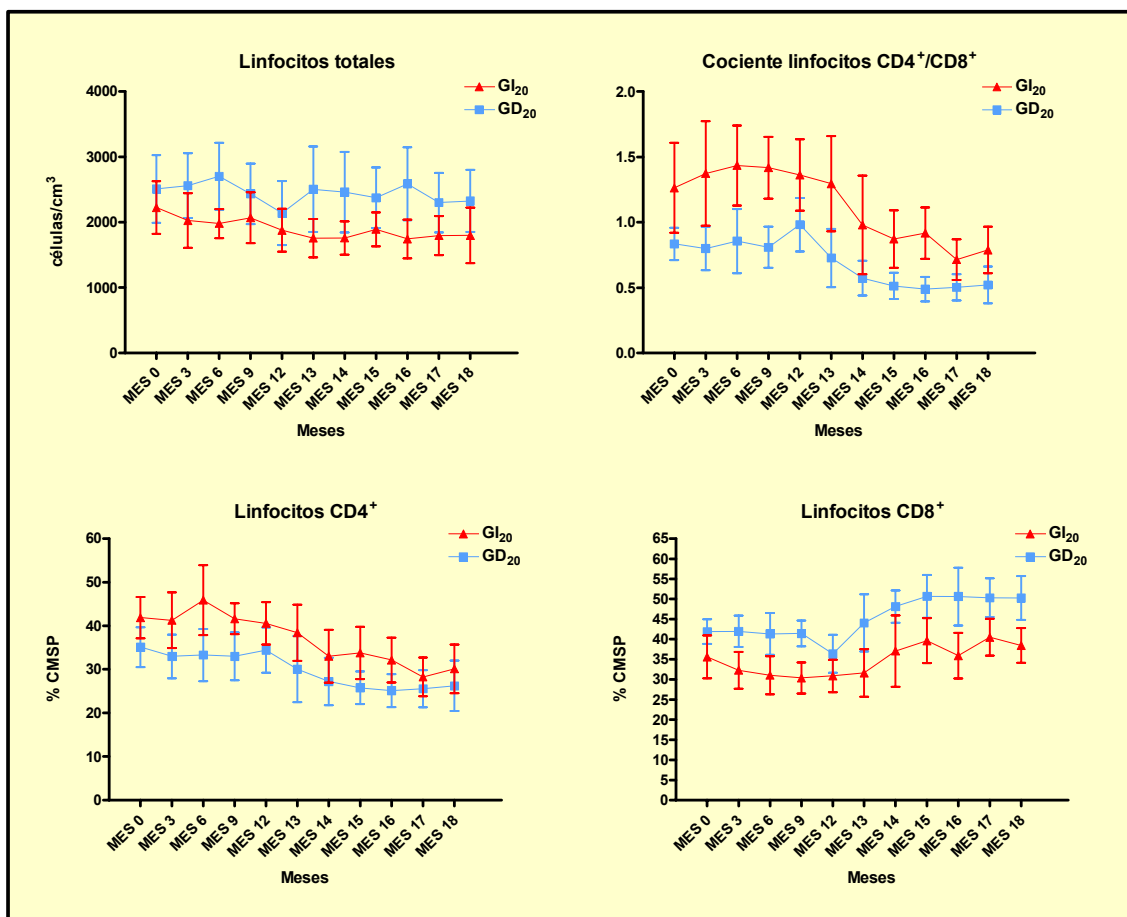


Figura R.241. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos totales, $CD4^+$, $CD8^+$ y su cociente. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI_{20} : Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD_{20} : Grupo Detectable \geq 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

Tabla R.2.35. Evolución de las subpoblaciones linfocitarias durante el período tratamiento e interrupción por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de la proporción de cada población (P* de la diferencia 12-18 intragrupos)

Subpoblaciones linfocitarias	Grupo Indetectable (<20 copias/mL)			Grupo Detectable (≥ 20 copias/mL)			P	P*
	Mes 0	Mes 12	Mes 18	Mes 0	Mes 12	Mes 18		
Linfocitos (células/mm ³)	2224,17 ± 633,482	1877,5 ± 518,85	1799,17 ± 665,71	2510 ± 897,27	2140,77 ± 809,78	2326,67 ± 749	0,04	0,28
CD4 ⁺	41,87 ± 7,43	40,57 ± 7,66	30,12 ± 8,8	35,11 ± 7,92	34,41 ± 8,61	26,22 ± 9,08	0,5	0,029
CD8 ⁺	35,59 ± 8,36	30,89 ± 6,36	38,44 ± 6,79	41,88 ± 5,3	36,38 ± 7,75	50,25 ± 8,58	0,01	< 0,001
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,26 ± 0,54	1,36 ± 0,43	0,79 ± 0,28	0,83 ± 0,21	0,98 ± 0,34	0,52 ± 0,22	0,17	0,002
CD4 ⁺ CD28 ⁻	91,99 ± 9,37	93,95 ± 6,9	93,34 ± 6,81	91,68 ± 8,69	93,64 ± 5,41	93,97 ± 5,41	0,99	0,7
CD4 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	6,12 ± 7,77	4,83 ± 6,11	4,9 ± 5,88	7,09 ± 7,76	5,53 ± 4,96	4,77 ± 4,44	0,75	0,86
CD4 ⁺ CD38 ⁻	48,91 ± 8,91	51,5 ± 12,5	57,1 ± 12,62	40,66 ± 11,83	45,22 ± 14,49	50,92 ± 11,97	0,21	0,33
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	2,3 ± 1,35	2,01 ± 1,13	3,68 ± 1,49	2,46 ± 1,55	3,18 ± 1,99	5,63 ± 3,83	0,25	0,038
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	3,35 ± 6,12	4,19 ± 4,72	4,33 ± 3,6	1,23 ± 0,7	4,74 ± 6,1	3,4 ± 1,71	0,073	0,4
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	36,32 ± 1,95	38,65 ± 13,75	41,96 ± 11,83	30,37 ± 10,77	32,15 ± 11,32	33,57 ± 8,94	0,19	0,83
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	48,55 ± 9,74	51,77 ± 14,29	50,65 ± 14,81	51,33 ± 11,48	59,06 ± 13,61	60,6 ± 8,7	0,008	0,4
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	34,68 ± 13,53	40,19 ± 17,21	44,51 ± 13,24	28,85 ± 11,58	32,09 ± 13,15	34,44 ± 9,35	0,49	0,53
CD4 ⁺ CD25 ⁻	2,78 ± 0,93	5,41 ± 3,37	4,87 ± 3,81	1,48	3,46 ± 1,28	4,01 ± 2,83	-	0,56
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	22,89 ± 24,76	36,79 ± 22,14	34,23 ± 28,03	18,37 ± 19,06	34,44 ± 29,44	27,42 ± 12,66	0,22	0,35
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	4,14 ± 2,54	3,45 ± 3,08	4,26 ± 3,7	1,95 ± 1,23	3,91 ± 3,05	4,82 ± 3,12	0,025	0,16

Tabla R.2.35. (continuación)

Subpoblaciones linfocitarias	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo Detectable (>20 copias/mL)			
	Mes 0	Mes 12	Mes 18	P	Mes 0	Mes 12	Mes 18	P
CD8 ⁺ CD28 ⁻	54,10 ± 15,2	59,09 ± 14,39	50,03 ± 7,57	0,001	49,26 ± 8,67	53,31 ± 11,91	44,73 ± 8,74	0,25
CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	35,24 ± 14,09	31,38 ± 12,38	31,9 ± 6,8	0,019	36,5 ± 9,68	36,97 ± 10,35	32,93 ± 9,2	0,036
CD8 ⁺ CD38 ⁻	32,07 ± 8,96	34,75 ± 10,86	55,21 ± 13,22	0,8	26,66 ± 9,8	37,3 ± 12,87	58,09 ± 8,64	0,001
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	6,33 ± 3	7,97 ± 3,75	23,52 ± 9,7	0,24	6,23 ± 3,22	11,26 ± 6,36	29,54 ± 9,89	0,005
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	6,37 ± 7,26	10,41 ± 6,55	13 ± 11,53	0,25	1,48 ± 1,16	11,83 ± 8,74	11,22 ± 4,92	0,001
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁻	53,32 ± 11,29	51,95 ± 9,94	39,7 ± 9,48	0,57	53,62 ± 14,31	53,77 ± 15,41	42,36 ± 15,06	0,57
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	28,09 ± 16,28	37,45 ± 17,58	28,34 ± 7,24	0,15	26,19 ± 10,58	27,63 ± 8,33	23,84 ± 8,54	0,95
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	32,4 ± 10,33	35,01 ± 9,96	46 ± 12,1	0,07	30,41 ± 11,45	31,63 ± 12,47	45,35 ± 15,57	0,001
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	17,39 ± 21,11	30,56 ± 12,4	19,53 ± 15,8	0,11	13,95 ± 21,93	32,27 ± 23,52	18,93 ± 8,82	0,13
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	11,57 ± 3,24	11,7 ± 7,19	13,42 ± 13,44	0,95	8,92 ± 6,39	12,48 ± 7,87	16,74 ± 9,67	0,054

Resultados

Tabla R.2.36. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de las subpoblaciones celulares en los grupos detectable e indetectable con límite de 20 copias/mL

Subpoblaciones linfocitarias	Mes 0 (basal)	Periodo tratamiento (meses 0-12)	Periodo sin tratamiento (meses 12-18)
	P	P	P
Linfocitos totales (cel/mm ³)	0,36	0,86	0,32
CD4 ⁺	0,035	0,98	0,58
CD8 ⁺	0,029	0,8	0,082
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,012	0,83	0,57
CD4 ⁺ CD28 ⁺	0,93	0,1	0,79
CD4 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	0,75	0,19	0,82
CD4 ⁺ CD38 ⁺	0,059	0,89	0,89
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	0,77	0,18	0,47
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	0,26	0,38	0,55
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	0,19	0,9	0,43
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	0,52	0,17	0,32
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	0,25	0,5	0,54
CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,35	0,85	0,58
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	0,6	0,94	0,61
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	0,015	0,063	0,77
CD8 ⁺ CD28 ⁺	0,34	0,53	0,85
CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺	0,79	0,036	0,11
CD8 ⁺ CD38 ⁺	0,16	0,061	0,88
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	0,93	0,094	0,48
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	0,04	0,13	0,6
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	0,95	0,97	0,82
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	0,72	0,15	0,25
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	0,65	0,88	0,49
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	0,69	0,75	0,59
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	0,21	0,19	0,57

- Linfocitos CD4⁺CD28⁺: Como única diferencia respecto al análisis con CV 200 copias/mL, el GI₂₀ presentó durante el tratamiento un aumento con tendencia a la significación estadística de esta población (p = 0,064), y que tuvo tendencia asimismo a ser significativamente mayor que el aumento en el GD₂₀ (p = 0,065 para la comparación entre AUC durante el periodo de tratamiento). Tras la parada no existieron cambios significativos intra o intergrupos.

- Linfocitos CD4⁺CD28⁻CD57⁺: A diferencia del análisis a 200 copias/mL, el GD₂₀ presentó niveles superiores de esta población pero de forma no significativa, sin cambios significativos durante los periodos de tratamiento y parada.

- Linfocitos $CD4^+CD38^+$: En el análisis a 20 copias/mL el GD_{20} presentó, de forma basal, una proporción de esta población con tendencia a ser significativamente menor que el GI_{20} ($p = 0,059$), sin otras diferencias valorables.

- Linfocitos $CD4^+CD38^+HLADR^+$: Comparando con el análisis a 200 copias/mL, se minimizaron en ambos grupos las tendencias que presentaban entre los 6 y 12 meses (GI a aumentar y GD a disminuir), de forma que ambos aumentaron, sin existir diferencias entre ellos. Siguieron siendo significativos los aumentos entre los meses 12 y 15 en ambos grupos ($p = 0,001$ y $0,038$ para GI_{20} y GD_{20} , respectivamente) y también mayor y más precoz en GD_{20} , pero las diferencias disminuyeron ($p = 0,09$ para la diferencia de gradientes entre los meses 12 y 14 entre grupos y $p = 0,15$ para la comparación entre las AUC por grupo tras la parada).

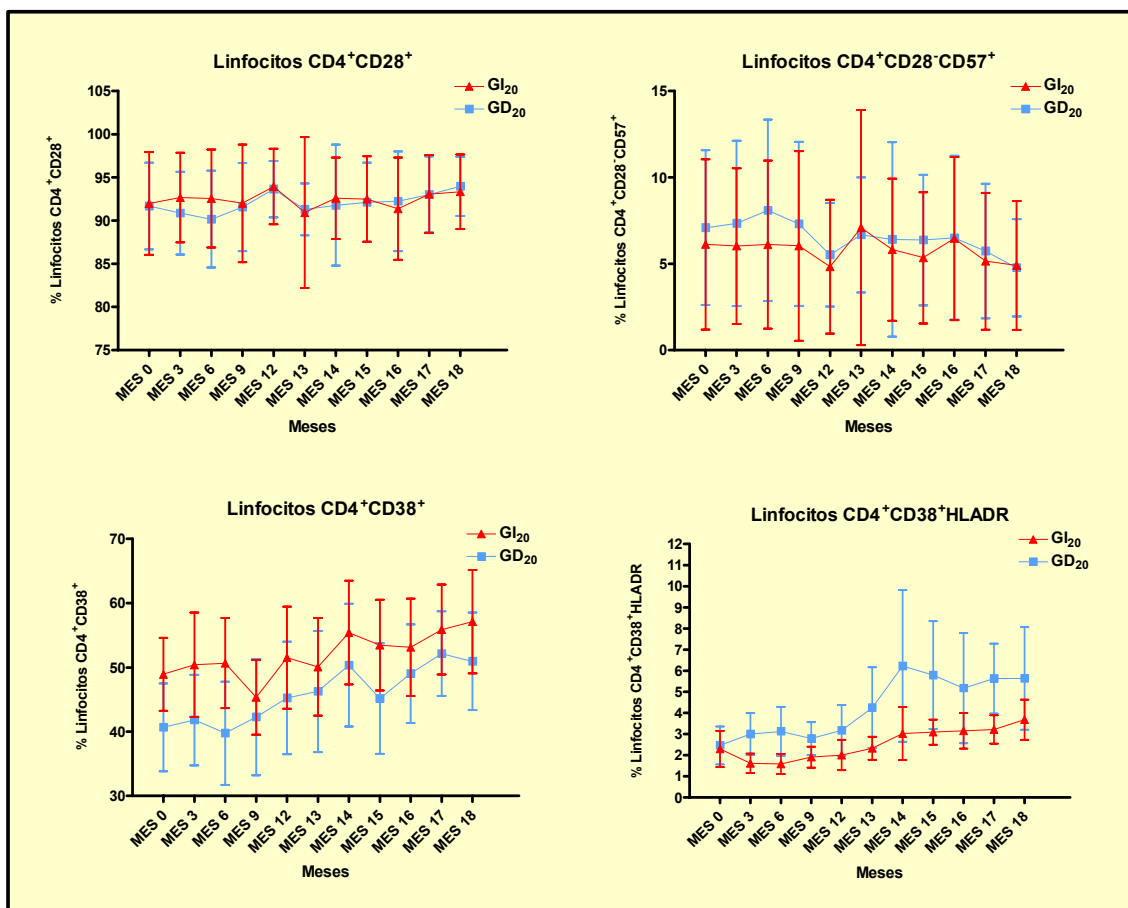


Figura R.2.42. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CD28^-CD57^+$, $CD4^+CD38^+$ y $CD4^+CD38^+HLADR^+$. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI_{20} : Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD_{20} : Grupo Detectable \geq 20 copias/mL)

Resultados

Tabla R.2.37. Áreas netas bajo la curva de las diferentes subpoblaciones linfocitarias durante el periodo con y sin tratamiento (meses 12-18). Se exponen la media y la desviación típica de cada variable. P* Diferencia 0-12 entre grupos; P ** Diferencia 12-18 entre grupos.

Subpoblaciones linfocitarias	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL)		Grupo Detectable (>20 copias/mL)		P*	P**
	Meses 0-12	Meses 12-18	Meses 0-12	Meses 12-18		
Linfocitos totales (cel/mm ³)	-2397,37 ± 3467,21	-80,83 ± 2088,04	-298,78 ± 4659,17	1245,85 ± 3041,4	0,21	0,22
CD4 ⁺	7,41 ± 70,12	-43,09 ± 23,12	-22,37 ± 42,88	-45,06 ± 29,79	0,2	0,86
CD8 ⁺	-47,25 ± 39,09	35,02 ± 47,34	-19,36 ± 23,54	66,44 ± 32,98	0,045	0,065
Cociente CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,35 ± 2,38	-2,35 ± 1,74	-0,22 ± 1,22	-2,38 ± 1,52	0,041	0,97
CD4 ⁺ CD28 ⁺	6,66 ± 16,97	-8,25 ± 13,2	-8,1 ± 21,27	-6,81 ± 23,39	0,065	0,85
CD4 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	-2,62 ± 18,14	2,7 ± 12,41	3,94 ± 22,34	1,04 ± 20,68	0,42	0,81
CD4 ⁺ CD38 ⁺	1,56 ± 72,48	13,36 ± 46,79	7,43 ± 42,82	23,14 ± 72,68	0,8	0,7
CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	-5,91 ± 15,29	5,45 ± 6,37	4,55 ± 20,27	13,78 ± 18,68	0,16	0,15
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	-6,26 ± 69,96	-4,59 ± 28,99	24,29 ± 34,91	-2,49 ± 34,15	0,16	0,87
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	26,04 ± 79,24	7,88 ± 35,02	-19,36 ± 108,18	0,16 ± 47,72	0,21	0,65
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	28,49 ± 54,89	-1,55 ± 37,35	86,14 ± 105,46	1,55 ± 49,01	0,1	0,86
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	48,19 ± 143,52	5,34 ± 62,43	-21,67 ± 86,61	0,94 ± 58,05	0,14	0,86
CD4 ⁺ CD25 ⁺	6,18 ± 10,98	-5,12 ± 19,28	2,32 ± 4,82	-0,56 ± 5,51	0,32	0,44
CD4 ⁺ CXCR4 ⁺	81,73 ± 250,45	-20,39 ± 117,1	55,95 ± 287,44	-44,5 ± 175,07	0,81	0,69
CD4 ⁺ CCR5 ⁺	-2,97 ± 47,16	0,12 ± 11,38	21,41 ± 22,05	2,92 ± 17,17	0,096	0,64
CD8 ⁺ CD28 ⁺	26,06 ± 48,83	-50,74 ± 41,03	-28,05 ± 32,48	-53,89 ± 64,96	0,003	0,89
CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺	-30,18 ± 48,91	7,91 ± 39,63	18,04 ± 45,52	-19,38 ± 44,48	0,016	0,12
CD8 ⁺ CD38 ⁺	-13,04 ± 56,45	105,43 ± 66,77	41,79 ± 100,71	108,42 ± 82,69	0,11	0,92
CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLADR ⁺	3,52 ± 31,77	79,76 ± 39,01	30,9 ± 43,83	108,44 ± 82,15	0,085	0,28
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺	6,55 ± 90,12	7,93 ± 46	76,77 ± 54,13	-0,68 ± 55,38	0,022	0,68
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	8,56 ± 51,06	-54,54 ± 31,75	-14,02 ± 92,06	-64,15 ± 38,24	0,46	0,5
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺	100,06 ± 156,7	-32,59 ± 67,71	-35,61 ± 76,36	-30,27 ± 30,82	0,015	0,91
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	29,48 ± 45,94	48,09 ± 34,26	39,39 ± 54,43	67,79 ± 49,7	0,62	0,26
CD8 ⁺ CXCR4 ⁺	106,88 ± 207,04	-48,42 ± 71,35	130,95 ± 293,17	-81,92 ± 140,32	0,81	0,46
CD8 ⁺ CCR5 ⁺	2,85 ± 70,68	0,37 ± 26,68	29,63 ± 50,4	9,82 ± 42,99	0,27	0,52

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺: Respecto al análisis para 200 copias/mL, el GD₂₀ presentó un aumento más significativo en el periodo de tratamiento (p = 0,021 para la diferencia 0-6 y 0,073 para la diferencia 0-12), pero igualmente sin diferencias significativas entre grupos, ni durante el tratamiento ni en la parada.

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: La tendencia a la diferencia basal entre grupos disminuyó con el análisis a 20 copias (p = 0,19 en lugar de 0,076), manteniéndose el resto de tendencias.

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺: El análisis fue similar que el realizado para los grupos en función de 200 copias/mL de CV, excepto que el aumento en el GI₂₀ durante

el tratamiento fue menos significativo que para el GI ($p = 0,134$ para la diferencia 0-6 en GI_{20} y $p = 0,029$ para la misma diferencia en GI).

- Linfocitos $CD4^+CD45RA^+CD62L^+$: La evolución de GI_{20} y GD_{20} fue superponible a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

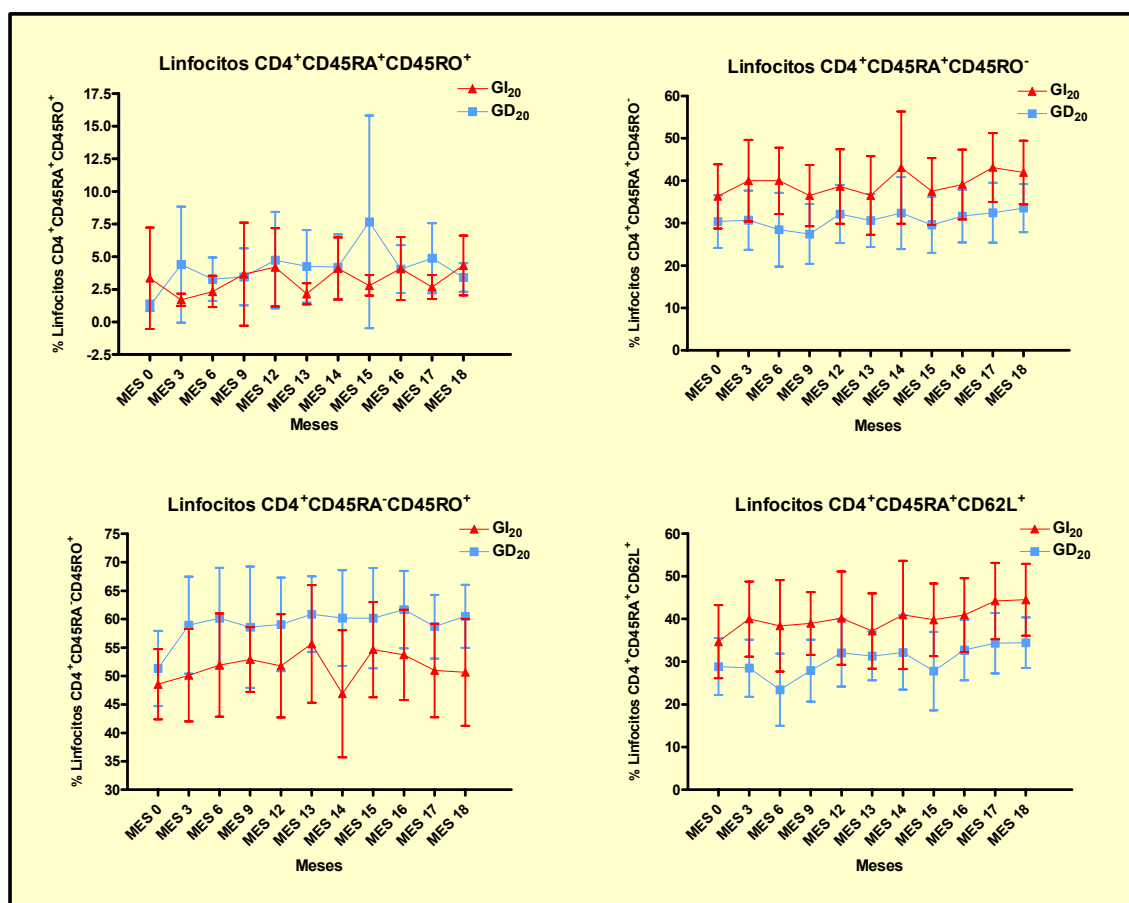


Figura R.2.43. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de $CD4^+CD45RA^+CD45RO^+$, $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$, $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$ y $CD4^+CD45RA^+CD62L^+$. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI_{20} : Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD_{20} : Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

- Linfocitos $CD8^+CD28^+$: La evolución de GI_{20} y GD_{20} fue superponible a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

- Linfocitos $CD8^+CD28^-CD57^+$: A diferencia del análisis para 200 copias/mL, cuando el análisis se realizó para 20 copias sí aparecieron cambios significativos inter e intragrupos. Durante el periodo de tratamiento GI_{20} y GD_{20} presentaron tendencias diferentes,

disminuyendo el primero de forma significativa ($p = 0,019$) y manteniéndose el segundo, siendo significativa la diferencia entre ambos en este periodo ($p = 0,036$ para la diferencia de gradientes 0-12 y $0,016$ para el AUC en este periodo). Tras la suspensión, también fue significativo el descenso de esta población en el GD₂₀ ($p = 0,036$), aunque sin diferencias entre grupos.

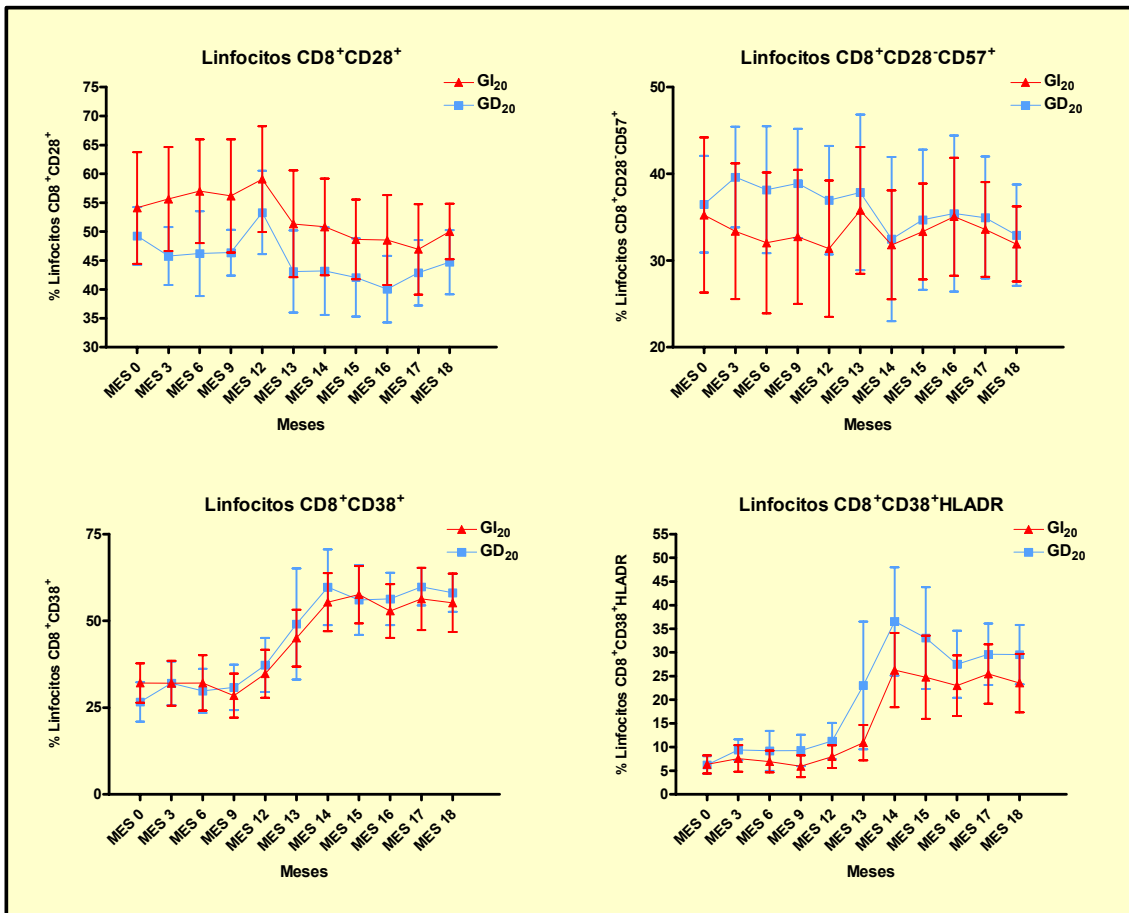


Figura R.2.44. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos CD8⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁺CD57⁺, CD8⁺CD38⁺ y CD8⁺CD38⁺HLADR⁺. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

- Linfocitos CD8⁺CD38⁺: Las diferencias que existían basales entre las poblaciones GI y GD disminuyeron al realizar el análisis a 20 copias/mL ($p = 0,16$). Durante la fase de tratamiento, además de perderse las diferencias entre los meses 0-3 ($p = 0,14$ para la diferencia de gradientes, por el contrario de $0,061$ en la comparación entre GD y GI para el mismo gradiente), el aumento significativo ($p = 0,002$) que experimentó el GD₂₀ entre los meses

0 y 12 tuvo tendencia a ser significativamente mayor que el cambio en el GI₂₀ ($p = 0,061$ para la diferencia de gradientes).

- Linfocitos CD8⁺CD38⁺HLADR⁺: Respecto al análisis a 200 copias/mL, se produjo un aumento de las diferencias entre grupos. Durante la fase de tratamiento, el aumento que experimentó el GD₂₀ tendió a ser significativamente mayor que el cambio en el GI₂₀ ($p = 0,094$ para la diferencia de gradientes 0-12 y $0,085$ para la diferencia de AUC en el periodo de tratamiento). El resto de tendencias se mantuvieron de forma similar que para el análisis a 200 copias/mL.

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺: La única diferencia con respecto al análisis a 200 copias/mL en esta subpoblación es que, en este caso, el aumento durante el periodo de tratamiento en el GD₂₀ fue significativamente mayor que en el GI₂₀ ($p = 0,022$ en la comparación de AUC).

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue superponible a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue superponible a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue superponible a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

- Linfocitos CD4⁺CXCR4⁺: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

- Linfocitos CD4⁺CCR5⁺: A diferencia del análisis a 200 copias, en este caso se hallaron diferencias significativas en la evolución de estas poblaciones durante el periodo de tratamiento, de forma que se produjo un aumento en ambos grupos con tendencia a ser significativamente mayor en el GD₂₀ que en el GI₂₀ ($p = 0,063$ para la diferencia de gradientes entre los meses 0 y 12 y $p = 0,096$ para el AUC durante este periodo).

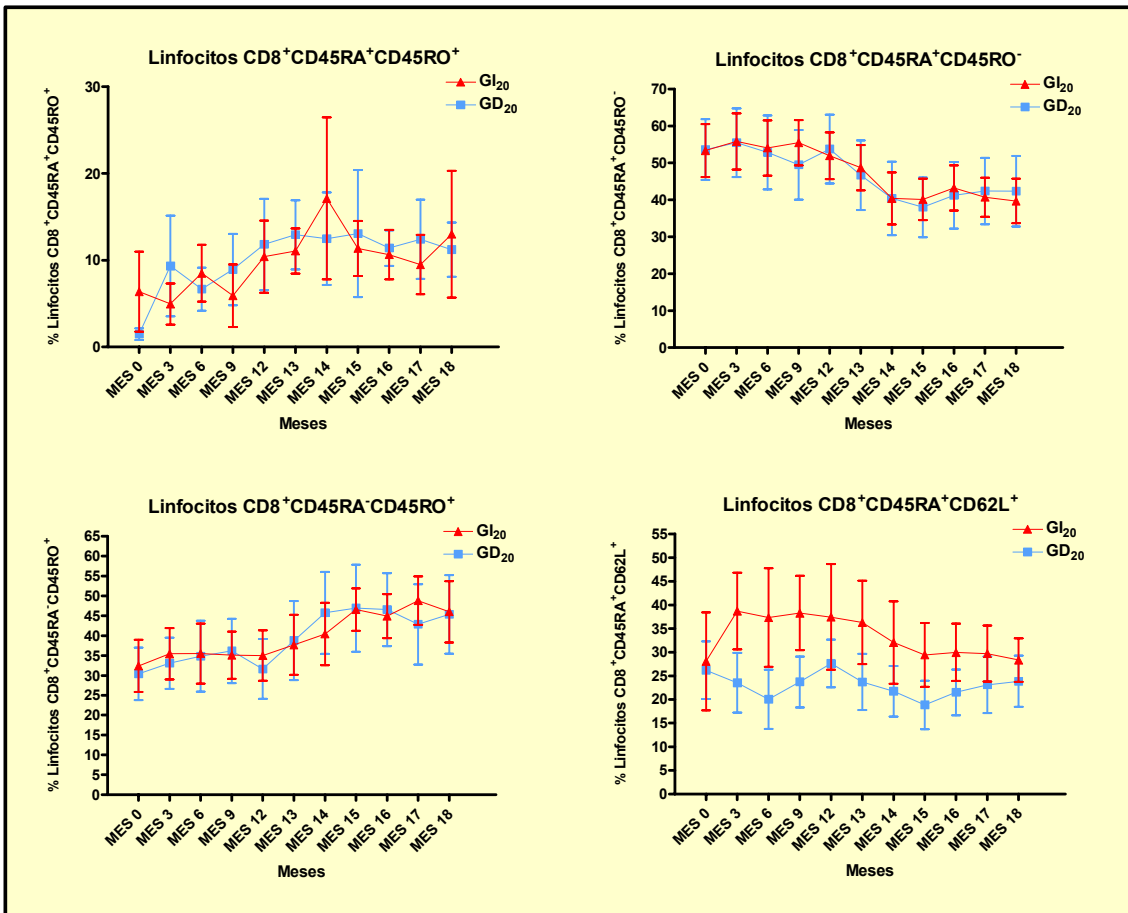


Figura R.2.45. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻, CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ y CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

- Linfocitos CD8⁺CXCR4⁺: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.
- Linfocitos CD8⁺CCR5⁺: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.
- Linfocitos CD4⁺CD25⁺: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

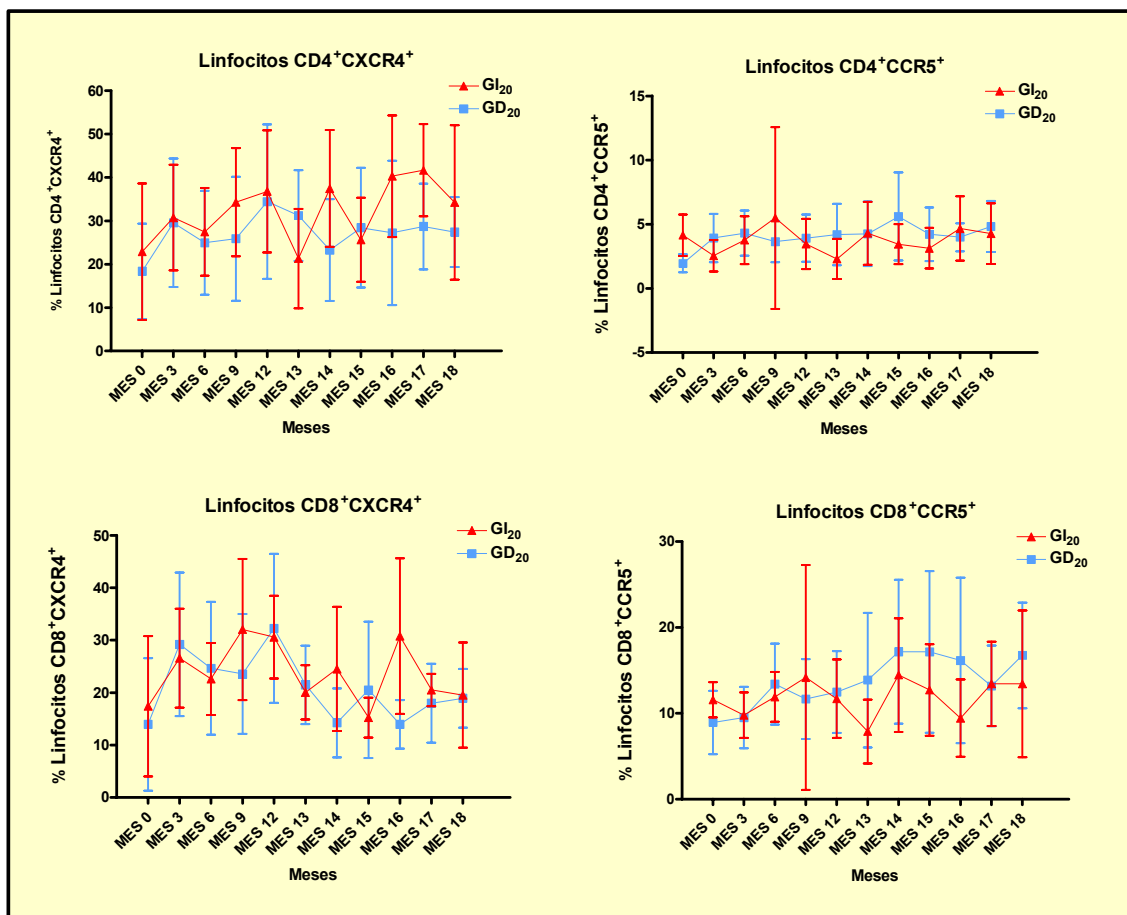


Figura R.246. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos CD4⁺CXCR4⁺, CD4⁺CCR5⁺, CD8⁺CXCR4⁺ y CD8⁺CCR5⁺. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

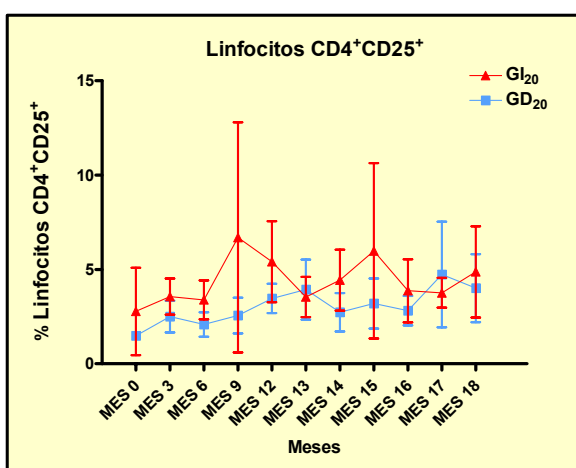


Figura R.247. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de la subpoblación celular de linfocitos CD4⁺CD25⁺. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

2.3.3.2. Subpoblaciones linfocitarias en proliferación

Los cambios experimentados en la proliferación de las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo *naïve* se pueden observar en la Figura R.2.48. y en las Tablas R.2.38-R.2.40.

- CD4⁺CD45RA⁺Ki-67⁺: En el análisis para 20 copias/mL, el GD₂₀ presentó de forma basal una mayor proporción de esta población de forma más significativa (p = 0,016). El resto de cambios fueron similares a los descritos en el análisis para 200 copias/mL.
- CD8⁺CD45RA⁺Ki-67⁺: Respecto al análisis para 200 copias/mL, las diferencias entre grupos durante los periodos de tratamiento e interrupción tendieron a disminuir, de forma que no se observaron diferencias significativas entre grupos.

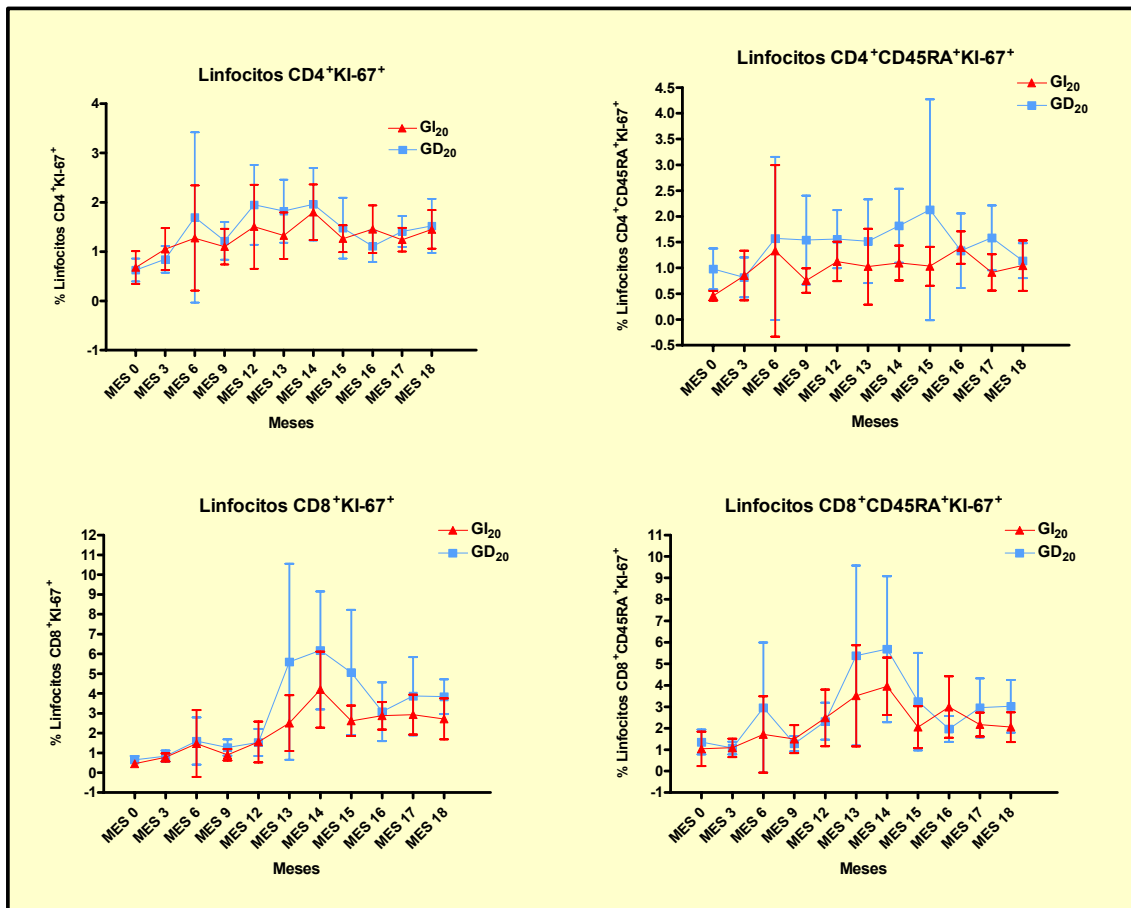


Figura R.2.48. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las subpoblaciones celulares de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ CD45RA⁺ en proliferación (con el marcaje Ki-67⁺). Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

Tabla R.2.38. Evolución de las subpoblaciones linfocitarias en proliferación durante el periodo tratamiento e interrupción por grupos detectable e indetectable con el ensayo con límite de sensibilidad de 20 copias/mL. Se expresa la media y la desviación típica de la proporción de cada población

Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo Detectable (\geq 20 copias/mL)				
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	P
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	1,14 ± 0,69	1,69 ± 0,53	0,001	3,95 ± 1,53	1,06 ± 0,39	2,28 ± 0,92	< 0,001	4,79 ± 1,96	< 0,001
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	0,68 ± 0,49	1,5 ± 1,34	0,12	1,45 ± 0,61	0,63 ± 0,4	1,95 ± 1,34	0,006	1,52 ± 0,86	0,37
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	0,46 ± 0,24	1,55 ± 1,63	0,051	2,72 ± 1,62	0,65 ± 0,34	1,53 ± 1,13	0,007	3,84 ± 1,37	< 0,001
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	0,46 ± 0,14	1,12 ± 0,6	0,006	1,04 ± 0,77	0,98 ± 0,69	1,56 ± 0,93	0,123	1,14 ± 0,53	0,17
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	1,04 ± 1,2	2,48 ± 2,07	0,018	2,05 ± 1,09	1,35 ± 1	2,32 ± 1,43	0,093	3,02 ± 1,93	0,13

Tabla R.2.39. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de las subpoblaciones celulares en proliferación entre los grupos detectable e indetectable con límite de 20 copias/mL.

Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	Mes 0 (basal)		Periodo tratamiento (meses 0-12)		Periodo sin tratamiento (meses 12-18)	
	P		P		P	
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	0,72		0,007		0,63	
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	0,79		0,38		0,53	
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	0,13		0,7		0,054	
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	0,016		0,93		0,32	
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	0,48		0,64		0,16	

Tabla R.2.40. Áreas netas bajo la curva de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en proliferación durante el periodo con y sin tratamiento (meses 12-18). P* Diferencia 0-12 entre grupos; P ** Diferencia 12-18 entre grupos. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable

Subpoblaciones linfocitarias en proliferación	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL)		Grupo Detectable (≥ 20 copias/mL)		P*	P**
	Meses 0-12	Meses 12-18	Meses 0-12	Meses 12-18		
CD3 ⁺ Ki-67 ⁺	4,89 ± 8,05	10,76 ± 6,05	11,37 ± 10,28	18,28 ± 15,83	0,09	0,13
CD4 ⁺ Ki-67 ⁺	3,58 ± 7,04	-0,56 ± 7,79	6,93 ± 7,73	-1,78 ± 8,3	0,26	0,71
CD8 ⁺ Ki-67 ⁺	6,47 ± 7,56	7,65 ± 9,28	6,41 ± 7,83	19,81 ± 24,48	0,98	0,12
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	5,38 ± 9,64	-0,87 ± 2,79	3,78 ± 10,06	1,92 ± 13,22	0,68	0,48
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺	4,67 ± 11,6	0,91 ± 13,87	5,1 ± 10,09	5,37 ± 20,77	0,92	0,54

2.3.3.3. Respuestas linfoproliferativas

Los cambios experimentados por las respuestas linfoproliferativas durante la fase de tratamiento y tras la interrupción en el GI₂₀ y GD₂₀ se pueden observar en las **Figuras R.2.49-R.2.51.** o en las **Tablas R.2.41-R.2.43.**

- Respuestas linfoproliferativas a mitógenos:

- Fitohemaglutinina al 0,5%: Respecto al análisis para 200 copias/mL, se acentuaron más las diferencias entre los grupos en la primera parte del periodo de parada, de forma que el GI₂₀ presentó un ascenso casi significativo entre los meses 12-15 (p = 0,083), mientras que el GD₂₀ descendió en ese periodo (p = 0,063), siendo significativa la diferencia de gradientes entre grupos (p = 0,01). Consecuentemente, también fue mayor significativamente el AUC tras la parada en el GI₂₀ (p = 0,043). El resto de tendencias fueron similares a las halladas para el análisis de 200 copias/mL.

- Fitohemaglutinina al 1%: Ocurre como en las respuestas a PHA 0,5%. Tras la parada el GI₂₀ presentó un ascenso casi significativo entre los meses 12-15 (p = 0,059), mientras que el GD₂₀ descendió en ese periodo (p = 0,074), siendo significativa la diferencia de gradientes entre grupos (p = 0,009). También el AUC en el periodo sin TARGA fue mayor en el GI₂₀ (p = 0,012). El resto de tendencias fueron similares a las halladas para el análisis de 200 copias/mL.

Tabla R.2.41. Evolución de las respuestas linfoproliferativas durante el periodo de tratamiento y tras su interrupción en los grupos detectable e indetectable en función del límite de 20 copias/mL. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable

Índice de estimulación	Grupo Indetectable (<20 copias/mL)				Grupo Detectable (> 20 copias/mL)				
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	
Fitoheماغلутimina 0,5	35,32 ± 36,63	28,63 ± 34,88	0,85	35,59 ± 40,51	18,29 ± 22,47	0,68	53,21 ± 56,17	0,12	30,55 ± 22,59
Fitoheماغلутimina 1%	6,63 ± 8,81	14,01 ± 15,45	0,18	30,73 ± 32,38	11,04 ± 11,75	0,059	36,56 ± 48,35	0,16	23,43 ± 14,86
Anticuerpo anti-CD3	17,69 ± 18,02	14,78 ± 15,79	0,79	29,99 ± 32,63	10,5 ± 8,73	0,23	30,75 ± 28,63	0,051	24,9 ± 19,62
AntiCD3 + antiCD28	38,28 ± 31,33	22,75 ± 28,31	0,39	42,75 ± 33,04	19,45 ± 16,81	0,39	54,94 ± 51,24	0,1	40,62 ± 29,5
Mitógeno Pokeweed	17,37 ± 10,08	15,95 ± 19,68	0,15	14,8 ± 19,17	20,94 ± 11,6	0,94	16,54 ± 8,12	0,36	11,9 ± 8,74
Toxoides Tetánico	2,79 ± 2,5	1,7 ± 1,11	0,44	1,81 ± 1,37	6,04 ± 10,96	0,78	2,13 ± 1,59	0,41	2,13 ± 3,51
Citomegalovirus	2,58 ± 1,32	1,85 ± 0,97	0,24	2,45 ± 1,44	2,08 ± 0,98	0,074	2,35 ± 2,41	0,93	3,31 ± 2,84
gp160	1,79 ± 1,38	1,47 ± 0,87	0,92	1,58 ± 1,04	2,2 ± 2,19	0,58	1,84 ± 1,38	0,68	1,59 ± 1,5
p24	3,24 ± 2,95	1,72 ± 1,43	0,22	1,93 ± 1,35	4,64 ± 6,87	0,68	1,89 ± 1,25	0,22	2 ± 1,08

Tabla R.2.42. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de las respuestas linfoproliferativas entre los grupos detectable e indetectable con límite de 20 copias/mL. (PHA: Fitoheماغلوتimina; PWM: Mitógeno pokeweed; TT: Toxoides tetánico; CMV: Citomegalovirus)

Respuestas linfoproliferativas	Mes 0 (basal)		Periodo tratamiento (meses 0-12)		Periodo sin tratamiento (meses 12-18)	
	P	P	P	P	P	P
PHA 0,5	0,26	0,22	0,2			
PHA 1%	0,37	0,48	0,14			
Ac anti-CD3	0,23	0,11	0,11			
AntiCD3 -antiCD28	0,15	0,074	0,23			
PWM	0,45	0,63	0,74			
TT	0,32	0,56	0,95			
CMV	0,31	0,4	0,71			
gp160	0,61	0,68	0,56			
p24	0,55	0,33	0,65			

Tabla R.2.43. Áreas netas bajo la curva de las respuestas linfoproliferativas durante el periodo con y sin tratamiento (meses 12-18). Se expresa la media y la desviación típica de cada variable. P* Diferencia 0-12 entre grupos; P ** Diferencia 12-18 entre grupos

Respuestas linfoproliferativas	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL)		Grupo Detectable (> 20 copias/mL)		P*	P**
	Meses 0-12	Meses 12-18	Meses 0-12	Meses 12-18		
Fitohemaglutinina 0,5	-28,92 ± 294,47	86,25 ± 203,17	126,55 ± 262,02	-120,26 ± 271,67	0,17	0,043
Fitohemaglutinina 1%	72,44 ± 135,16	98,75 ± 106,02	88,31 ± 192,33	-93,5 ± 221,15	0,81	0,012
Anticuerpo anti-CD3	64,24 ± 211,8	69,5 ± 104,48	128,47 ± 135,52	-76,27 ± 148,07	0,36	0,01
AntiCD3 + antiCD28	-36,28 ± 237	108,03 ± 205,14	166,57 ± 227,46	-132,15 ± 260,22	0,036	0,018
Mitógeno Pokeweed	17,98 ± 98,78	26,38 ± 133,14	15,63 ± 144,6	-13,37 ± 45,88	0,96	0,34
Toxoides Tetánico	9,61 ± 40,12	10,37 ± 25,75	-39,9 ± 110,16	-0,79 ± 14,44	0,15	0,19
Citomegalovirus	-2,6 ± 11,33	11,41 ± 12,39	0,9 ± 47,05	3,08 ± 11,76	0,8	0,098
gp160	2,7 ± 23,28	2,32 ± 7,81	1,62 ± 26,89	4,23 ± 17,02	0,91	0,72
p24	2,64 ± 44,79	8,24 ± 19,01	-22,11 ± 67,6	4,56 ± 14,2	0,29	0,59

- Anticuerpos anti-CD3: Como en las dos respuestas anteriores, aumentaron las diferencias entre los grupos respecto al análisis para 200 copias/mL tras la parada de tratamiento, de forma que el AUC fue aún significativamente menor en el GD₂₀ que el GI₂₀ (p = 0,01), y las diferencias entre los periodos 12-15 (p = 0,024). El resto de tendencias fueron similares a las halladas para el análisis de 200 copias/mL.

- Anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28: Además de presentar los mismos resultados que las respuestas anteriores en el periodo de parada, con un aumento de las diferencias entre grupos al comparar con el análisis para 200 copias/mL (AUC significativamente menor en el GD₂₀ que el GI₂₀, p = 0,018), también se acentuaron más las diferencias intergrupos en el periodo de tratamiento, de forma que se produjo un aumento en el GD₂₀ (p = 0,051) y un descenso en el GI₂₀ (p = 0,39), con diferencias significativas entre grupos (p = 0,074 para la diferencia de gradientes 0-12 entre grupos, y p = 0,036 para la comparación de AUC).

- Mitógeno Pokeweed: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

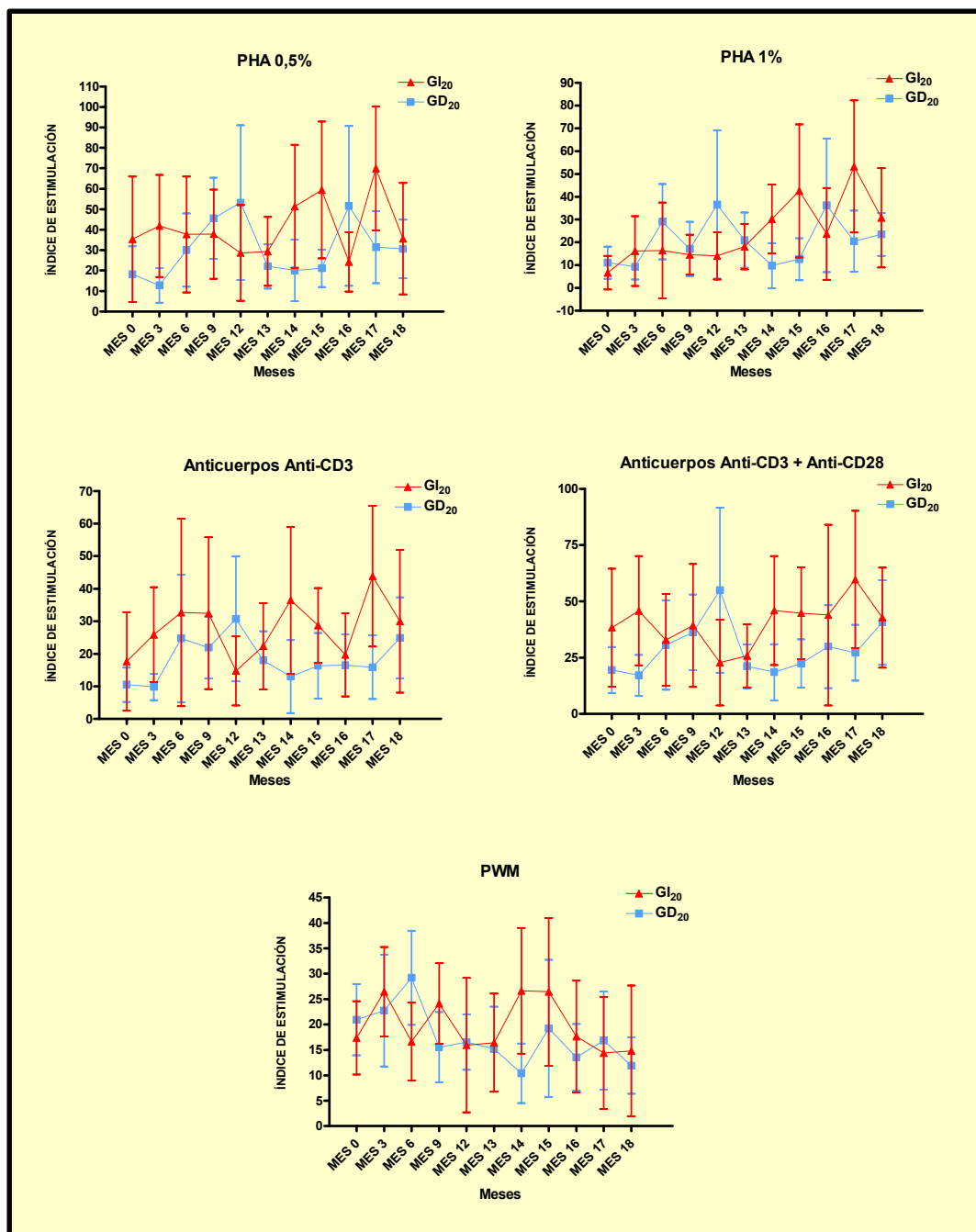


Figura R.2.49. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) e interrupción (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a mitógenos. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; PHA: Fitohemaglutinina; PWM: Mitógeno Pokeweed)

- Respuestas linfoproliferativas a antígenos comunes:
 - Toxide tetánico: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

▪ Antígenos del CMV: Respecto al análisis para 200 copias/mL desaparecieron las diferencias basales entre grupos ($p = 0,31$) y disminuyeron las diferencias durante los periodos de tratamiento y parada.

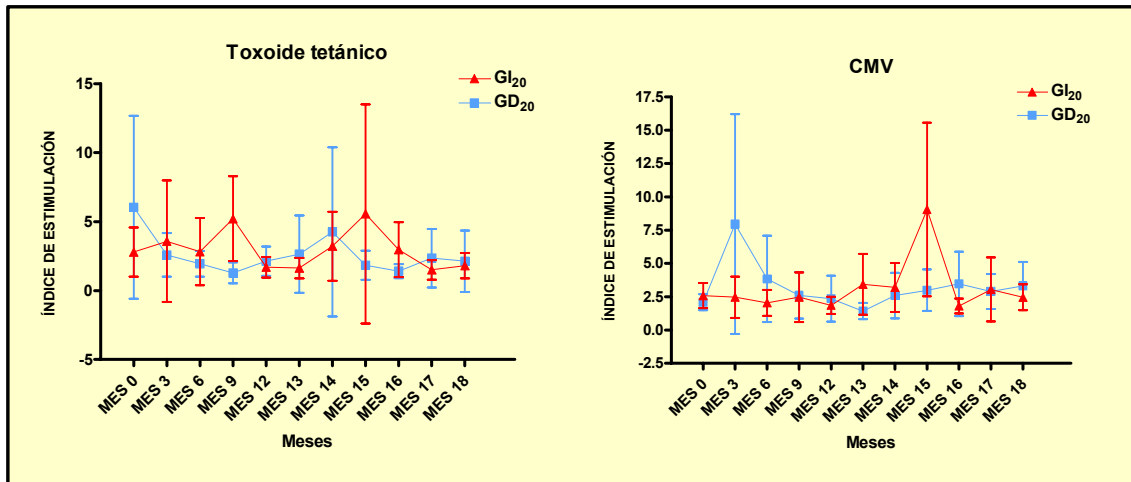


Figura R.2.50. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a antígenos comunes. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable \geq 20 copias/mL; CMV: Citomegalovirus)

- Respuestas linfoproliferativas a proteínas del VIH.
 - gp160: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.
 - p24: Los GI₂₀ y GD₂₀ presentaron una evolución superponible, sin diferencias entre grupos.

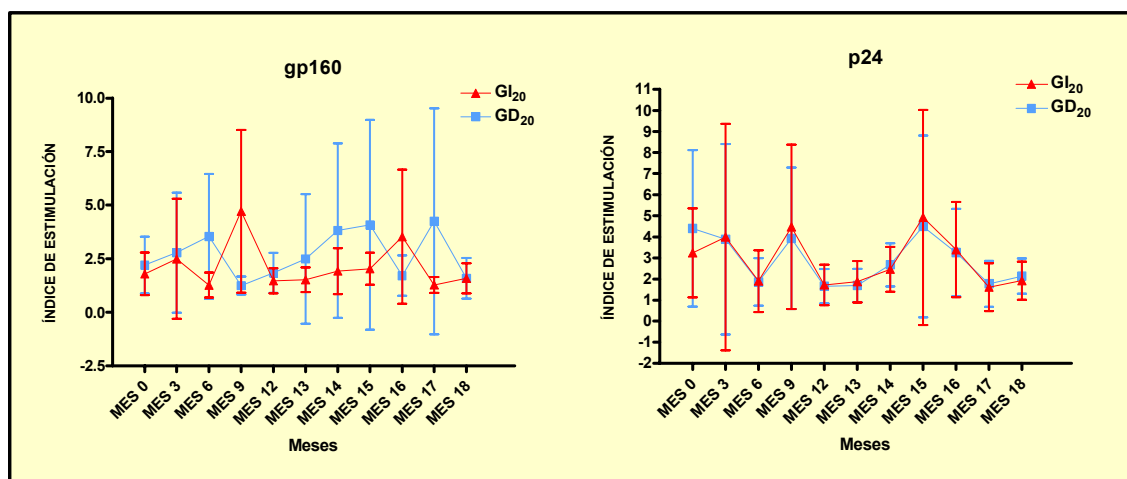


Figura R.2.51. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas linfoproliferativas a proteínas del VIH. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

2.3.3.4. Respuestas CD8⁺ específicas frente al VIH

Los cambios experimentados en las respuestas CD8⁺ específicas anti-VIH en los GD₂₀ y GI₂₀ se pueden observar en la Figura R.2.52. o en las Tablas R.2.44.-R.2.45.

- Respuestas CD8⁺ específicas frente al VIH totales (magnitud de la respuesta): Con respecto al análisis para 200 copias/mL, el mayor cambio fue que disminuyó la diferencia entre grupos, de modo que, aunque siguieron siendo mayores en el GD₂₀, perdieron la significación estadística. Por lo que respecta a las tendencias, fueron superponibles a las del análisis para 200 copias/mL.

- Número de péptidos reconocidos (amplitud de la respuesta): La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

- Cociente respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH/péptidos: Como en las respuestas CD8⁺ específicas frente al VIH totales, disminuyeron las diferencias entre el GI₂₀ y GD₂₀. Por lo que respecta al resto de tendencias, fueron superponibles a las del análisis para 200 copias/mL.

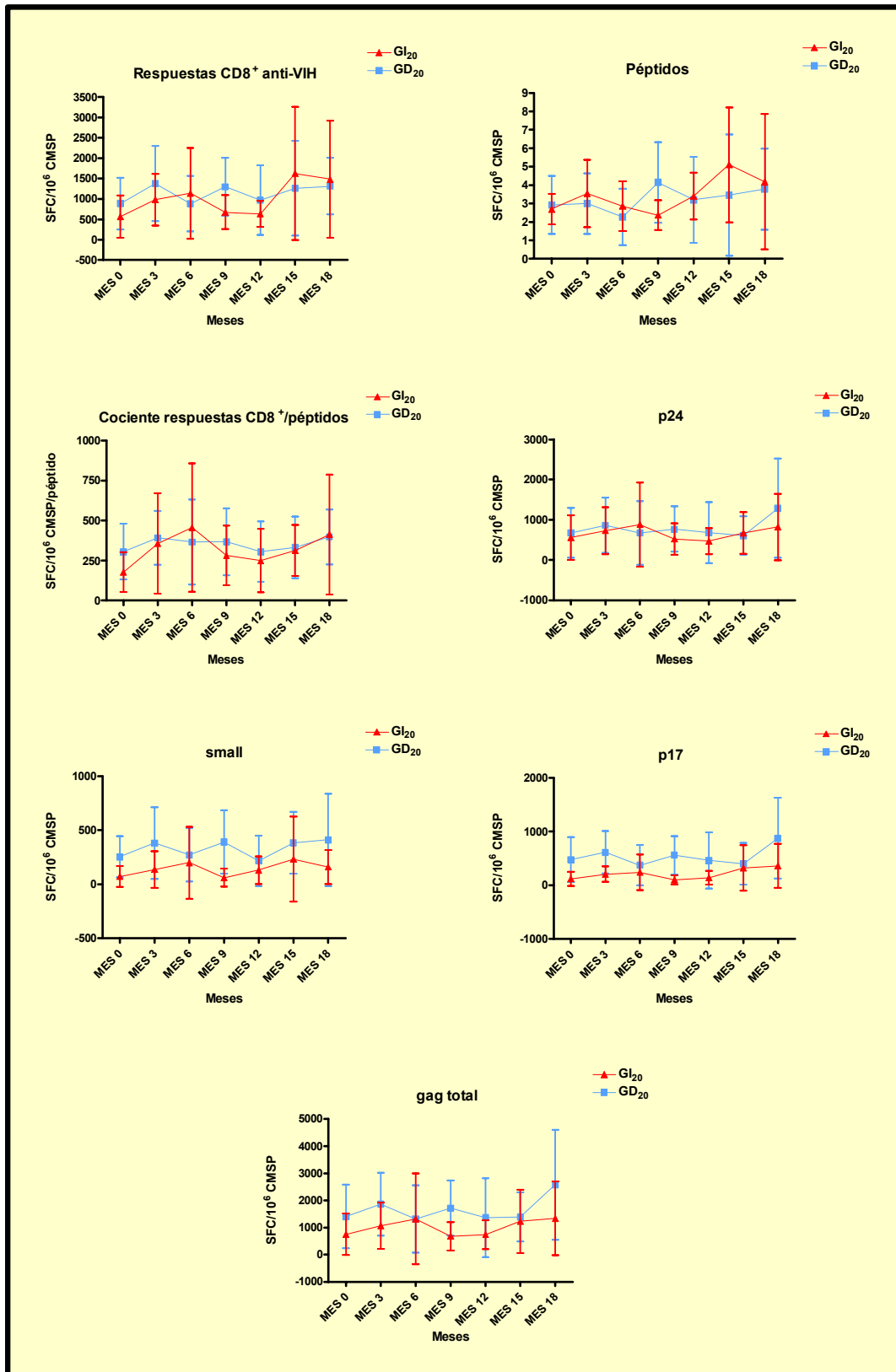


Figura R.2.52. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de las respuestas específicas CD8⁺ frente a diferentes antígenos del VIH. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; SFC: Células formadoras de Spots (*Spots forming cells*); CMSP: Células mononucleares de sangre periférica).

Tabla R.2.44. Evolución de las respuestas CD8⁺ específicas anti-VIH durante el periodo de tratamiento y tras su interrupción en los grupos detectable e indetectable en función del límite de 20 copias/mL. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable en SF-C/10⁶ CMSP (células formadoras de spots/10⁶ células mononucleares de sangre periférica)

	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo Detectable (> 20 copias/mL)				
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	
Respuestas CD8 ⁺ anti-VIH									
Respuestas CD8 ⁺ totales	566,4 ± 728,76	632,1 ± 440,68	0,9	1484,27 ± 2136,48	886,38 ± 1047,62	969,5 ± 1196,88	0,75	1313,89 ± 901,8	0,75
Nº péptidos	2,7 ± 1,16	3,4 ± 1,78	0,38	4,18 ± 5,47	2,92 ± 2,6	3,2 ± 3,25	1	3,78 ± 2,86	0,27
Respuestas CD8 ⁺ /péptidos	177,6 ± 173,54	249,7 ± 279,07	0,73	412,82 ± 559,02	306,38 ± 289,87	306,4 ± 261,8	0,51	398 ± 223,68	0,76
p24	556 ± 774,63	468,8 ± 447,06	0,71	821,18 ± 1227,37	676,92 ± 1021,53	682,3 ± 1058,13	0,62	1289,11 ± 1597,85	0,089
Small	72,3 ± 135,23	131 ± 176,96	0,86	159,45 ± 236,7	253,46 ± 314,08	217,1 ± 324,32	0,52	412,55 ± 554,82	0,53
p17	117,2 ± 181,69	138,1 ± 180,82	0,82	356,54 ± 611,95	474,61 ± 691,72	462,4 ± 731	0,9	872,89 ± 979,57	0,4
Gag total	745,6 ± 1063,1	737,8 ± 745,96	0,84	1337,09 ± 2024,79	1404,92 ± 1932,68	1361,7 ± 2034,91	0,69	2574,22 ± 2636,39	0,2

Tabla R.2.45. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de las respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH entre los grupos detectable e indetectable con límite de 20 copias/mL.

Respuestas CD8 ⁺ anti-VIH	Mes 0 (basal)		Periodo tratamiento (meses 0-12)		Periodo sin tratamiento (meses 12-18)	
	P	P	P	P	P	P
Respuestas CD8 ⁺ totales	0,42	0,82	0,82	0,32	0,32	0,32
Nº péptidos	0,8	0,41	0,41	0,9	0,9	0,9
Respuestas CD8 ⁺ /péptidos	0,23	0,58	0,58	0,17	0,17	0,17
p24	0,76	0,93	0,93	0,55	0,55	0,55
Small	0,079	0,56	0,56	0,34	0,34	0,34
p17	0,096	0,85	0,85	0,88	0,88	0,88
Gag total	0,34	0,85	0,85	0,87	0,87	0,87

- Respuestas específicas anti-p24: Como en las anteriores, respecto al análisis para 200 copias/mL disminuyeron las diferencias entre los GI₂₀ y GD₂₀, manteniéndose el resto de tendencias similares.
- Respuestas específicas anti-small: También disminuyeron las diferencias entre grupos comparado con el análisis a 200 copias/mL, aunque el GD₂₀ mantuvo respuestas significativamente superiores ($p = 0,079$ y $0,033$ en meses 0 y 9). El resto de tendencias fueron superponibles a las del análisis para 200 copias/mL.
- Respuestas específicas anti-p17: Como en las anteriores, disminuyeron las diferencias entre grupos, siendo el resto de tendencias similares a las del análisis para 200 copias/mL.
- Respuestas específicas anti-gag: Nuevamente se observó una disminución de las diferencias entre los GI₂₀ y GD₂₀ con respecto a las existentes entre los GD y GI para 200 copias/mL, siendo el resto de tendencias iguales que en el análisis para 200 copias/mL.

2.3.4. Cambios en la función tímica

Los cambios en los parámetros de función tímica durante el tratamiento y tras la interrupción en el GI₂₀ y el GD₂₀ se pueden ver en la **Figura R.2.53.** y las **Tablas R.2.46,- R.2.47.**

2.3.4.1. Copias de TRECs

- *TRECs*/μL: La evolución de GI₂₀ y GD₂₀ fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.
- *TRECs*/10⁶ CMSP: Respecto al análisis para 200 copias/mL disminuyeron las diferencias entre los GI₂₀ y GD₂₀, perdiéndose las diferencias de tendencias durante el periodo de tratamiento ($p = 0,17$ y $0,5$ para las diferencias de gradientes 0-6 y 0-12).

Tabla R.2.46. Evolución de los parámetros de función tímica durante el periodo de tratamiento y tras su interrupción por grupos en función de la presencia de cargas virales detectables ≥ 20 copias/mL. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable (TRECS: Círculos de escisión del receptor celular T)

Parámetros de función tímica	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo Detectable (≥ 20 copias/mL)				
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	P
Copias TRECS/ μ L	111,39 \pm 117,49	283,94 \pm 213,38	0,022	159,55 \pm 171,73	160,43 \pm 88,4	236,25 \pm 216,56	0,23	104,33 \pm 97,92	0,041
Copias TRECS/ 10 ⁶ células	56965,81 \pm 42023,4	59862 \pm 28742,7	0,75	52385,19 \pm 42257,54	57680,12 \pm 37558,07	49143,15 \pm 39346,73	0,54	37077,6 \pm 25613,09	0,086
Volumen tímico (cm ³)	4,76 \pm 3,67	4,81 \pm 3,77	0,62	4,92 \pm 3,54	7,22 \pm 3,23	7,72 \pm 3,11	0,017	7,55 \pm 3,06	0,34
Índice tímico	2,25 \pm 1,21	2,17 \pm 1,19	0,34	1,83 \pm 1,27	1,92 \pm 1,11	1,92 \pm 1,11	1	1,92 \pm 1,11	1
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	36,32 \pm 1,95	38,65 \pm 13,75	0,39	41,96 \pm 11,83	30,37 \pm 10,77	32,15 \pm 11,32	0,19	33,57 \pm 8,94	0,83
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	34,68 \pm 13,53	40,19 \pm 17,21	0,19	44,51 \pm 13,24	28,85 \pm 11,58	32,09 \pm 13,15	0,49	34,44 \pm 9,35	0,53
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	53,32 \pm 11,29	51,95 \pm 9,94	0,57	39,7 \pm 9,48	53,62 \pm 14,31	53,77 \pm 15,41	0,57	42,36 \pm 15,06	<0,001
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	28,09 \pm 16,28	37,45 \pm 17,58	0,15	28,34 \pm 7,24	26,19 \pm 10,58	27,63 \pm 8,33	0,95	23,84 \pm 8,54	0,14
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	0,46 \pm 0,14	1,12 \pm 0,6	0,006	1,04 \pm 0,77	0,98 \pm 0,69	1,56 \pm 0,93	0,123	1,14 \pm 0,53	0,17
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	1,04 \pm 1,2	2,48 \pm 2,07	0,018	2,05 \pm 1,09	1,35 \pm 1	2,32 \pm 1,43	0,093	3,02 \pm 1,93	0,13

Tabla R.2.47. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución de los parámetros de función tímica entre los grupos detectable e indetectable con límite de 20 copias/mL (TRECS: Círculos de escisión del receptor celular T)

Parámetros de función tímica	Mes 0 (basal)		Periodo tratamiento (meses 0-12)		Periodo sin tratamiento (meses 12-18)	
	P	P	P	P	P	P
Copias TRECS/ μ L	0,24	0,29	0,7			
Copias TRECS/ 10 ⁶ células	0,96	0,5	0,41			
Volumen tímico (cm ³)	0,088	0,063	0,22			
Índice tímico	0,49	-	-			
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	0,19	0,9	0,43			
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	0,25	0,5	0,54			
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	0,95	0,97	0,82			
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	0,72	0,15	0,25			
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	0,016	0,93	0,32			
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	0,48	0,64	0,16			

2.3.4.2. Tejido tímico

El volumen y el índice tímicos presentaron una evolución en GD₂₀ y GI₂₀ similar a la descrita para GD y GI para 200 copias/mL, respectivamente.

2.3.4.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo naïve

Ya se ha comentado su evolución durante el tratamiento y tras la interrupción en los apartados 2.3.3.1. y 2.3.3.2 de los **Resultados**.

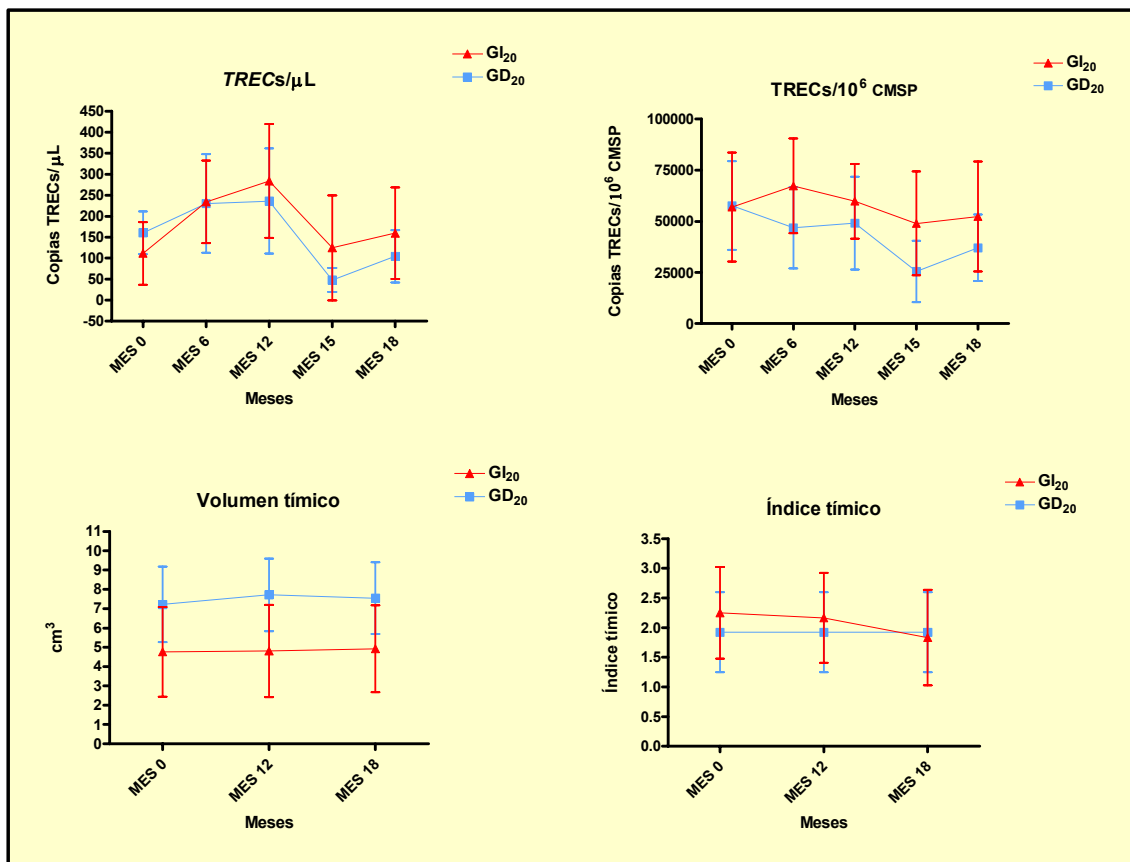


Figura R.2.53. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) de los parámetros de función tímica. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (TREC_s: Círculos de escisión del receptor celular T; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

2.3.5. Cambios en el sistema IL-7/IL-7R

Los cambios en los parámetros del sistema IL-7/IL-7R durante el tratamiento y tras la interrupción en el GI₂₀ y el GD₂₀ se pueden ver en la **Figura R.2.54.** y las **Tablas R.2.48-R.2.49.**

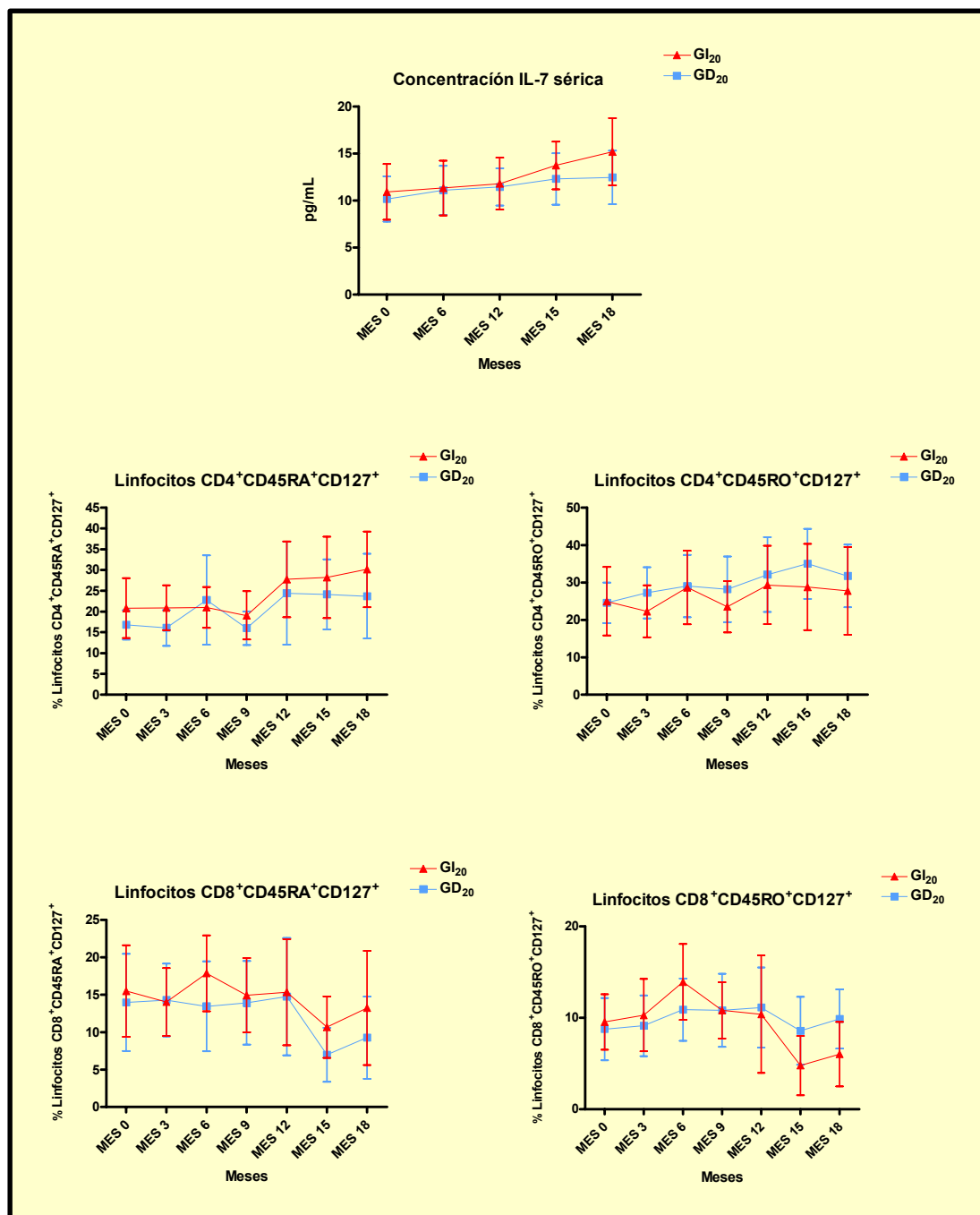


Figura R.2.54. Evolución durante el periodo de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) del sistema IL-7/IL-7R. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica)

Tabla R.2.48. Evolución de las concentraciones séricas de IL-7 y de la expresión del IL-7R durante el período de tratamiento y tras su interrupción por grupos. Se expresa la media y la desviación típica de cada variable (IL-7: Interleucina 7; IL-7R: Receptor de la IL-7)

Parámetros del sistema IL-7/IL-7R	Grupo Indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo Detectable (>20 copias/mL)				
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	P
Concentración IL-7 (pg/mL)	10,91 ± 4,65	11,8 ± 4,34	0,42	15,18 ± 5,64	10,16 ± 4,18	11,43 ± 3,43	0,064	12,44 ± 4,48	0,18
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	20,83 ± 10,74	27,76 ± 14,33	0,19	30,14 ± 14,31	16,8 ± 6,14	24,45 ± 20,49	0,16	23,7 ± 16,08	0,97
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	24,97 ± 13,7	29,31 ± 16,5	0,4	27,75 ± 18,47	24,58 ± 9,36	32,13 ± 16,55	0,11	31,76 ± 13,17	0,73
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	15,48 ± 9,09	15,34 ± 11,15	0,94	13,23 ± 12,01	13,97 ± 11,24	14,75 ± 12,95	0,86	9,26 ± 8,62	0,05
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	9,55 ± 4,5	10,4 ± 10,09	0,9	6,03 ± 5,54	8,76 ± 5,9	11,12 ± 7,25	0,23	9,87 ± 5,11	0,83

Tabla R.2.49. Resultados estadísticos de la comparación de la evolución del sistema IL-7/IL-7R entre los grupos detectable e indetectable con límite de 20 copias/mL (IL-7: Interleucina 7; IL-7R: Receptor de la IL-7)

Parámetros del sistema IL-7/IL-7R	Mes 0 (basal)		Período de tratamiento (meses 0-12)		Período sin tratamiento (meses 12-18)	
	Mes 0	P	Mes 0	P	Mes 12	P
Concentración IL-7 (pg/mL)	0,67	0,79	0,67	0,79	0,074	0,074
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	0,28	0,99	0,28	0,99	0,58	0,58
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	0,93	0,66	0,93	0,66	0,58	0,58
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	0,72	0,96	0,72	0,96	0,82	0,82
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	0,72	0,51	0,72	0,51	0,13	0,13

2.3.5.1. Niveles séricos de IL-7

A diferencia del análisis para 200 copias/mL de CV, el aumento en las concentraciones séricas de IL-7 fue más significativo en el GD₂₀ ($p = 0,064$) con respecto al GI₂₀ ($p = 0,42$), pero como para el análisis a 200 copias/mL, sin cambios significativos entre grupos ($p = 0,79$). Tras la interrupción, el GI₂₀ sí presentó un aumento significativo ($p = 0,003$), que tuvo además tendencia a ser significativamente mayor que el que presentó el GD₂₀ ($p = 0,074$ para la diferencia de gradientes 12-18).

2.3.5.2. Expresión de IL-R

La evolución en GI₂₀ y GD₂₀ de todas las subpoblaciones linfocitarias con el marcaje CD127 (linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD127⁺, linfocitos CD4⁺CD45RO⁺CD127⁺, linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺ y linfocitos CD8⁺CD45RO⁺CD127⁺) fue similar a la que presentaron GI y GD para 200 copias/mL.

2.3.6. Influencia en las respuestas a los antígenos vacunales

Se analizó si la presencia de CV detectables por encima de 20 copias/mL influía en la respuesta humoral y celular a antígenos vacunales, tanto desde el punto de vista basal, como tras la vacunación, como en la evolución de estas respuestas tras la interrupción de tratamiento.

2.3.6.1. Respuesta a VHA

- Respuesta humoral

No se hallaron diferencias basales en la respuesta humoral a VHA entre los GD₂₀ y GI₂₀, ni en la respuesta cuantitativa ($p = 0,82$) ni en la cualitativa ($p = 1$).

Durante el periodo de tratamiento el GD₂₀ presentó un mayor aumento (significativo entre los meses 0 y 12, $p = 0,043$), pero no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en el aumento de títulos entre los meses 0-12, 3-6 y 9-12 (**Tabla R.2.50.** y **Figura R.2.55.**).

Tabla R.250. Respuestas inmune humoral y celular a virus hepatitis A, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral de 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a virus hepatitis A	Grupo indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 20 copias/mL)				P*	P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	100 (27,17-100)	100 (100-100)	0,18	100 (100-100)	100 (8-100)	100 (100-100)	0,043	100 (77,85-100)	0,28	0,38	0,73
Humoral cualitativa	9 (75)	10 (83,3)	1	10 (83,3)	10 (71,4)	13 (92,9)	0,25	12 (85,7)	1	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	135,5 (0-365)	323 (33-1050)	0,26	350 (8-679)	144 (27-378,5)	648 (59-907,5)	0,78	331,5 (150-671)	0,4	0,63	0,19
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	284 (56,25-1266,25)	1518 (752,25-2346)	0,12	2100,5 (499,5-3695,5)	398,5 (94,5-817)	896 (112,5-1371,5)	0,95	1415 (1073,5-2120,75)	0,043	0,063	0,73
Celular (ELISPOT) cualitativa	6 (50)	8 (66,7)	1	6 (50)	8 (57,1)	7 (50)	1	10 (71,4)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	8 (66,7)	9 (75)	1	7 (58,3)	11 (78,6)	7 (50)	0,5	10 (71,4)	1	-	-

Finalmente, durante el periodo sin tratamiento no se detectaron diferencias en la evolución de los títulos de anticuerpos entre grupos (**Tabla R.2.50.** y **Figura R.2.55.**).

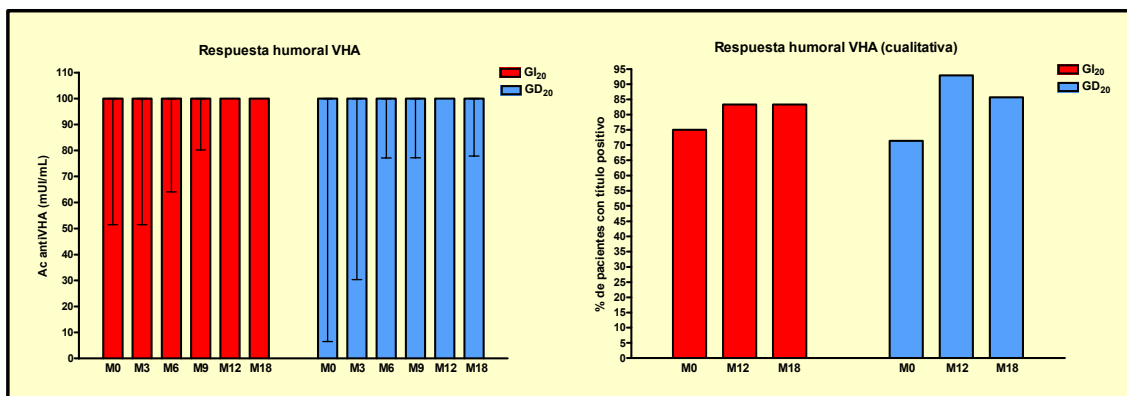


Figura R.2.55. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a VHA durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VHA: Virus hepatitis A; Ac: Anticuerpos; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

- Respuesta celular

No se hallaron diferencias basales en la respuesta celular cuantitativa entre grupos medida por ELISPOT ($p = 0,78$), ni AMPLISPOT ($p = 0,77$), así como tampoco en la valoración cualitativa ($p = 1$ y $0,57$ para ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente).

Durante el periodo de tratamiento se halló un aumento para la respuesta celular medida por AMPLISPOT entre los meses 0 y 12, con tendencia a ser significativamente mayor en el GI₂₀ ($p = 0,063$). No se hallaron otras diferencias entre los grupos en los cambios de respuesta para los distintos periodos.

Finalmente, al retirar el TARGA no se observaron diferencias en la evolución de las respuestas celulares (**Tabla R.2.50.** y **Figura R.2.56.**).

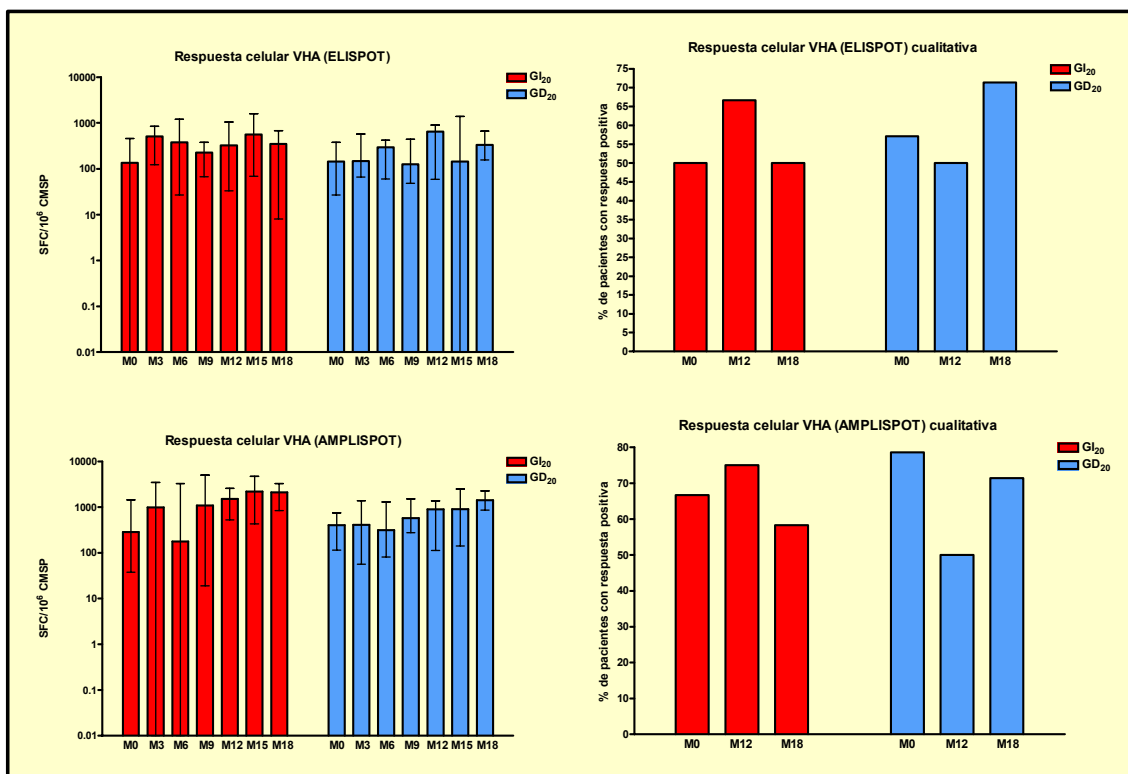


Figura R.2.56. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a VHA durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VHA: Virus hepatitis A; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

2.3.6.2. Respuesta a VHB

- Respuesta humoral

En el mes 0 los títulos de anticuerpos anti-HBsAg fueron menores en el GI₂₀, aunque no de forma estadísticamente significativa ($p = 0,49$). Igualmente no existieron diferencias en la evaluación cualitativa de la serología para el VHB ($p = 0,45$).

Durante los 12 meses de tratamiento y vacunaciones/placebo ambos grupos experimentaron un aumento en los títulos de anticuerpos, no observando diferencias significativas en el aumento entre los dos grupos en ninguno de los tramos evaluados (meses 0-12, 0-3 y 6-9).

Tras la interrupción del TARGA tampoco se hallaron diferentes evoluciones entre el GD₂₀ y el GI₂₀ (Tabla R.2.51. y Figura R.2.57.).

Tabla R.2.51. Respuestas inmune humoral y celular a VHB, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (VHB: Virus hepatitis B; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a virus hepatitis B	Grupo indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 20 copias/mL)				P*	P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	1 (1-74,48)	43,62 (1-969,35)	0,017	56,04 (2,26-824,07)	25,53 (1-885,55)	67,04 (1-1000)	0,4	84,08 (12,29-917,45)	0,33	0,25	0,98
Humoral cualitativa	4 (33,3)	8 (66,7)	0,12	8 (66,7)	7 (50)	8 (57,1)	1	10 (71,4)	0,5	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-13,75)	0 (0-20)	0,46	3 (0-39,5)	3 (0-13)	19 (3-65)	0,73	2,5 (0-37)	1	0,7	0,57
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-13)	4 (0-212,75)	0,17	8 (0-24,25)	0 (0-14)	0 (0-33,5)	0,46	0 (0-26,25)	0,28	0,34	0,29
Celular (ELISPOT) cualitativa	1 (8,3)	1 (8,3)	1	1 (8,3)	2 (14,3)	2 (14,3)	1	2 (14,3)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	2 (16,7)	4 (33,3)	0,69	1 (8,3)	2 (14,3)	1 (7,1)	1	1 (7,1)	1	-	-

Resultados

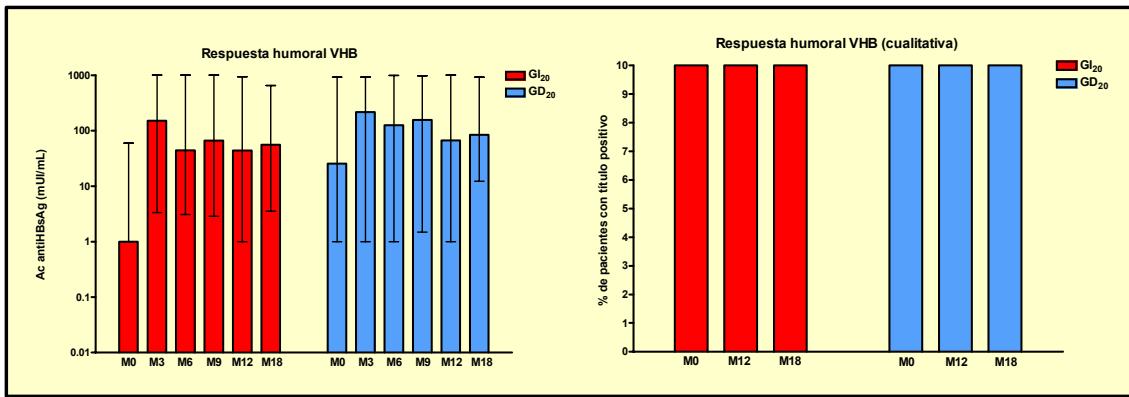


Figura R.2.57. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a VHB durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VHB: Virus hepatitis B; Ac: Anticuerpos; GD: GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

- Respuesta celular

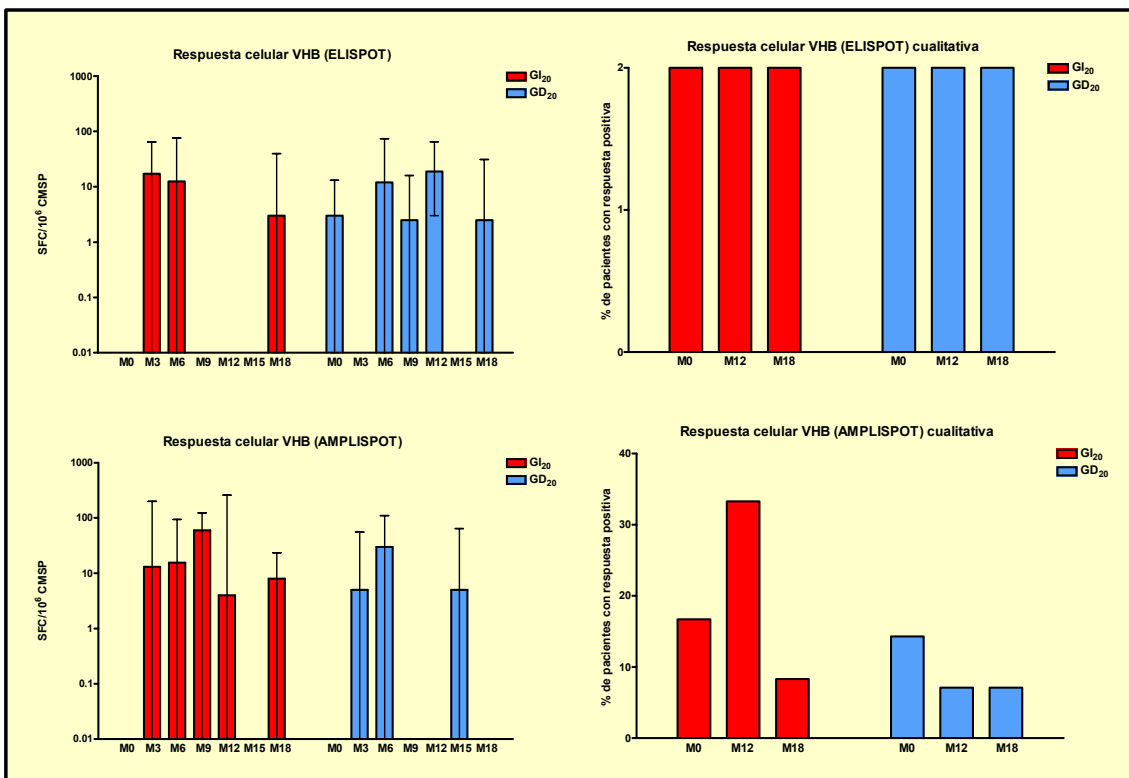


Figura R.2.58. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a VHB durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VHB: Virus hepatitis B; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Los dos grupos no presentaron diferencias basales en la respuesta celular a VHB ($p = 0,52$ y $0,63$ para ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente), pero entre los meses 0 y 3 se observó, en las medidas por AMPLISPOT, un aumento de respuesta en el GI₂₀ significativamente superior al producido en el GD₂₀ ($p = 0,018$). No se hallaron otras diferencias ni por ELISPOT ni por AMPLISPOT, ni durante el tratamiento (meses 0-12 ó 6-9), ni tras la suspensión del mismo (Tabla R.2.51. y Figura R.2.58.).

2.3.6.3. Respuesta a gripe

El GI₂₀ presentó, basalmente, una menor respuesta celular frente a gripe medida por AMPLISPOT que el GD₂₀, con tendencia a la significación estadística ($p = 0,059$). Por ELISPOT no se detectaron diferencias significativas basales ($p = 0,74$). Ni en la fase de tratamiento ni en la de interrupción se observaron diferencias significativas en la evolución entre grupos (Tabla R.2.52. y Figura R.2.59.).

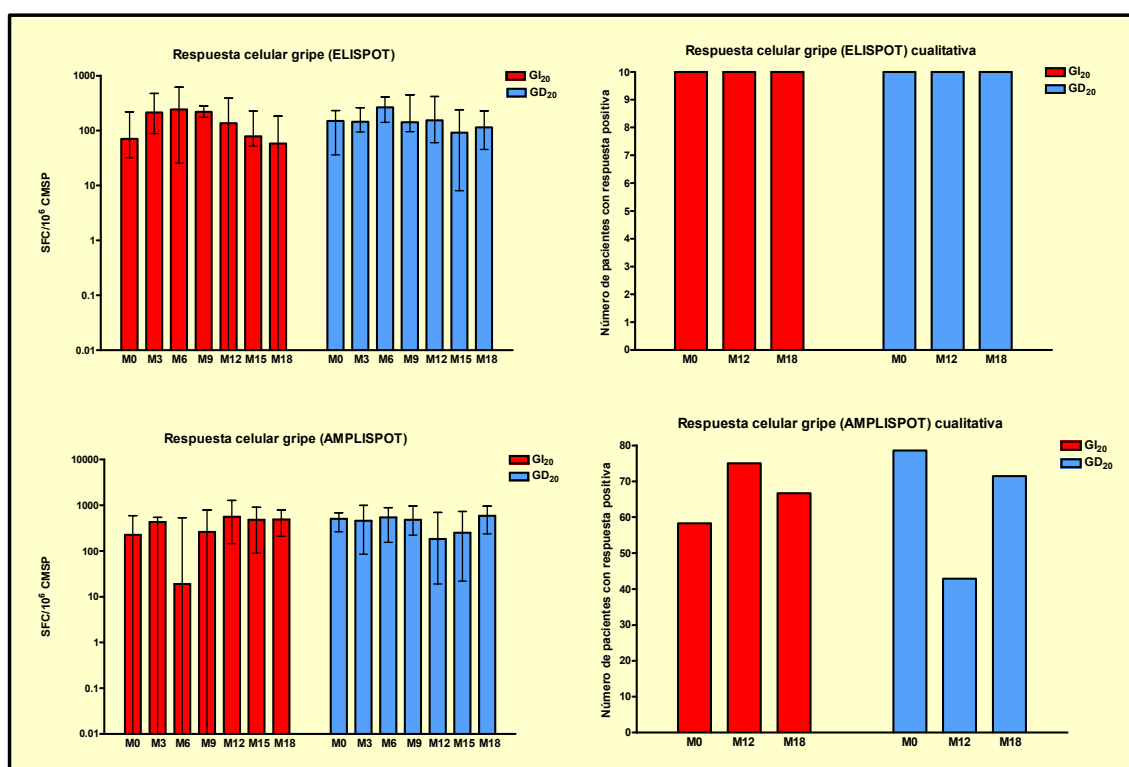


Figura R.2.59. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a gripe durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.2.52. Respuestas inmune humoral y celular a gripe, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a virus influenza	Grupo indetectable (<20 copias/mL)				Grupo detectable (≥20 copias/mL)				P*	P**	P***	
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18				
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	70 (48-213,25)	136 (0-389)	0,57	58 (0-182,5)	150 (36-230)	153 (60-416)	0,67	114 (45-258,75)	0,24	0,13	0,76	0,28
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	225 (0-529,25)	558 (186-1096,75)	0,31	487 (159,25-848)	501,5 (255,5-730)	183 (19-694)	0,14	587 (276,5-923)	0,31	0,18	0,11	0,84
Celular (ELISPOT) cualitativa	8 (66,7)	7 (58,3)	0,69	5 (41,7)	9 (64,3)	7 (50)	1	10 (71,4)	1	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	7 (58,3)	9 (75)	1	8 (66,7)	11 (78,6)	6 (42,9)	0,25	10 (71,4)	1	0,5	-	-

2.3.6.4. Respuesta a varicela

- Respuesta humoral

No existían diferencias significativas cualitativas en la respuesta humoral a varicela basalmente entre los GI₂₀ y GD₂₀ ($p = 0,2$), ni se produjeron diferencias en la evolución durante el periodo de TARGA o tras la interrupción (**Tabla R.2.53.** y **Figura R.2.60.**).

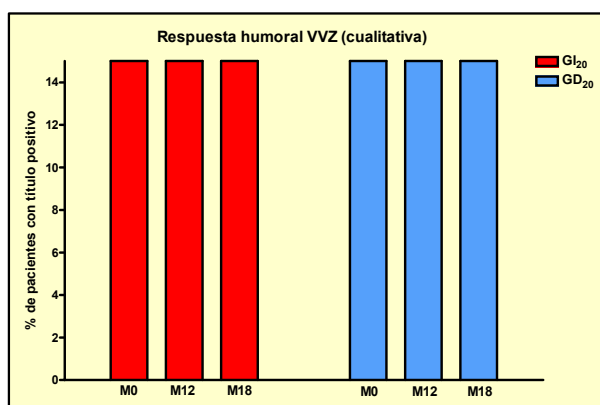


Figura R.2.60 Evolución de la respuesta humoral cualitativa a VVZ durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestra la proporción de pacientes positivos (VVZ: Virus Varicela Zoster; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

- Respuesta celular

Las respuestas celulares cuantitativas a VVZ por AMPLISPOT en el mes 0 fueron significativamente menores en el GI₂₀ tanto en la respuesta valorada de forma cuantitativa ($p = 0,036$), como cualitativa ($p = 0,03$). Sin embargo, no se detectaron tales diferencias en ELISPOT cuantitativo ($p = 0,93$) o cualitativo ($p = 0,34$).

Con el tratamiento se observó que en la medición por ELISPOT el GD₂₀ presentó una elevación, con tendencia a ser significativamente diferente del descenso que presentó el GI₂₀, entre los meses 9 y 12 ($p = 0,065$), mientras que entre los meses 6 y 9 se detectó un aumento en el GI₂₀ por AMPLISPOT, con tendencia a ser significativamente mayor que en el GD₂₀ ($p = 0,065$).

Tras la interrupción, en la medición de las respuestas por ELISPOT se halló un aumento en el GI₂₀, significativamente mayor al que presentó el GD₂₀ entre los meses 12-18 (**Tabla R.2.53.** y **Figura R.2.61.**).

Tabla R.2.53. Respuestas inmune humoral y celular a varicela, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a varicela	Grupo indetectable (<20 copias/mL)				Grupo detectable (≥20 copias/mL)				P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18		
Humoral cualitativa	10 (83,3)	11 (91,7)	1	10 (83,3)	14 (100)	1	13 (92,9)	1	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	11,5 (0-53,25)	24 (0-164)	0,86	40 (3-110)	8 (1,5-30)	39 (25,5-74)	0,12	46 (6,75-106,75)	0,89	0,038
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-54)	135,5 (63-535,5)	0,26	205,5 (33-470,5)	97,5 (32,25-263,5)	72 (0-225)	0,21	285,5 (3-398,25)	0,075	0,031
Celular (ELISPOT) cualitativa	4 (33,3)	4 (33,3)	1	4 (33,3)	2 (14,3)	4 (28,6)	1	7 (50)	0,5	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	2 (16,7)	8 (66,7)	0,125	6 (50)	9 (64,3)	5 (35,7)	0,62	7 (50)	1	-

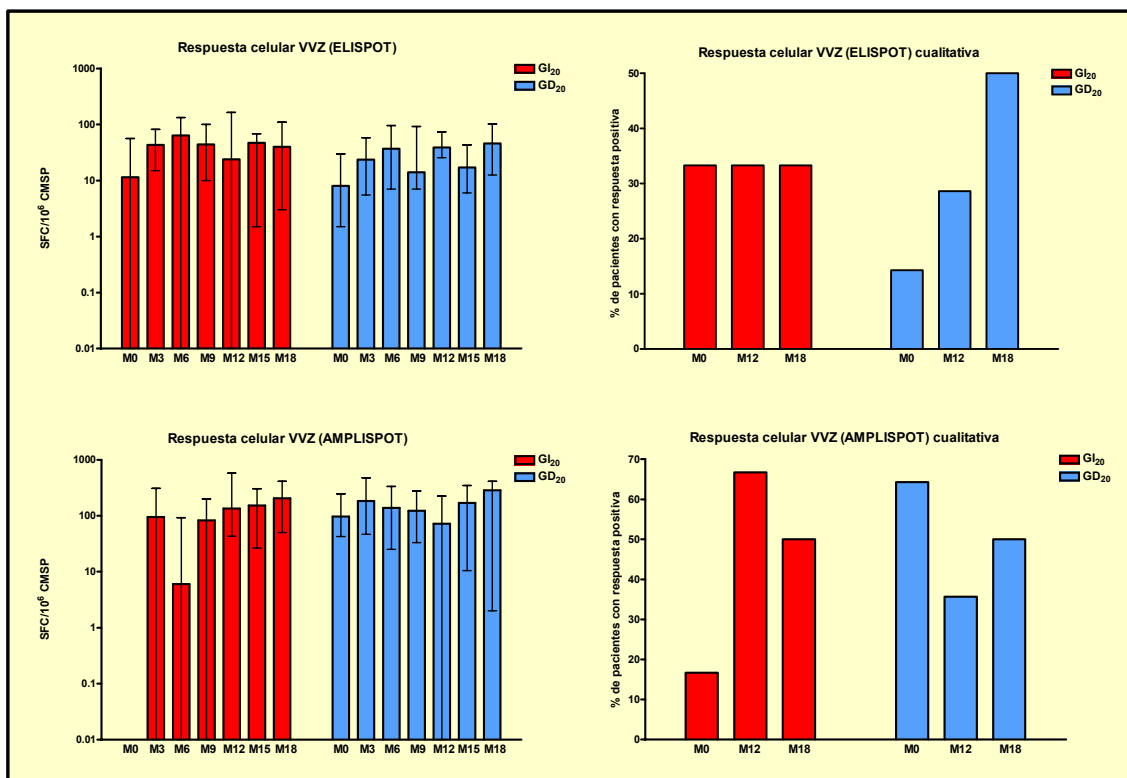


Figura R.2.61. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a VVZ durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (VVZ: Virus Varicela Zoster; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

2.3.6.5. Respuesta a parotiditis

- Respuesta humoral

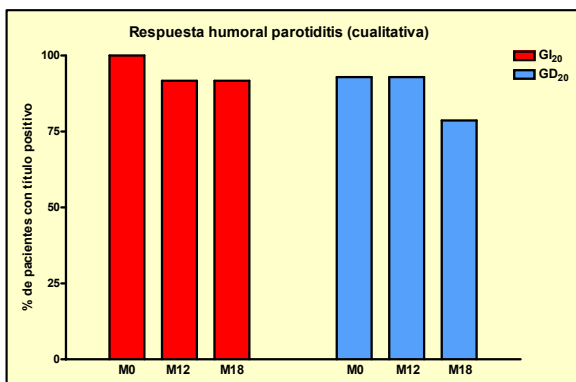


Figura R.2.62. Evolución de la respuesta humoral cualitativa a parotiditis durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestra la proporción de pacientes positivos (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

No se observaron diferencias significativas en la respuesta humoral cualitativa a parotiditis entre los GD y GI ni basalmente ($p = 1$), ni durante el periodo de tratamiento, ni en la fase de interrupción (Tabla R.2.54. y Figura R.2.62.).

Tabla R.2.54. Respuestas inmune humoral y celular a parotiditis, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a parotiditis	Grupo indetectable (<20 copias/mL)				Grupo detectable (≥20 copias/mL)				P*	P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cualitativa	12 (100)	11 (91,7)	1	11 (91,7)	13 (92,9)	1	11 (78,6)	0,5	-	-	
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-34,25)	0 (0-22,5)	0,4	82 (0-184,5)	19 (0-33,5)	0,4	44,5 (12,5-76,25)	0,24	0,9	0,05	
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	45 (0-114)	149 (31,5-705,5)	0,26	172,5 (38,5-524)	142 (19-323,75)	0,31	300,5 (106,5-468,75)	0,043	0,11	0,94	
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (16,7)	4 (33,3)	1	5 (41,7)	2 (14,3)	0,62	6 (42,9)	1	-	-	
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	6 (50)	7 (58,3)	1	6 (50)	8 (57,1)	0,62	8 (57,1)	0,5	-	-	

- Respuesta celular

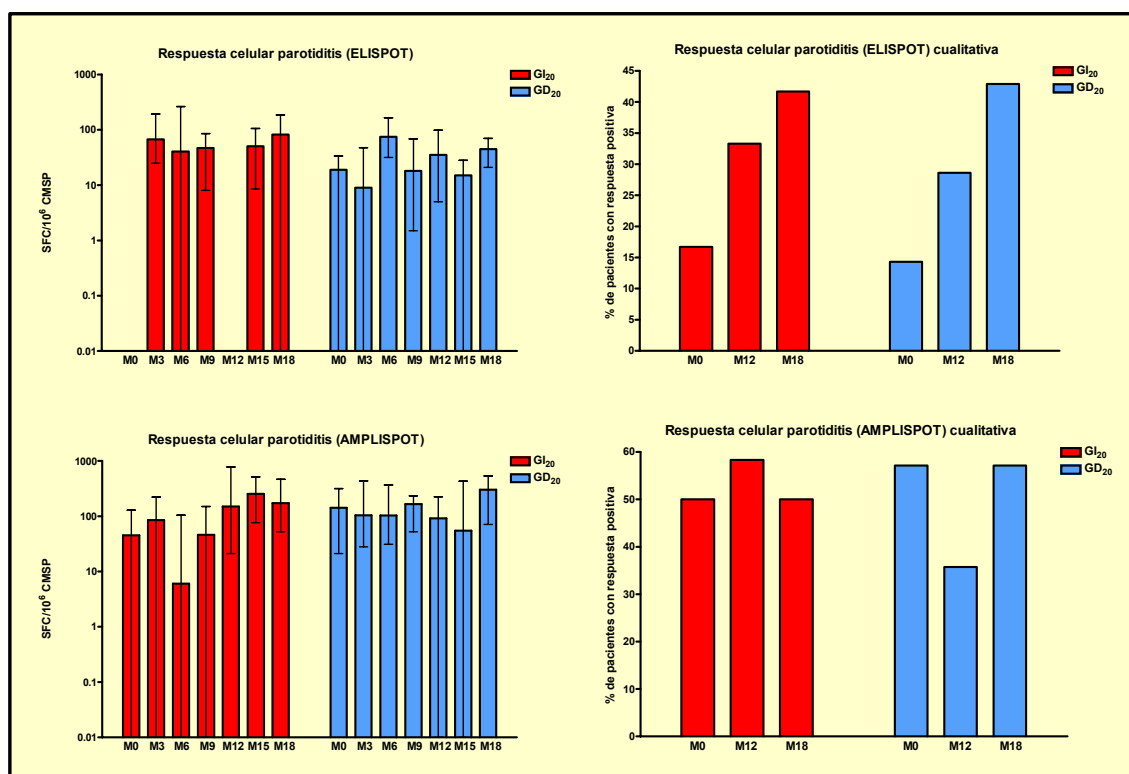


Figura R.2.63. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a parotiditis durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

No se detectó que las respuestas basales celulares a parotiditis fuesen diferentes, ni de forma cuantitativa ni cualitativa, por ELISPOT o AMPLISPOT ($p = 0,56$ y $0,18$ para las respuestas cuantitativas por ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente, y 1 para las cualitativas).

Durante el periodo de tratamiento se detectaron diferencias significativas en las medidas por ELISPOT: entre los meses 0 y 3 el GI₂₀ aumentó la respuesta, mientras que el GD₂₀ la disminuyó ($p = 0,043$); posteriormente, entre los meses 3 y 6 la tendencia fue la contraria ($p = 0,05$).

Tras la interrupción, y también en la medida por ELISPOT, el GI₂₀ presentó un aumento de la respuesta celular cuantitativa significativamente superior al que presentó el GD ($p = 0,05$).

Por AMPLISPOT no se detectaron diferencias significativas ni durante el tratamiento ni tras la interrupción (Tabla R.2.54. y Figura R2.63.).

2.3.6.6. Respuesta a rubéola

No se hallaron diferencias cuantitativas ni cualitativas en la respuesta humoral a rubéola entre grupos basalmente ($p = 0,53$ y 1 para la respuesta cuantitativa y cualitativa, respectivamente). Con las vacunaciones los títulos aumentaron más en el GI₂₀, con tendencia a la significación estadística, entre los meses 9 y 12 ($p = 0,087$). Finalmente, tras la retirada del tratamiento los títulos variaron en ambos grupos de forma similar, sin diferencias significativas entre ellos (Tabla R.2.55. y Figura R.2.64.).

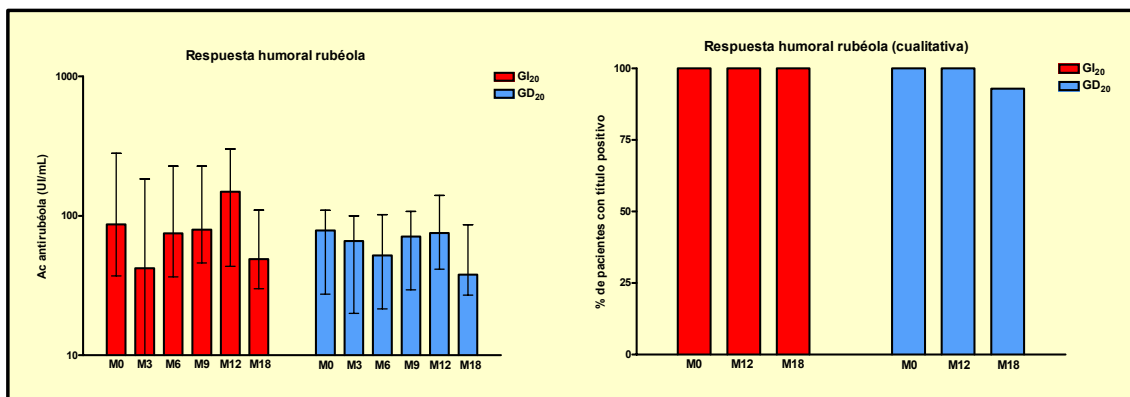


Figura R.2.64. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a rubéola durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; Ac: Anticuerpos)

Tabla R.2.55. Respuestas inmune humoral y celular a rubéola, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a rubéola	Grupo indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 20 copias/mL)				P*	P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (U/ml)	87 (34,5-310,75)	149 (40,75-319,5)	0,27	49 (29,5-126,5)	78,5 (27,75-105,75)	75,5 (43,25-139,75)	0,53	38 (27-86,5)	0,023	0,7	1
Humoral cualitativa	12 (100)	12 (100)	1	12 (100)	14 (100)	14 (100)	1	13 (92,9)	1	-	-

2.3.6.7. Respuesta a sarampión

- Respuesta humoral

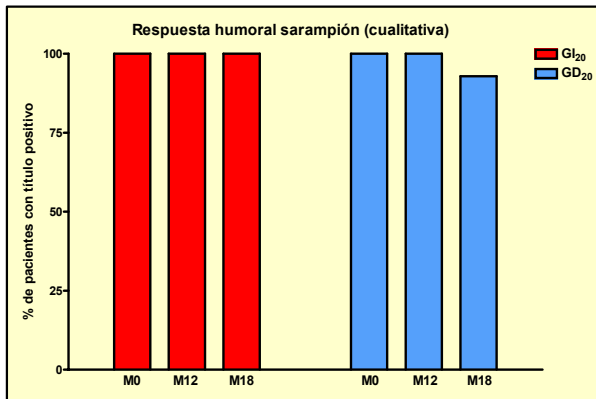


Figura R.2.65. Evolución de la respuesta humoral cualitativa a sarampión durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestra la proporción de pacientes positivos (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

No se hallaron diferencias en la respuesta humoral a sarampión (cualitativa) entre los GI₂₀ y GD₂₀ ni basalmente, ni en la evolución con y sin tratamiento (**Tabla R.2.56.** y **Figura R.2.65.**).

- Respuesta celular

Basalmente no existían diferencias entre los GD₂₀ y GI₂₀ en las respuestas celulares (cuantitativa y cualitativa) a sarampión medidas por ELISPOT y AMPLISPOT ($p = 0,16$ y $0,48$ para las respuestas cuantitativas por ELISPOT y AMPLISPOT, y $0,18$ y $0,59$ para las cualitativas por los mismos métodos, respectivamente).

Durante el periodo de tratamiento se hallaron diferencias en la respuesta celular por ELISPOT y AMPLISPOT. Por ELISPOT, el GI₂₀ disminuyó la respuesta y el GD₂₀ la aumentó entre los meses 9 y 12 ($p = 0,079$). La misma tendencia se observó entre los meses 0 y 12 ($p = 0,083$). Por otro lado, en las medidas cuantitativas por AMPLISPOT se produjo un aumento en el GD₂₀ significativamente superior al cambio en el GI₂₀ entre los meses 6 y 9 ($p = 0,053$), invirtiéndose la tendencia entre los meses 9 y 12 ($p = 0,04$).

Finalmente, durante el periodo sin TARGA el GI₂₀ por ELISPOT presentó un ascenso entre los meses 12 y 15, mientras que el GD₂₀ descendió ($p = 0,024$) (**Tabla R.2.56.** y **Figura R.2.66.**).

Tabla R.2.56. Respuestas inmune humoral y celular a sarampión, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a sarampión	Grupo indetectable (<20 copias/mL)				Grupo detectable (≥20 copias/mL)				P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18		
Humoral cualitativa	12 (100)	12 (100)	1	12 (100)	14 (100)	14 (100)	1	13 (92,9)	1	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	8 (0-26)	0 (0-50)	0,48	0 (0-17)	0 (0-4,5)	12 (5,5-28,5)	0,018	3 (0-17,5)	0,018	0,083
Celular (AMPLISPOT) cualitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-9,5)	2,5 (0-81,25)	0,92	4,5 (0-83)	0 (0-39)	0 (0-13,5)	0,12	0 (0-163)	0,46	0,3
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (16,7)	3 (25)	1	0 (0)	0 (0)	1 (7,1)	1	1 (7,1)	1	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1 (8,3)	3 (25)	1	2 (16,7)	3 (21,4)	0 (0)	0,25	3 (21,4)	0,5	-

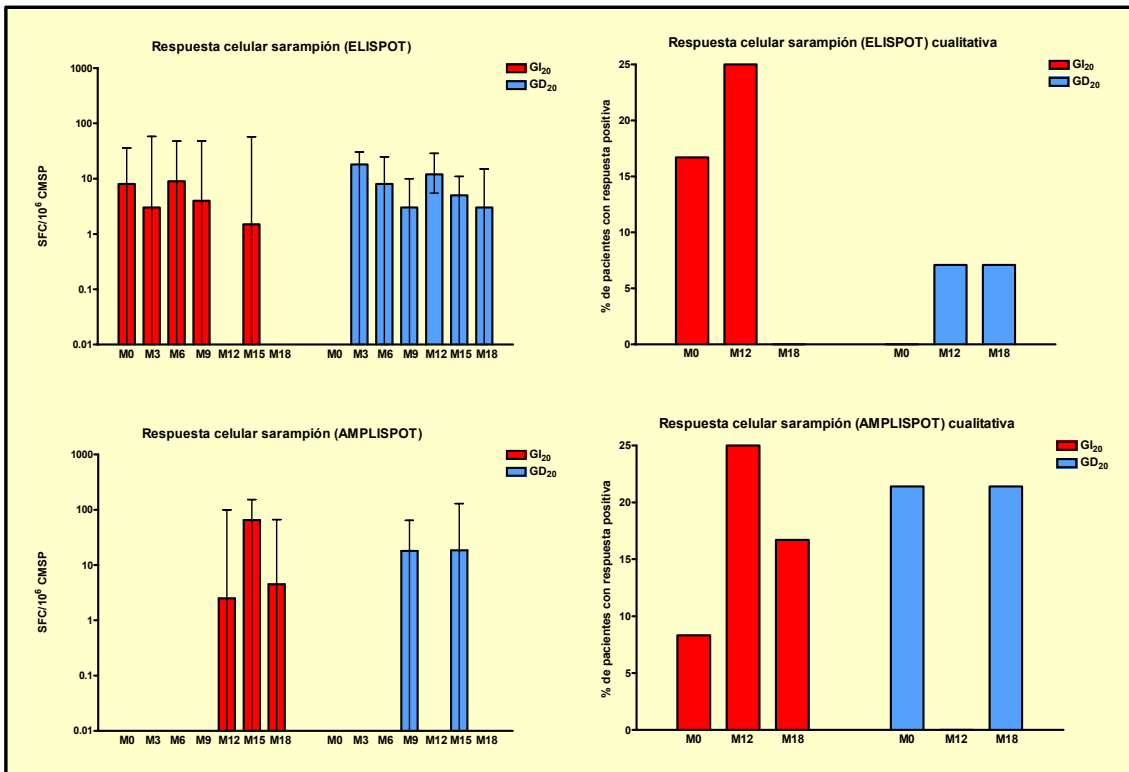


Figura R.2.66. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a sarampión durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

2.3.6.8. Respuesta a neumococo

- Respuesta humoral

No se hallaron diferencias a nivel basal entre los GD y GI en cuanto a la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa frente a neumococo (p = 0,59 y 0,65 respectivamente).

Durante el periodo de tratamiento se produjo un aumento en ambos grupos entre los meses 0 y 3, con una tendencia a ser significativamente mayor en el GD₂₀ (p = 0,085).

En el periodo sin TARGA no se observaron diferencias de comportamiento entre grupos (Tabla R.2.56. y Figura R.2.67.).

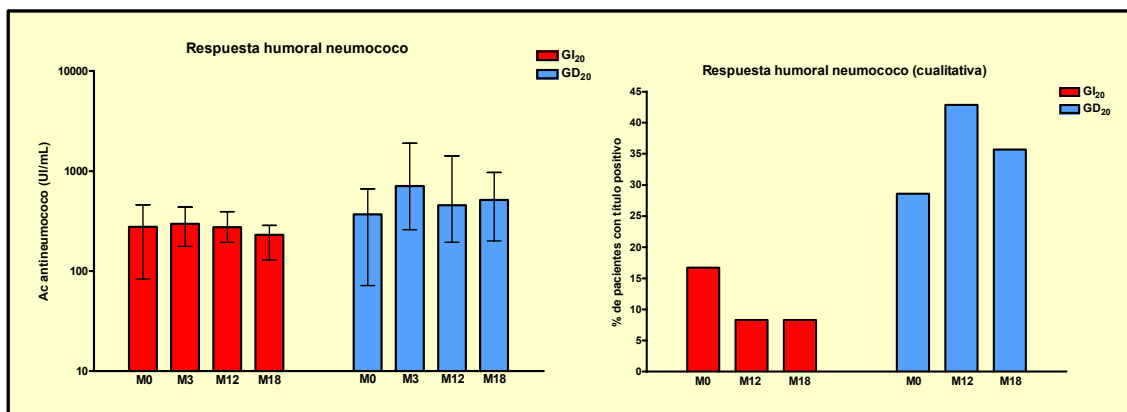


Figura R.2.67. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a neumococo durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (Ac: Anticuerpos; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

• Respuesta celular

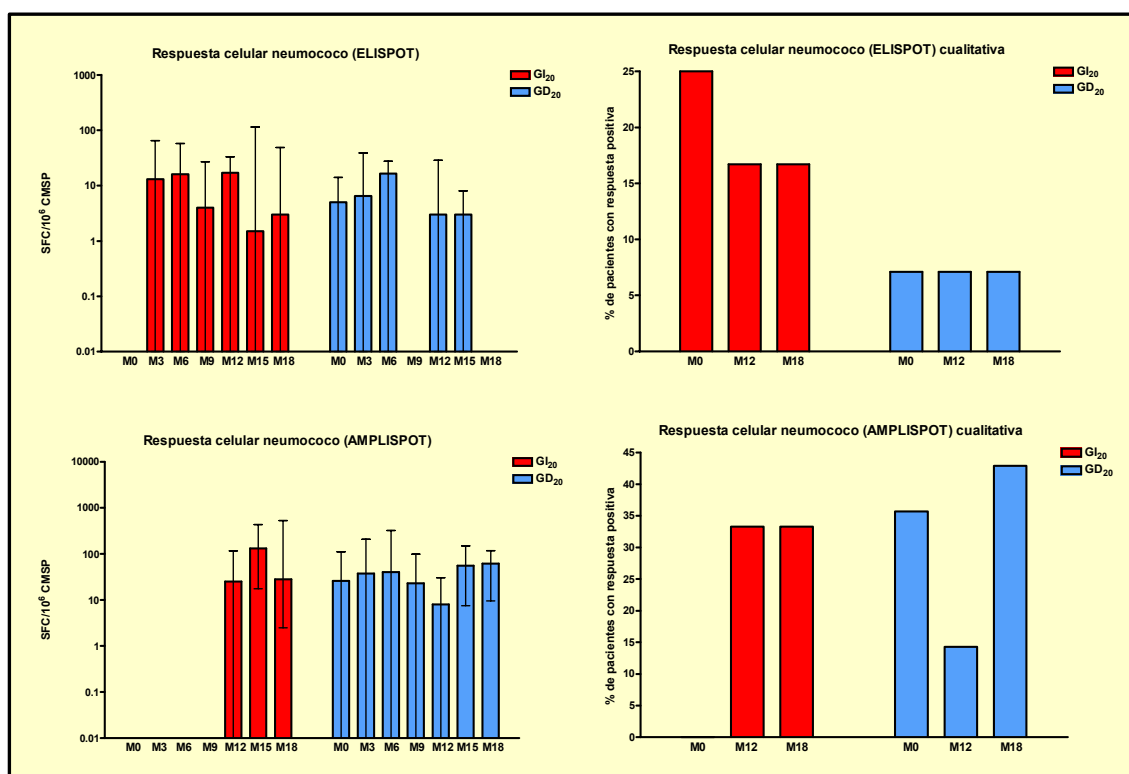


Figura R.2.68. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a neumococo durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.2.57. Respuestas inmune humoral y celular a neumococo, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a neumococo	Grupo indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 20 copias/mL)				P**	P***	
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (mUI/mL)	278 (74,25-511)	275 (180,5-429,75)	0,58	230 (129,25-296,5)	368,5 (79,25-662)	457 (194,5-1419)	0,059	515 (168,75-971,75)	0,06	0,38	0,98
Humoral cualitativa	2 (16,7)	1 (8,3)	1	1 (8,3)	4 (28,6)	6 (42,9)	0,62	5 (35,7)	1	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-122,75)	17 (0-33)	0,48	3 (0-48,5)	5 (0-14)	3 (0-28,5)	0,73	0 (0-11,75)	0,11	0,41	0,44
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-13,75)	25 (0-110,75)	0,028	28 (1,25-554,25)	26 (0-110,75)	8 (0-30,5)	0,043	61,5 (14,25-104,75)	0,028	0,024	0,37
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (25)	2 (16,7)	1	2 (16,7)	1 (7,1)	1 (7,1)	1	1 (7,1)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	0 (0)	4 (33,3)	0,125	4 (33,3)	5 (35,7)	2 (14,3)	0,37	6 (42,9)	0,25	-	-

En el mes 0 las respuestas celulares por AMPLISPOT a neumococo en el GD₂₀ tuvieron una tendencia a ser significativamente superiores tanto en su medición cuantitativa ($p = 0,059$) como en la valoración cualitativa ($p = 0,04$). No se hallaron diferencias en la medición por ELISPOT cuantitativa ($p = 0,97$) ni cualitativa ($p = 0,28$).

Durante el periodo de tratamiento no se apreciaron diferencias significativas entre grupos en la evolución de la respuesta por ELISPOT. Por AMPLISPOT en el GI₂₀ se produjo un aumento de la respuesta entre los meses 0-9 y 0-12 significativamente diferente del descenso en el GD₂₀ para los mismos periodos ($p = 0,050$ y $0,024$ para la diferencia entre grupos en los periodos 0-9 y 0-12 respectivamente).

Durante la fase sin tratamiento no se observaron diferencias significativas en la evolución de las respuestas entre grupos (Tabla R.2.57. y Figura R.2.68.).

2.3.6.9. Respuesta a tétanos

- Respuesta humoral

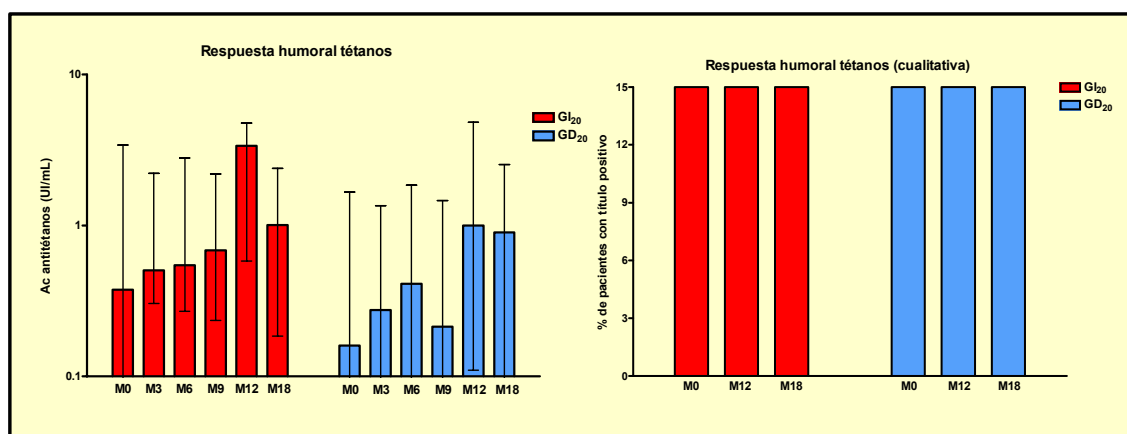


Figura R.2.69. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a tétanos durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (Ac: Anticuerpos; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable \geq 20 copias/mL)

Aunque basalmente el GD₂₀ presentaba un título menor de anticuerpos anti-tétanos, las diferencias cuantitativas y cualitativas no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,3$ y $0,22$, respectivamente).

Tabla R.2.58. Respuestas inmune humoral y celular a tétanos, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo. (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica; P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a tétanos	Grupo indetectable (< 20 copias/mL)				Grupo detectable (≥ 20 copias/mL)				P**	P***	
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (UI/mL)	0,37 (0,04-4,2)	3,37 (0,43-4,88)	0,075	1 (0,18-2,96)	0,16 (0,02-1,44)	1 (0,11-4,72)	0,034	0,9 (0,05-2,53)	0,016	0,7	0,65
Humoral cualitativa	12 (100)	11 (91,7)	1	11 (91,7)	11 (78,6)	12 (85,7)	1	10 (71,4)	0,5	-	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	3 (0-85,25)	5 (0-100)	0,5	27 (10-48,5)	0 (0-7)	8 (5-38)	0,12	4 (0-18,75)	0,18	0,12	0,01
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-13,75)	29,5 (0-63,25)	0,018	141,5 (15,25-504,25)	0 (0-39,25)	0 (0-27,5)	0,34	31 (0-114,25)	0,046	0,063	0,73
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (25)	3 (25)	1	3 (25)	0 (0)	2 (14,3)	1	2 (14,3)	1	-	-
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	1 (8,3)	4 (33,3)	0,125	5 (41,7)	2 (14,3)	1 (7,1)	1	4 (28,6)	0,5	-	-

Ni durante el tratamiento ni durante la interrupción se detectaron diferencias significativas entre grupos en la evolución de la respuesta humoral frente a tétanos, cuantitativa o cualitativa (Tabla R.2.58. y Figura R.2.69.).

- Respuesta celular

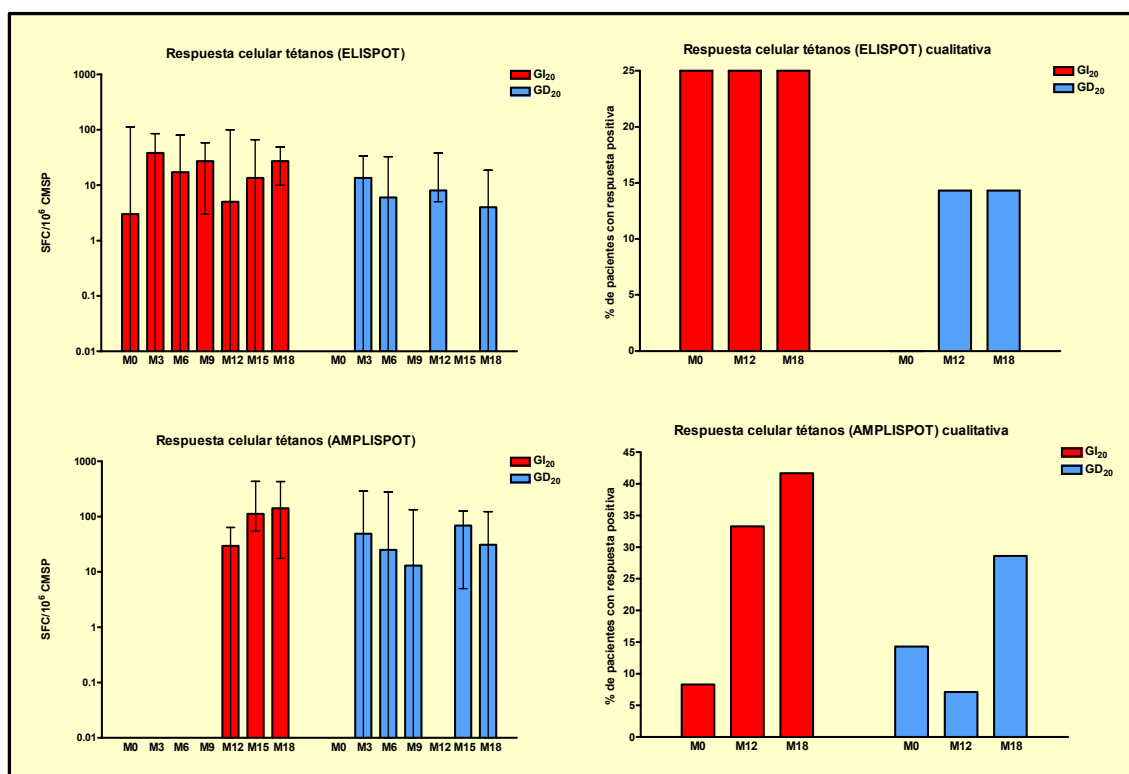


Figura R.2.70. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a tétanos durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica)

Las respuestas celulares basales a tétanos no mostraron diferencias entre grupos ($p = 0,3$ y $0,97$ para las cuantitativas, y $p = 0,068$ y 1 para las cualitativas por ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente). Sin embargo, durante el tratamiento sí se observaron diferentes tendencias en los grupos, de forma que por ELISPOT se observó entre los meses 9 y 12 una disminución de la respuesta en el GD₂₀ y un aumento en el GI₂₀ ($p = 0,043$), mientras que entre los meses 0 y 12 la tendencia fue a aumentar en ambos pero más en el GD₂₀ ($p = 0,003$). Por AMPLISPOT, el GI₂₀

presentó un aumento entre los meses 0 y 12 significativamente superior al que presentó el GD₂₀ ($p = 0,063$). Las respuestas cualitativas no mostraron diferencias significativas.

Durante la fase sin TARGA también se observaron diferencias en las respuestas por ELISPOT, con un aumento en el GI₂₀ y un descenso en el GD₂₀ ($p = 0,010$). No se observaron cambios significativamente diferentes entre grupos (Tabla R.2. 58. y Figura R.2.70.).

2.3.6.10. Respuesta a difteria

Las respuestas humorales a difteria en el mes 0 no fueron diferentes de forma significativa, ni cuantitativa ni cualitativamente ($p = 0,3$ y $p = 1$, respectivamente).

Con el tratamiento y posteriormente con la interrupción no se produjeron cambios significativamente diferentes entre grupos (Tabla R.2.59. y Figura R.2.71.).

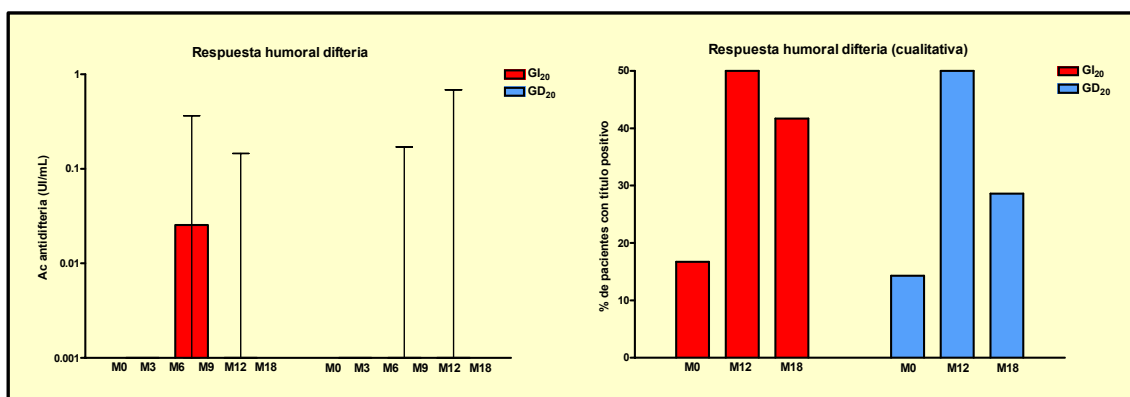


Figura R.2.71. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a difteria durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico para las respuestas cuantitativas y la proporción de pacientes positivos para las cualitativas (Ac: Anticuerpos; GI₂₀: Grupo Indetectable < 20 copias/mL; GD₂₀: Grupo Detectable ≥ 20 copias/mL)

Tabla R.2.59. Respuestas inmune humoral y celular a difteria, tanto cuantitativa como cualitativa, en los grupos indetectable y detectable según el límite de carga viral en 20 copias/mL. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los cualitativos, el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (P* de la diferencia 12-18 intragrupo; P** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 0 y 12; P*** de la comparación entre los dos grupos de los cocientes de respuesta entre los meses 12 y 18)

Respuesta a difteria	Grupo indetectable (<20 copias/mL)				Grupo detectable (≥20 copias/mL)				P*	P**	P***
	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18	Mes 0	Mes 12	P	Mes 18			
Humoral cuantitativa (U/ml)	0,01 (0,01-0,01)	0,02 (0,01-0,38)	0,028	0,01 (0,01-0,15)	0,01 (0,01-0,01)	0,01 (0,01-0,13)	0,027	0,01 (0,01-0,68)	0,5	0,46	0,61
Humoral cualitativa	2 (16,7)	6 (50)	0,12	5 (41,7)	2 (14,3)	7 (50)	0,063	4 (28,6)	0,37	-	-

2.4. RESUMEN DEL SUBESTUDIO A (APARTADO 2): ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE EPISODIOS DE CARGA VIRAL DETECTABLE SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y EL REBOTE DE LA CARGA VIRAL DURANTE EL TARGA Y TRAS SU INTERRUPCIÓN

2.4.1. Subestudio A1: Estudio de la influencia de episodios de carga viral detectable ≥ 200 copias/mL sobre el sistema inmunitario y el rebote de la carga viral durante el TARGA y tras su interrupción.

Ante la ausencia de relación entre las vacunaciones y los EVI, se analizó la influencia de éstos sobre los diferentes parámetros inmunológicos y virológicos durante el TARGA y tras su interrupción, de forma independiente de las vacunaciones, y con dos tipos de ensayos: uno con límite inferior de detectabilidad de 200 copias/mL (subestudio A1) y otro de 20 copias/mL (Subestudio A2).

No se hallaron circunstancias asociadas a la infección por el VIH, al TARGA o a las características generales que se asociasen a los EVI, ni basalmente ni durante el tratamiento.

Sin embargo, nuestro estudio halló una asociación de los EVI con cambios en el sistema inmune, de forma que, ya basalmente, el GD presentó un número menor fundamentalmente de linfocitos T CD4⁺ totales, linfocitos T CD4⁺ *naïve* (CD45RA⁺RO⁻ y CD45RACD62L⁺) y CD8⁺CD38⁺, así como una mayor proporción de linfocitos T CD8⁺ y de respuestas CD8⁺ anti-VIH específicas. Durante el tratamiento, estas diferencias basales se mantuvieron y se añadieron otras como el aumento de la subpoblación linfocitaria CD4⁺CD38⁺HLADR⁺.

Tras la interrupción del TARGA, el GD presentó un mayor rebote virológico. Además, su sistema inmune también evolucionó de forma diferente, fundamentalmente en los cambios más precoces del periodo (meses 12-14). De este modo, los linfocitos T CD4⁺, el cociente CD4⁺/CD8⁺ y los linfocitos T CD8⁺CD28⁺, aunque disminuyeron en los dos grupos, lo hicieron de forma mayor y más precoz en el GD, y aunque con posterioridad tendieran a igualarse las pérdidas a lo largo de los 6 meses, el GD mantuvo cifras inferiores. Y los linfocitos T con marcadores de activación (CD4⁺CD38⁺, CD4⁺CD38⁺HLADR⁺, CD8⁺CD38⁺,

CD8⁺CD38⁺HLADR⁺ y CD8⁺CCR5⁺) presentaron la tendencia contraria, aumentando en los dos grupos, pero más y más precozmente en el GD. También la proliferación de las células *naïve* aumentó más en el GD tras la interrupción, a pesar de lo cual no aumentaron en proporción sino que incluso las CD8⁺ descendieron, sugiriendo una mayor afectación de este compartimento en el GD.

Por lo que respecta a las respuestas celulares frente al VIH, las CD8⁺ específicas se mantuvieron en el GD tras la interrupción, y aumentaron en el GI hasta alcanzar niveles similares, mientras que las respuestas linfoproliferativas CD4⁺ aumentaron más en el grupo que había presentado EVI. A diferencia de éstas últimas, las respuestas linfoproliferativas a mitógenos aumentaron más en el GI.

En lo referente a la potencial influencia de los EVI sobre la función tímica, éstos se asociaron basalmente a un mayor volumen tímico pero con menos copias de *TRECs* y células *naïve*. Por otro lado, se asociaron a un aumento, tras la interrupción, de la expresión del receptor de la IL-7 en las células memoria (CD4⁺ y CD8⁺).

Finalmente, los EVI se asociaron a una menor concentración de anticuerpos frente a los diferentes antígenos vacunales basalmente (VHA, VHB, rubéola, neumococo y tétanos), pero no a una diferente respuesta vacunal.

2.4.2. Subestudio A2: Estudio de la influencia de episodios de carga viral detectable ≥ 20 copias/mL sobre el sistema inmunitario y el rebote de la carga viral durante el TARGA y tras su interrupción. Diferencias con los episodios ≥ 200 copias/mL.

Cuando se repitió el análisis de las CV con un ensayo cuyo límite inferior de detección estaba por debajo de 20 copias/mL se produjo una detección de CV entre 20 y 200 copias/mL que anteriormente eran consideradas indetectables. Esto ocurrió concretamente en 28 determinaciones, 4 de las cuales resultaron superiores a 200 copias/mL. Y supuso considerar detectables a 4 pacientes que anteriormente estaban incluidos en el GI.

Aunque aumentaron algunas de las diferencias halladas entre grupos respecto al análisis para 200 copias/mL, como las diferencias basales respecto al sexo y la utilización de IP, o la

presencia de un menor nadir de linfocitos T CD4⁺ en el GD, en general se produjo una disminución de las diferencias entre el grupo que presentó CV detectables y el grupo que se mantuvo indetectable. Esta disminución de las diferencias apareció tanto en las subpoblaciones linfocitarias, en las respuestas linfoproliferativas, sobre todo a p24, en las respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH, la función tímica, el sistema IL-7/IL-7R y las respuestas a antígenos vacunales.

3. SUBESTUDIO B: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TÍMICA Y EL SISTEMA IL-7/IL-7R TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)

3.1. INTRODUCCIÓN

Aprovechando las determinaciones realizadas para la valoración de la función tímica, viendo que no existían diferencias significativas en los parámetros de función tímica tras la interrupción, independientemente del grupo de estudio que hablemos, y dado que la literatura acerca de la influencia de las interrupciones de tratamiento sobre el timo y el sistema IL-7/IL-7R es escasa, se realizó un análisis de la influencia de la interrupción sobre estos dos aspectos incluyendo todos los pacientes de la cohorte. Se incluyeron para ello los 25 pacientes del estudio que interrumpieron el tratamiento (recordamos que 1 paciente fue pérdida de seguimiento en el mes 9 por *exitus*).

3.2. EFECTO DE LA INTERRUPCIÓN TERAPÉUTICA SOBRE LA FUNCIÓN TÍMICA

3.2.1. Copias de *TRECs*

- *TRECs*/μL: Durante los 12 meses en los que los pacientes recibieron TARGA, el número de *TRECs*/μL aumentó de forma significativa ($p = 0,012$). Al suspender el tratamiento se produjo una caída inicial brusca de las copias de *TRECs*/μL hasta el mes 15, significativa ($p < 0,001$), con un ascenso progresivo posterior en los 3 meses siguientes, también significativo ($p = 0,039$), pero que no alcanzó el nivel del mes 12 y siguió siendo significativamente inferior ($p = 0,006$) (**Figura R.3.1.** y **Tabla R.3.1.**).

- *TRECs* por célula: A diferencia de los *TRECs*/μL los *TRECs*/10⁶ CMSP se mantuvieron estables durante el periodo de tratamiento, sin cambios significativos. Pero al suspender el tratamiento experimentaron la misma tendencia que los anteriores: un descenso

inicial en los tres primeros meses, no tan marcado como para los *TRECs*/ μ L pero también significativo ($p = 0,004$), con una recuperación posterior hasta el mes 18 que en este caso no fue significativa ($p = 0,22$) (**Figura R.3.1.** y **Tabla R.3.1.**).

3.2.2. Tejido tímico

Durante el periodo de tratamiento el volumen tímico medido en cm^3 aumentó de forma significativa ($p = 0,024$), mientras que no existieron cambios significativos en la estimación por índices ($p = 0,33$). Tras la suspensión del TARGA ambas medidas disminuyeron, pero de forma no significativa (**Figura R.3.1.** y **Tabla R.3.1.**).

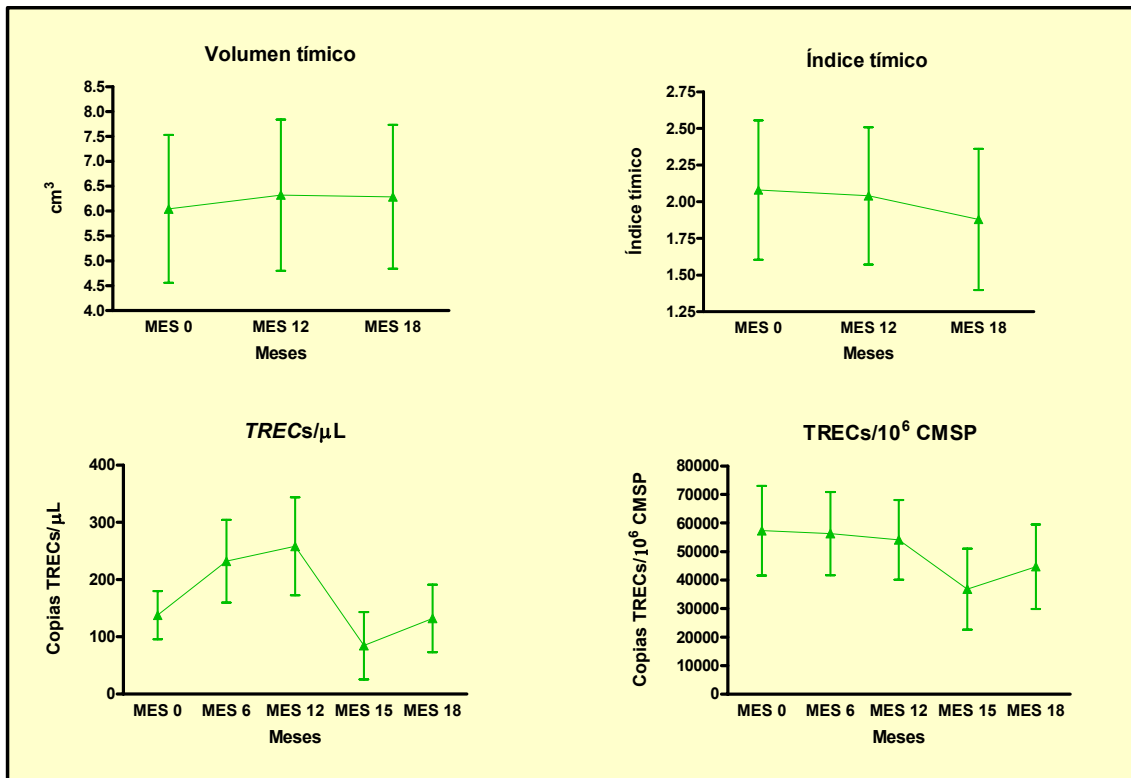


Figura R.3.1. Evolución de los parámetros de función tímica durante el tratamiento y tras la parada en el global de la cohorte. Se muestran la media y el 95% del IC de cada determinación (*TRECs*: Círculos de escisión del receptor de la célula T; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

3.2.3. Poblaciones linfocitarias con fenotipo *naïve*

- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: Tras la interrupción del TARGA presentaron un mantenimiento-descenso inicial, sin cambios significativos durante los primeros tres meses, con una elevación posterior entre los meses 15 y 18 que llegó a la significación estadística ($p = 0,001$) (**Figura R.3.2.** y **Tabla R.3.1.**).
- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺: Su evolución durante la interrupción fue paralela a la anterior, con un ascenso también significativo entre los meses 15 y 18 del protocolo ($p = 0,008$) (**Figura R.3.2.** y **Tabla R.3.1.**).
- Linfocitos CD4⁺CD45RA⁺Ki-67⁺: Esta población aumentó significativamente durante el periodo de tratamiento ($p = 0,007$). Posteriormente, durante los 6 meses de interrupción experimentó un ascenso inicial hasta el mes 15 y un posterior descenso, no siendo significativo ninguno de los dos (**Figura R.3.2.** y **Tabla R.3.1.**).
- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻: Con la interrupción del TARGA también experimentó un descenso significativo, fundamentalmente durante los tres primeros meses ($p < 0,001$), con una estabilización posterior hasta el mes 18 (**Figura R.3.2.** y **Tabla R.3.1.**).
- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺: Su evolución fue paralela a la subpoblación anterior, aunque el descenso tras la interrupción del tratamiento no fue tan marcado, pero también significativo ($p = 0,001$) (**Figura R.3.2.** y **Tabla R.3.1.**).
- Linfocitos CD8⁺CD45RA⁺Ki-67⁺: Durante los 12 meses de tratamiento presentó un aumento significativo ($p = 0,004$). En el periodo sin tratamiento presentó un aumento inicial, fundamentalmente hasta el mes 14 ($p = 0,015$ para la diferencia 12-14), con un descenso posterior también significativo ($p = 0,016$ para la diferencia 14-18) (**Figura R.3.2.** y **Tabla R.3.1.**).

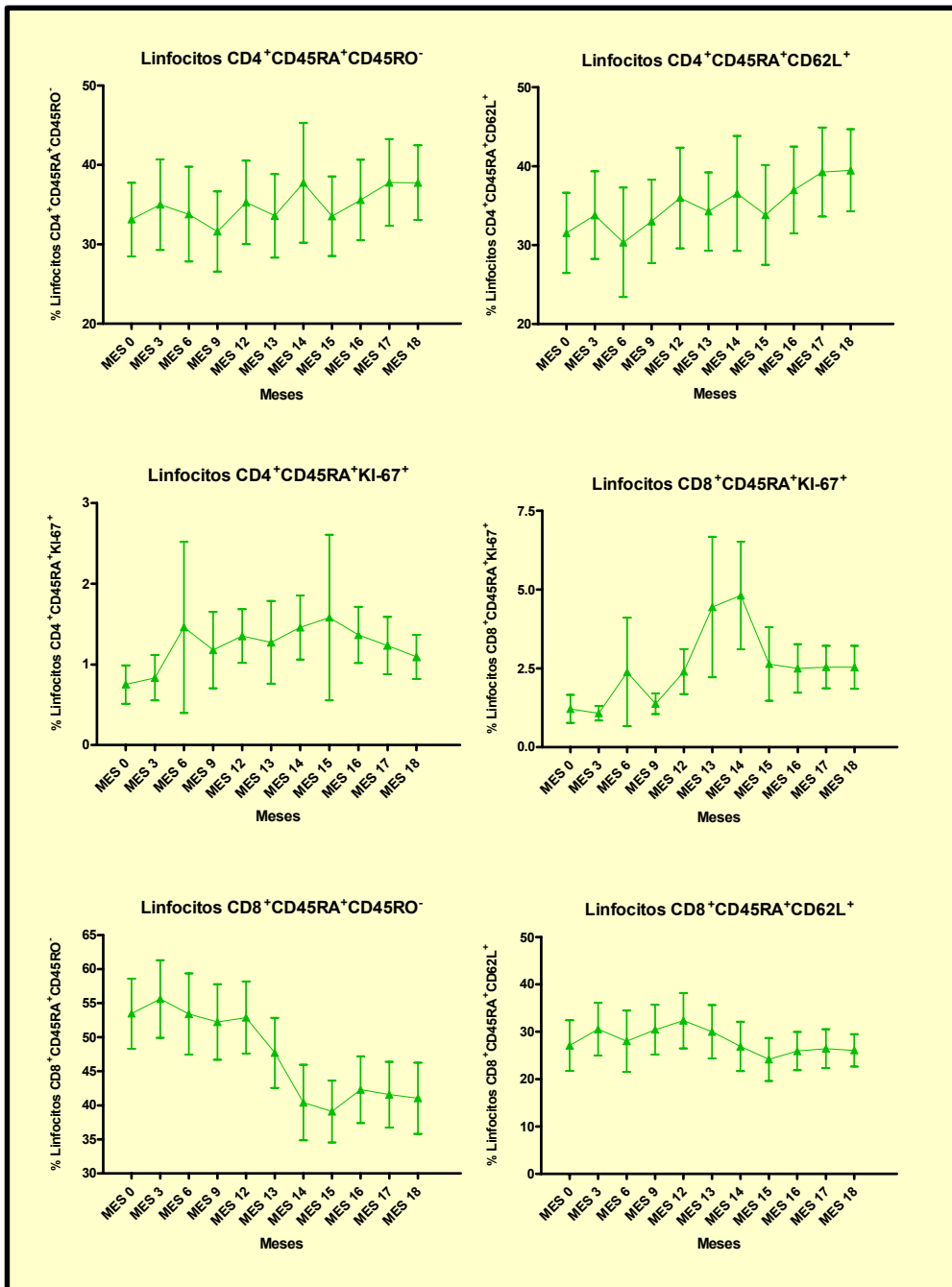


Figura R.3.2. Evolución de las subpoblaciones con marcaje fenotípico *naïve* durante el tratamiento y tras la parada en el global de la cohorte. Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación

Finalmente, cuando se exploraron las correlaciones entre el volumen tímico y rebote de la carga viral no se hallaron correlaciones significativas entre ninguno de los valores de volumen tímico (en cm^3 o índice) y los parámetros virológicos del rebote ($p > 0,5$). Tampoco se halló correlación entre el volumen tímico y la caída de linfocitos T CD4^+ en los primeros 6 meses de parada.

Tabla R.3.1. Evolución de los parámetros de función tímica, incluyendo las células con fenotipo naïve, durante el tratamiento y tras la parada en el global de la cohorte. Se exponen la media y la desviación típica de cada variable (TRECes: Círculos de escisión del receptor de la célula T; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Parámetros de función tímica	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Copias TRECes/μL	137,8 ± 103,73	258,26 ± 212,15	0,012	84,58 ± 142,9	< 0,001	131,94 ± 139,59	0,039	0,006
Copias TRECes/ 10 ⁶ CMSP	57350,44 ± 38867,39	54090,31 ± 34615,67	0,7	36803,6 ± 34369,87	0,004	44731,39 ± 35055,83	0,22	0,066
Volumen tímico (cm ³)	6,04 ± 3,6	6,32 ± 3,68	0,024	-	-	6,29 ± 3,5	0,77	-
Índice tímico	2,08 ± 1,15	2,04 ± 1,13	0,33	-	-	1,88 ± 1,17	0,1	-
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	33,11 ± 11,5	35,27 ± 12,72	0,14	33,53 ± 11,88	0,49	37,76 ± 11,12	0,01	0,27
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	31,54 ± 12,61	35,99 ± 15,47	0,13	33,81 ± 14,96	0,5	39,48 ± 12,33	0,008	0,18
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	0,75 ± 0,58	1,35 ± 0,8	0,007	1,58 ± 2,43	0,71	1,09 ± 0,65	0,97	0,14
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (%)	53,48 ± 12,75	52,9 ± 12,84	0,41	39,07 ± 10,76	< 0,001	41,03 ± 12,38	0,98	< 0,001
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	27,06 ± 13,26	32,35 ± 14,19	0,16	24,14 ± 10,7	0,001	26,09 ± 8,08	0,38	0,019
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Ki-67 ⁺ (%)	1,21 ± 1,08	2,4 ± 1,73	0,004	2,64 ± 2,76	0,79	2,53 ± 1,61	0,53	0,71

3.3. EFECTO DE LA INTERRUPCIÓN TERAPÉUTICA SOBRE EL SISTEMA IL-7/IL-7R

3.3.1. Niveles séricos de IL-7

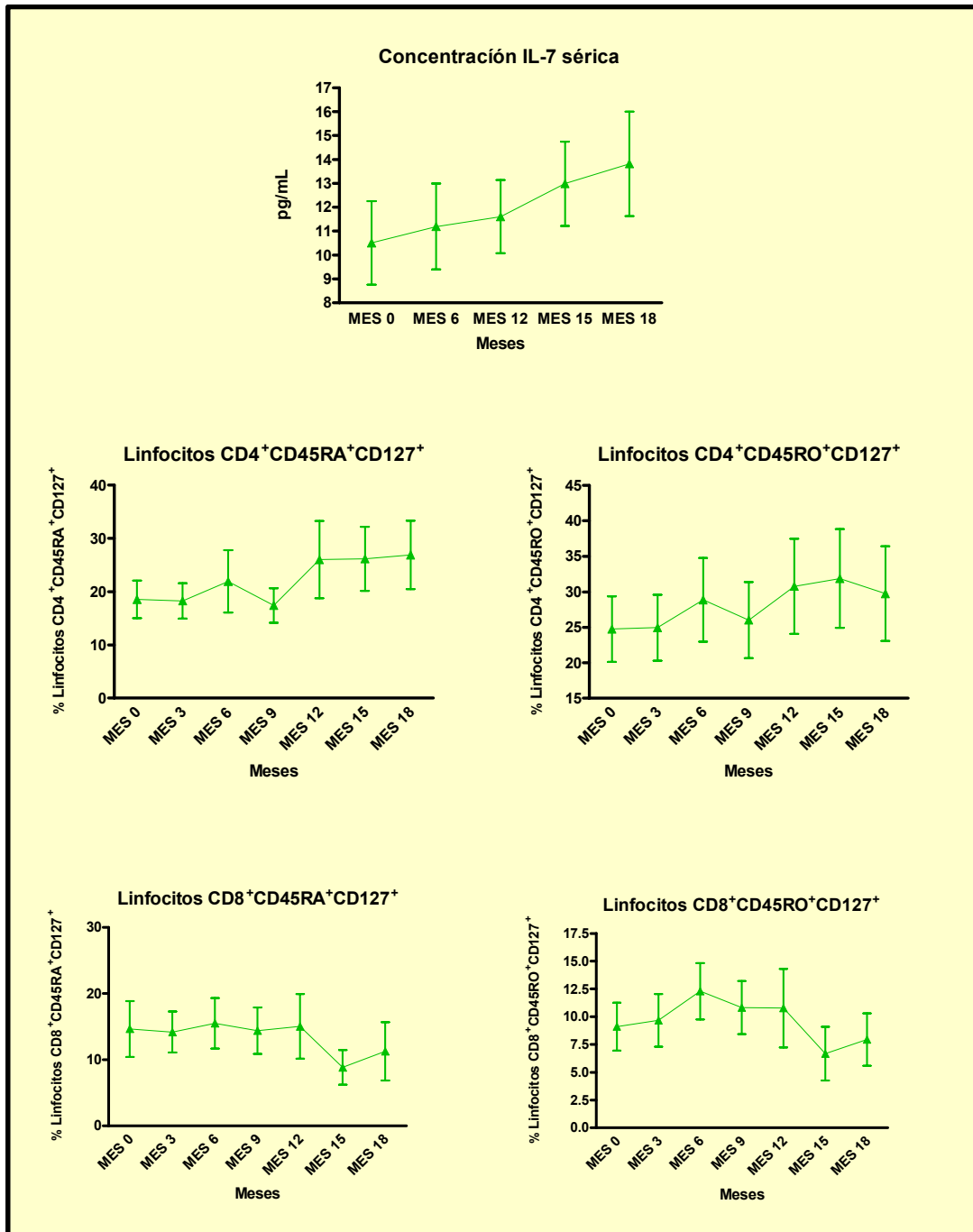


Figura R.3.3. Evolución del sistema IL-7/ IL-7R durante el tratamiento y tras la parada en el global de la cohorte.

Se muestran la media y el 95% del IC para cada determinación (IL-7: Interleucina 7; IL-7R: Receptor de la IL-7)

La concentración sérica de IL-7 presentó una tendencia no significativa ($p = 0,13$) a aumentar durante el periodo de tratamiento. Tras la suspensión del mismo presentó un aumento significativo, sobre todo en los primeros 3 meses, pero mantenido los 3 meses siguientes ($p = 0,028$ y $0,061$ para las diferencias 12-15 y 15-18 respectivamente) (**Figura R.3.3.** y **Tabla R.3.2.**).

Los niveles de IL-7 en el mes 12 (mes de la interrupción) se correlacionaron de forma negativa con la magnitud del rebote. Es decir, que aquellos pacientes con niveles de IL-7 más bajos tenían una mayor CV en el mes 13 ($r = -0,431$, $p = 0,04$), una tendencia a una mayor CV pico ($r = -0,394$; $p = 0,051$) y una mayor AUC de CV tras la parada ($r = -0,4$; $p = 0,047$), o lo que es lo mismo, que niveles más altos de IL-7 se asociaron a un menor rebote. En un sentido similar, se halló una correlación negativa entre el aumento de IL-7 entre los meses 12-15 y la caída de linfocitos T CD4⁺ en ese periodo ($r = 0,54$; $p = 0,01$) (**Figura R.3.4.**).

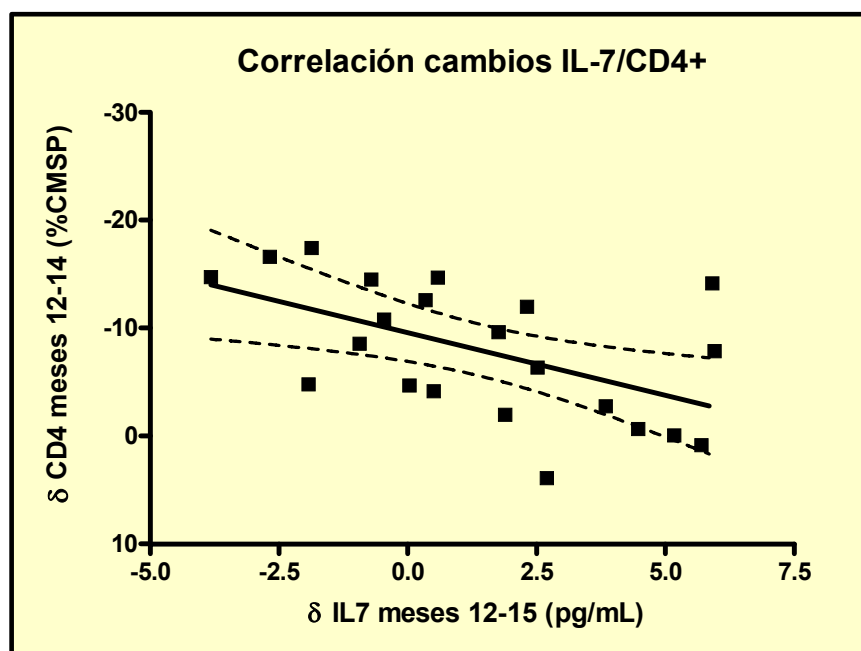


Figura R.3.4. Correlación entre el descenso de linfocitos T CD4⁺ en la primera parte del periodo de interrupción y el aumento de IL-7 en ese mismo periodo. Existe una correlación negativa, de forma que a mayor aumento de IL-7, menor descenso de linfocitos T CD4⁺ ($p = 0,01$)

3.3.2. Expresión de IL-7R

- Linfocitos $CD4^+CD45RA^+CD127L^+$: Presentó esta subpoblación durante el periodo de tratamiento un aumento progresivo significativo ($p = 0,045$). Tras la interrupción del tratamiento se mantuvo relativamente estable, con cierta tendencia inicial a seguir aumentando, aunque en menor medida ($p = 0,088$) (**Figura R.3.3.** y **Tabla R.3.2.**).

- Linfocitos $CD4^+CD45RO^+CD127^+$: Como la subpoblación anterior, aumentó durante el periodo de tratamiento, aunque sin alcanzar la significación estadística ($p = 0,074$); y tras la interrupción presentó una tendencia a aumentar inicialmente ($p = 0,04$ para la diferencia 12-15), para estabilizarse después (**Figura R.3.3.** y **Tabla R.3.2.**).

- Linfocitos $CD8^+CD45RA^+CD127L^+$: Contrariamente a las subpoblaciones $CD4^+CD127^+$, las $CD8^+CD127^+$ presentaron una disminución con la interrupción. Así, en el caso de los linfocitos $CD8^+CD45RA^+CD127L^+$, durante el periodo de tratamiento se mantuvieron estables, pero tras la interrupción del TARGA presentaron en la primera mitad de esa fase un descenso marcado y significativo ($p = 0,001$), con una estabilización posterior (**Figura R.3.3.** y **Tabla R.3.2.**).

- Linfocitos $CD8^+CD45RO^+CD127^+$: Paralela a la subpoblación anterior, tras la interrupción del TARGA descendió rápida y significativamente hasta el mes 15 ($p = 0,006$), y posteriormente se estabilizó e incluso tuvo tendencia a aumentar hasta el mes 18 ($p = 0,031$) (**Figura R.3.3.** y **Tabla R.3.2.**).

Tabla R.3.2. Evolución del sistema IL-7/ IL-7R durante el tratamiento y tras la parada en el global de la cohorte. Se expresan la media y la desviación típica de las diferentes variables (IL-7: Interleucina 7; IL-7R: Receptor de la IL-7)

Sistema IL-7 / Receptor de IL-7	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Concentración IL-7 (pg/mL)	10,51 ± 4,33	11,6 ± 3,8	0,13	12,98 ± 4,26	0,028	13,81 ± 5,18	0,061	0,002
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	18,57 ± 8,52	26,04 ± 17,52	0,045	26,19 ± 14,22	0,088	26,92 ± 15,25	0,93	0,54
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	24,75 ± 11,21	30,77 ± 16,24	0,074	31,88 ± 16,48	0,04	29,75 ± 15,82	0,33	0,94
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD127 ⁺ (%)	14,63 ± 10,17	15,03 ± 11,87	0,86	8,83 ± 6,23	0,01	11,25 ± 10,42	0,27	0,27
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ (%)	9,11 ± 5,24	10,77 ± 8,55	0,35	6,67 ± 5,71	0,006	7,95 ± 5,57	0,031	0,098

3.4. RESUMEN DEL SUBESTUDIO B (APARTADO 3): ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TÍMICA Y EL SISTEMA IL-7/IL-7R TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)

3.4.1. Efecto de la interrupción terapéutica sobre la función tímica

Se analizó la evolución de los parámetros de función tímica tras la interrupción, observando que se produjo un descenso en el volumen tímico junto a un descenso inicial en las copias de *TRECs* hasta el mes 15, asociado a un aumento en la proliferación celular, y un ascenso entre los meses 15 y 18, cuando la proliferación se estabilizó.

Por otro lado, las células *naïve* se comportaron de forma diferente para los linfocitos T CD4⁺, que se mantuvieron estables los primeros tres meses con una tendencia al ascenso posteriormente; y los linfocitos T CD8⁺, que disminuyeron hasta el mes 15 para estabilizarse después.

3.4.2. Efecto de la interrupción terapéutica sobre el sistema IL-7/IL-7R

Tras la suspensión del TARGA se produjo un aumento de las concentraciones séricas de IL-7, fundamentalmente en los tres primeros meses. Por otro lado, el porcentaje de expresión del receptor de la IL-7, presentó una evolución diferente en función de las células CD4⁺ o CD8⁺. En los linfocitos T CD8⁺, se produjo un marcado descenso de la expresión del CD127 en la primera mitad del periodo (meses 12-15), tanto en las células CD45RA⁺ como CD45RO⁺, estabilizándose después hasta el mes 18. En el caso de los linfocitos T CD4⁺, el porcentaje de expresión del CD127 se mantuvo estable tanto en las células CD45RA⁺ como RO⁺ en los 6 siguientes a la interrupción.

4. SUBESTUDIO C: ESTUDIO DE LA RESPUESTA ADQUIRIDA A ANTÍGENOS VACUNALES TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)

4.1. INTRODUCCIÓN

El efecto que tiene la interrupción del tratamiento antirretroviral sobre las respuestas adquiridas a antígenos vacunales, tanto humoral como celular, ha sido poco estudiado. Es por ello que, aprovechando las determinaciones realizadas, se analizó globalmente la evolución de dicha respuesta al retirar el TARGA. Se incluyeron para ello los 25 pacientes del estudio que interrumpieron el tratamiento (recordemos que 1 paciente fue pérdida de seguimiento en el mes 9 por *exitus*).

4.2. RESPUESTA A VHA

4.2.1. Respuesta humoral

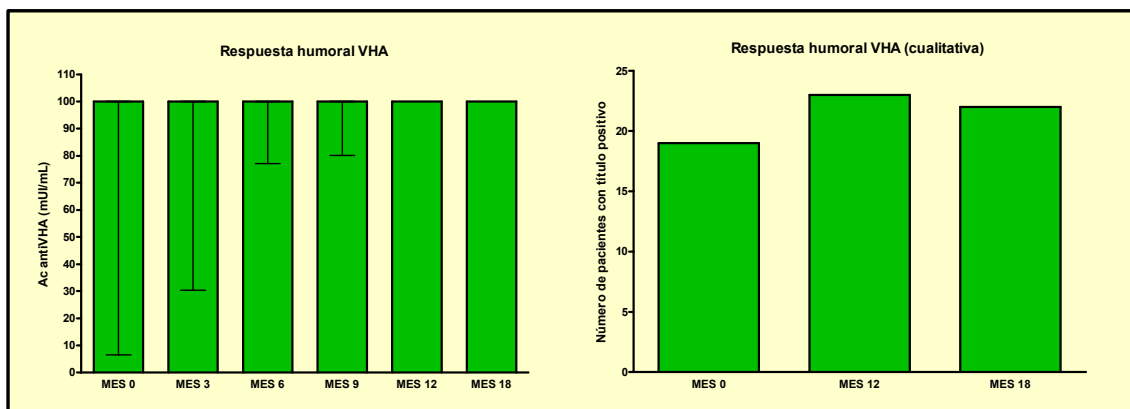


Figura R.4.1. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa al VHA durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VHA: Virus de la hepatitis A; Ac: Anticuerpos)

El título de anticuerpos frente a VHA, que globalmente había aumentado de forma significativa durante el periodo de tratamiento y vacunaciones/placebo ($p = 0,018$), tras los 6

meses sin tratamiento no presentó variaciones ni desde el punto de vista cuantitativo ni cualitativo (Tabla R.4.1. y Figura R.4.1.). Los títulos en el mes 18 fueron significativamente mayores a los del mes 0 ($p = 0,05$).

4.2.2. Respuesta celular

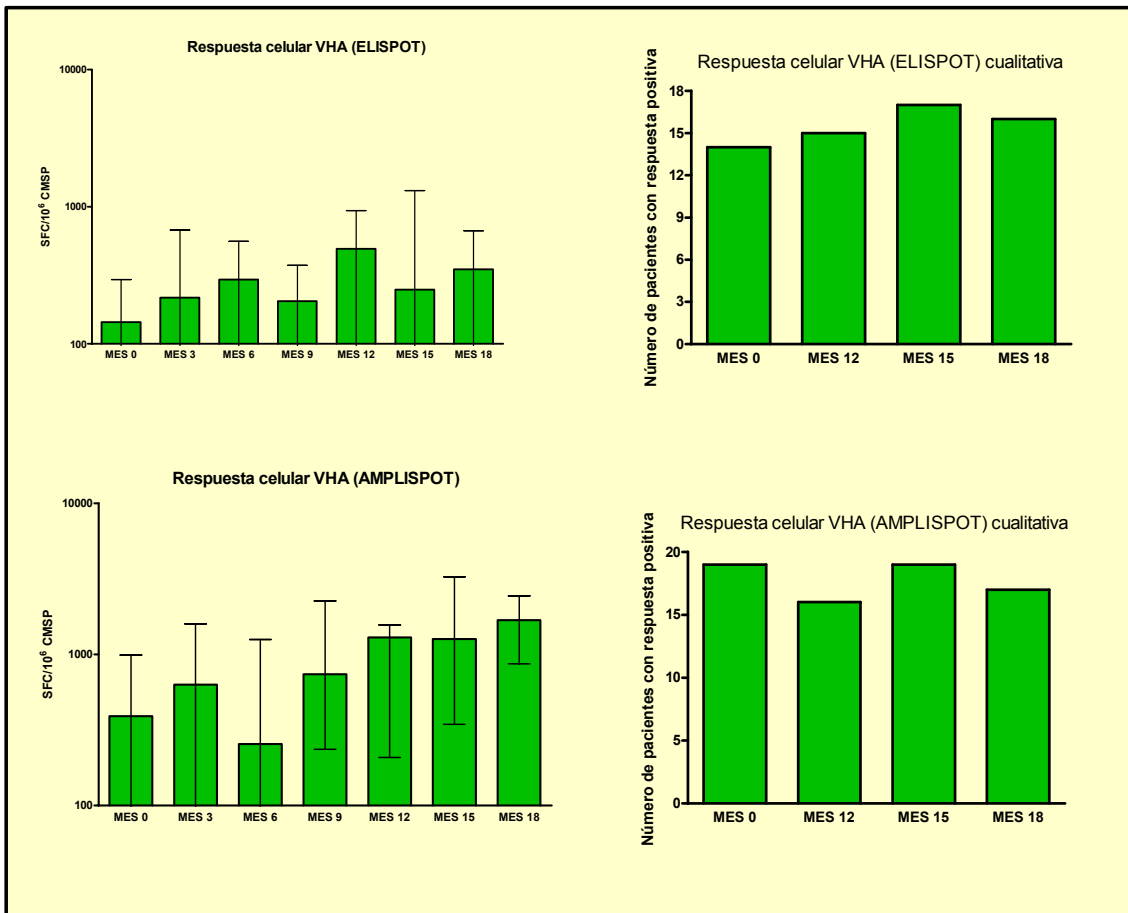


Figura R.4.2. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al VHA durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VHA: Virus hepatitis A; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Globalmente existió una tendencia tanto por ELISPOT como por AMPLISPOT a aumentar la respuesta celular durante los periodos de tratamiento y parada, de forma que al final del protocolo la respuesta fue significativamente mayor que al inicio del mismo ($p = 0,085$ y $0,026$ para la comparación entre las respuestas medidas en los meses 0 y 18 por ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente).

Durante la interrupción, la tendencia por ELISPOT fue a una disminución no significativa de las respuestas, y por AMPLISPOT a un aumento significativo de las mismas ($p = 0,019$) (Tabla R.4.1. y Figura R.4.2.).

Cualitativamente los cambios no fueron significativos.

Tabla R.4.1. Respuestas inmune humoral y celular a VHA, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción, en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (VHA: Virus hepatitis A; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta inmune a VHA	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Humoral cuantitativa (mU/mL)	100 (8-100)	100 (100-100)	0,018	-	-	100 (100-100)	-	0,5
Humoral cualitativa	19 (73,1)	23 (88,5)	0,12	-	-	22 (84,6)	-	1
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	144 (25-294)	493 (46-973,75)	0,23	249 (59,5-1314,5)	0,98	350 (56,5-669)	0,16	0,47
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	390 (75-935,75)	1296 (208-1567)	0,23	1266 (314,75-3300,5)	0,96	1689 (1073,5-2408)	0,92	0,019
Celular (ELISPOT) cualitativa	14 (53,8)	15 (57,7)	1	17 (65,4)	1	16 (61,5)	1	1
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	19 (73,1)	16 (61,5)	1	19 (73,1)	0,5	17 (65,4)	1	0,5

4.3. RESPUESTA A VHB

4.3.1. Respuesta humoral

Los títulos de anticuerpos frente al VHB, así como el porcentaje de pacientes con serología positiva, aumentaron en el periodo de tratamiento de forma global. Tras su suspensión no se observaron cambios significativos o incluso una tendencia no significativa a aumentar la respuesta cuantitativa y cualitativa ($p = 0,28$ y $0,5$ para las respuestas cuantitativas y cualitativa, respectivamente) (Tabla R.4.2. y Figura R.4.3). En cualquier caso, la respuesta humoral frente a VHB seguía siendo superior en el mes 18 que en el 0 de forma significativa o con tendencia a serlo ($p = 0,061$ para la respuesta cuantitativa y $0,016$ para la cualitativa).

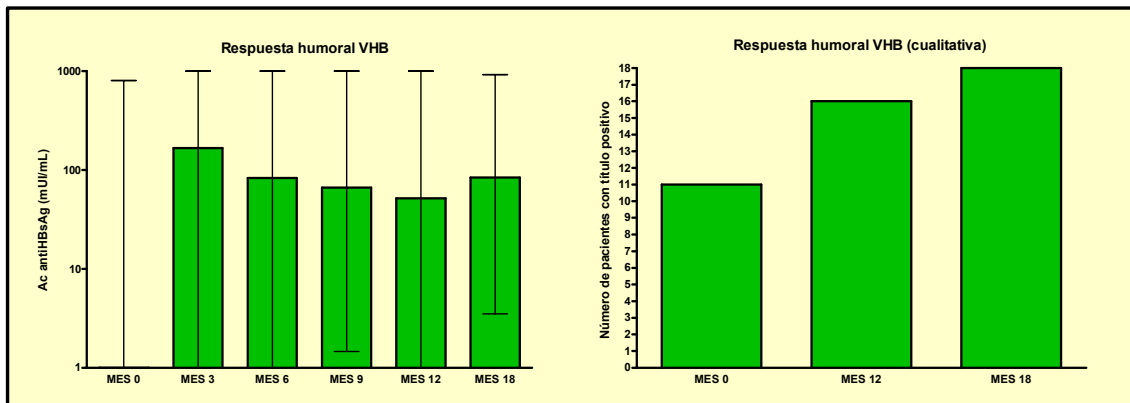


Figura R.4.3. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa al VHB durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VHB: Virus hepatitis B; Ac: Anticuerpos)

4.3.2. Respuesta celular

Se observó en la respuesta celular frente a VHB por ELISPOT una disminución significativa entre los meses 12 y 15 ($p = 0,006$), sin otros cambios significativos. En la respuesta por AMPLISPOT se observaron disminuciones entre los meses 12 y 18, tanto en la medición cuantitativa como cualitativa, sin ser significativos (Tabla R.4.2. y Figura R.4.4.).

Resultados

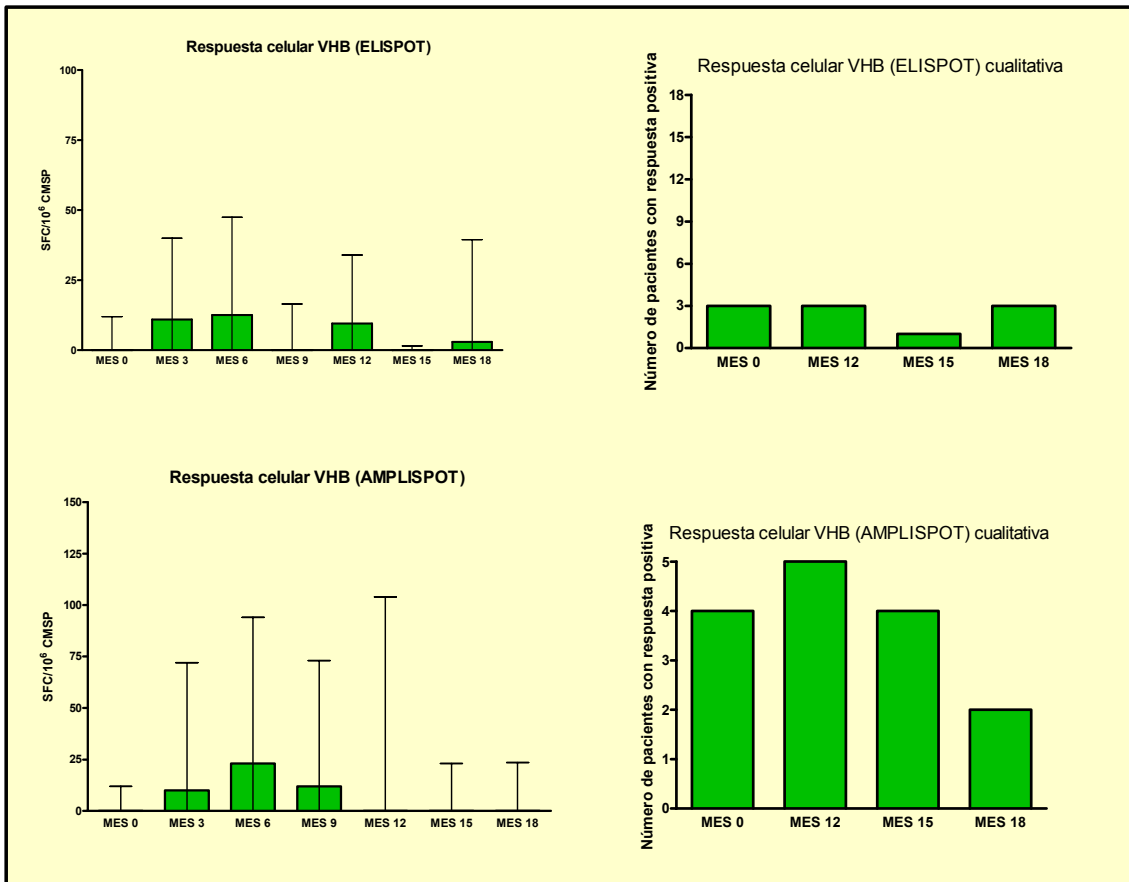


Figura R.4.4. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al VHB durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VHB: Virus hepatitis B; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.4.2. Respuestas inmune humoral y celular a VHB, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (VHB: Virus hepatitis B; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta inmune a VHB	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Humoral cuantitativa (mIU/mL)	1 (1-775,85)	51,78 (1-1000)	0,023	-	-	84,08 (3,52-917,45)	-	0,28
Humoral cualitativa	11 (42,3)	16 (61,5)	0,12	-	-	18 (69,2)	-	0,5
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-12)	9,5 (0-37)	0,45	0 (0-1,5)	0,006	3 (0-39,5)	0,091	0,83
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-10)	0 (0-104)	0,8	0 (0-24)	0,73	0 (0-22,75)	0,88	0,57
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (11,5)	3 (11,5)	1	1 (3,8)	0,5	3 (11,5)	0,62	1
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	4 (15,4)	5 (19,2)	1	4 (15,4)	1	2 (7,7)	0,62	1

4.4. RESPUESTA A GRIPE

4.4.1. Respuesta celular

En general la influencia de la interrupción de tratamiento en las respuestas celulares frente al virus de la gripe variaron en función de la técnica utilizada, de forma que, mientras que en las mediciones por ELISPOT se produjo un descenso con tendencia a la significación estadística ($p = 0,064$), por AMPLISPOT se produjo un aumento no significativo. El análisis como variable cualitativa no mostró cambios significativos (Tabla R.4.3. y Figura R.4.5.).

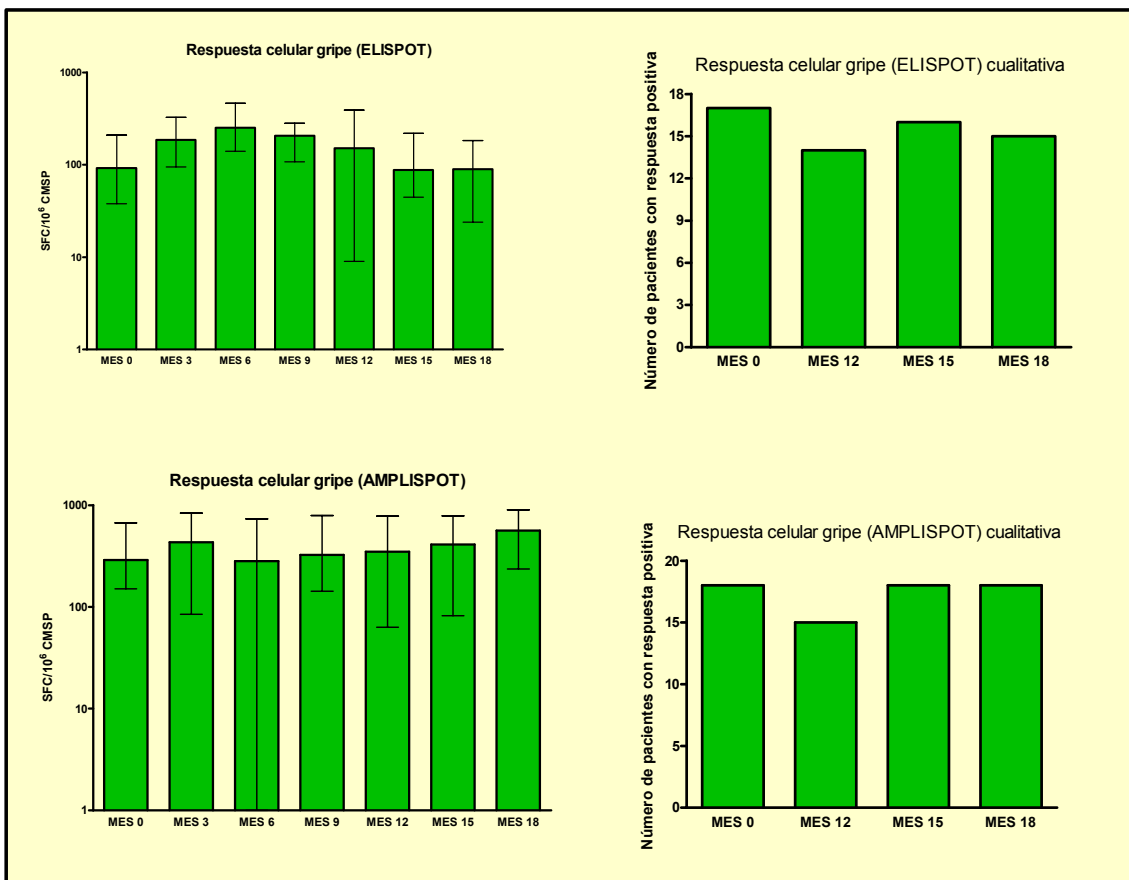


Figura R.4.5. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al virus de la gripe durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.4.3. Respuestas inmune celular a gripe, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción, en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta inmune a gripe	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	92 (38-209)	151,5 (4,5-392)	0,5	88 (44,5-219,5)	0,47	90 (24-182,5)	0,76	0,064
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	289 (168,75-639,5)	348 (63-778)	0,74	410 (77,5-815,5)	0,6	562,5 (272,75-897,5)	0,57	0,17
Celular (ELISPOT) cualitativa	17 (65,4)	14 (53,8)	1	16 (61,5)	1	15 (57,7)	1	1
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	18 (69,2)	15 (57,7)	0,69	18 (69,2)	0,62	18 (69,2)	0,5	0,25

4.5. RESPUESTA A VARICELA

4.5.1. Respuesta humoral

De los 25 pacientes con serología positiva para varicela, 1 negativizó durante el periodo de parada (Tabla R.4.4. y Figura R.4.6.).

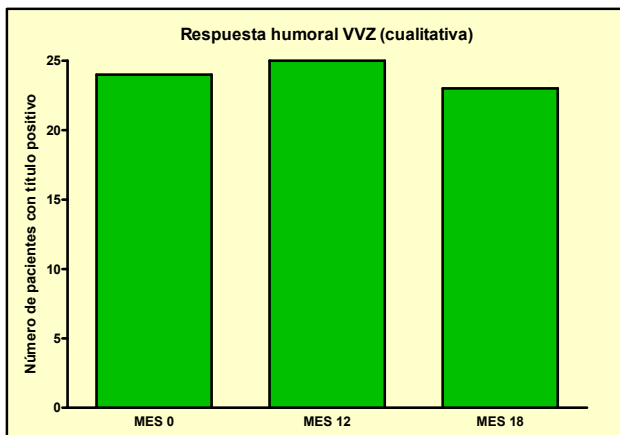


Figura R.4.6. Evolución de la respuesta humoral cualitativa al VVZ durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen el número de pacientes positivos (VVZ: Virus varicela zoster)

4.5.2. Respuesta celular

Desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo se produjo, en general, un aumento de la respuesta tanto por ELISPOT como por AMPLISPOT durante el periodo de parada, pero dichos aumentos no fueron significativos. Donde sí se alcanzó significación estadística fue al comparar la respuesta entre el inicio y el final del protocolo, de forma que la respuesta celular por ELISPOT y AMPLISPOT en el mes 18 fue significativamente mayor que en el mes 0 ($p = 0,058$ y $0,02$ para ELISPOT y AMPLISPOT respectivamente) (Tabla R.4.4. y Figura R.4.7.).

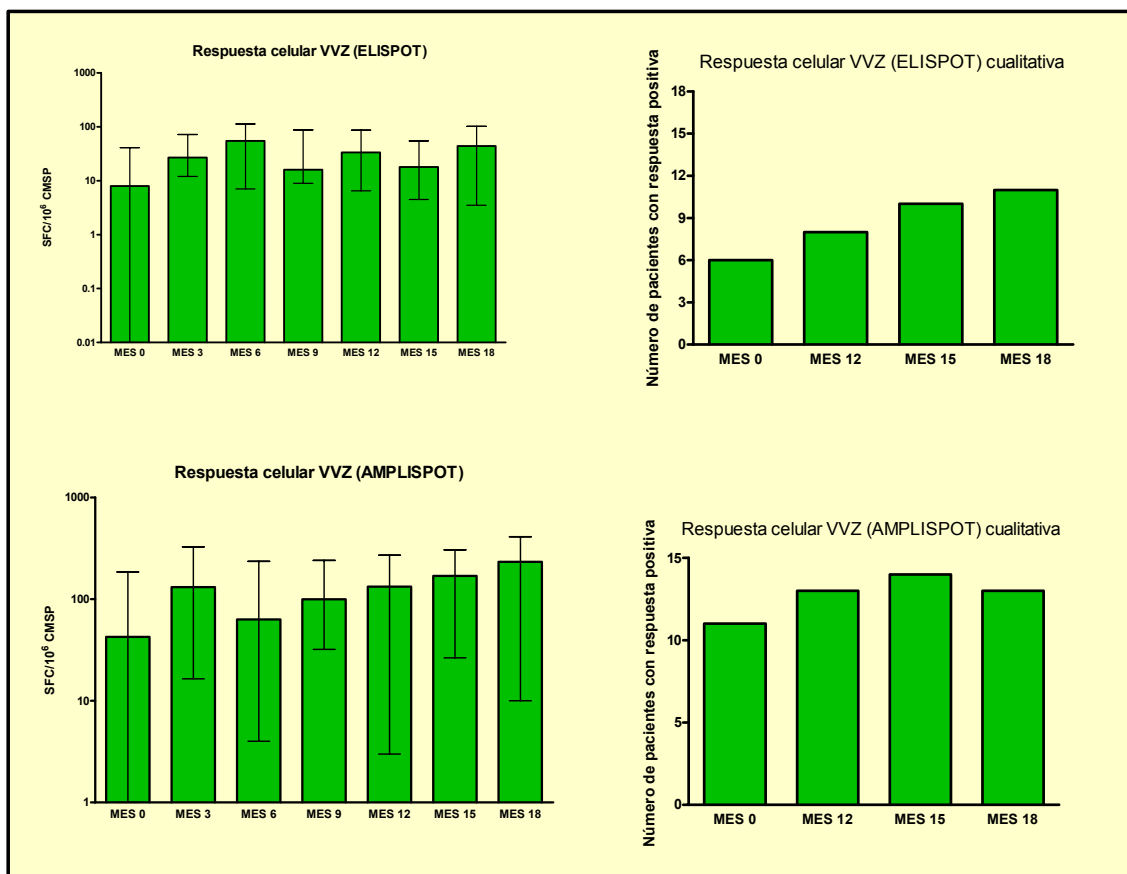


Figura R.4.7. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al VVZ durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (VVZ: Virus varicela zoster; SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.4.4. Respuestas inmune humoral y celular a varicela, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción, en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartilico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC; Células formadoras de spo/s; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta inmune a varicela	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Humoral cualitativa	24 (92,3)	25 (96,2)	1	-	-	23 (88,5)	-	1
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	8 (0-41)	33,5 (3,25-93)	0,37	18 (4,5-54,5)	0,69	44 (3,5-102,5)	0,96	0,19
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	42,5 (0-170,5)	133 (3-269)	0,84	169,5 (25,75-310,25)	0,68	232,5 (13-398,25)	0,5	0,31
Celular (ELISPOT) cualitativa	6 (23,1)	8 (30,8)	1	10 (38,5)	0,45	11 (42,3)	1	0,12
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	11 (42,3)	13 (50)	0,55	14 (53,8)	1	13 (50)	1	0,62

4.6. RESPUESTA A PAROTIDITIS

4.6.1. Respuesta humoral

Tres pacientes con serología positiva a parotiditis en el mes 12 negativizaron en el mes 18, mientras que un paciente que era negativo positivizó en ese mismo periodo (**Tabla R.4.5.** y **Figura R.4.8.**).

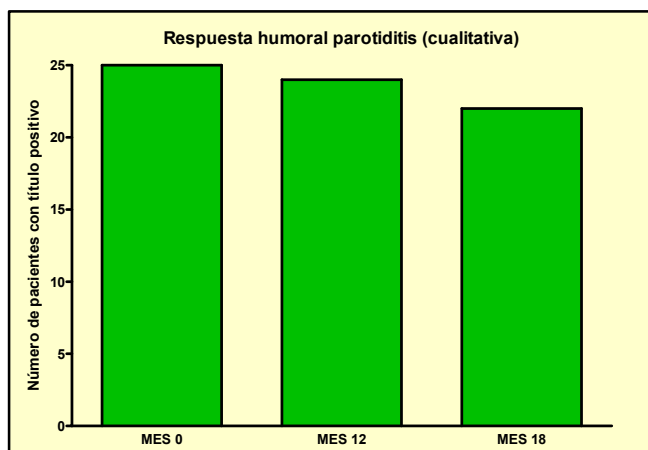


Figura R.4.8. Evolución de la respuesta humoral cualitativa a parotiditis durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen el número de pacientes positivos.

4.6.2. Respuesta celular

Durante los 6 meses sin TARGA se observó un aumento en las respuestas celulares frente a parotiditis, tanto cuantitativas por ELISPOT y AMPLISPOT, como cualitativas. Sin embargo, el único de estos aumentos que alcanzó la significación estadística fue el medido por AMPLISPOT ($p = 0,004$). Se produjo entre el mes 0 y 18 un aumento significativo en la respuesta cuantitativa medida por ambos métodos ($p = 0,015$ y $0,017$ para ELISPOT y AMPLISPOT, respectivamente) (**Tabla R.4.5.** y **Figura R.4.9.**).

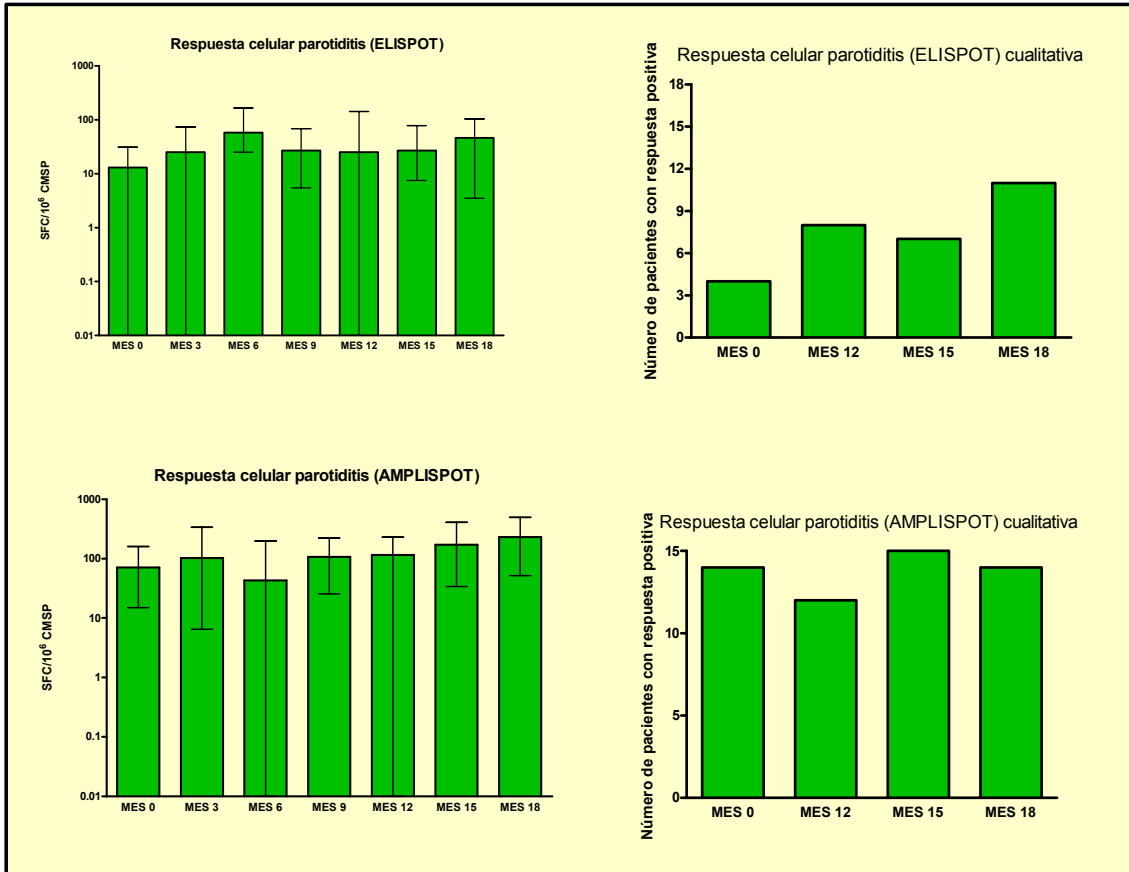


Figura R.4.9. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al virus parotiditis durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.4.5. Respuestas inmune humoral y celular a parotiditis, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción, en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartilico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta inmune a parotiditis	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Humoral cualitativa	25 (96,2)	24 (92,3)	1	-	-	22 (84,6)	-	0,62
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	13 (0-31)	25 (0-152)	0,3	27 (7,5-78)	0,36	46 (3,5-104,5)	0,86	0,44
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	71,5 (16-158,25)	115 (0-229)	0,88	172 (28,5-435)	0,43	231,5 (65,5-448,75)	0,46	0,004
Celular (ELISPOT) cualitativa	4 (15,4)	8 (30,8)	0,51	7 (26,9)	1	11 (42,3)	0,22	0,12
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	14 (53,8)	12 (46,2)	0,69	15 (57,7)	0,73	14 (53,8)	1	0,12

4.7. RESPUESTA A RUBÉOLA

4.7.1. Respuesta humoral

Desde el punto de vista cualitativo, el 100% de los pacientes era positivo en el mes 12 y lo siguió siendo en el mes 18. Por otro lado, cuantitativamente se produjo una disminución significativa en el título de anticuerpos en el periodo sin TARGA ($p < 0,001$), llegando a ser incluso significativamente menores que los títulos presentes al inicio del estudio ($p = 0,036$) (Tabla R.4.6. y Figura R.4.10.).

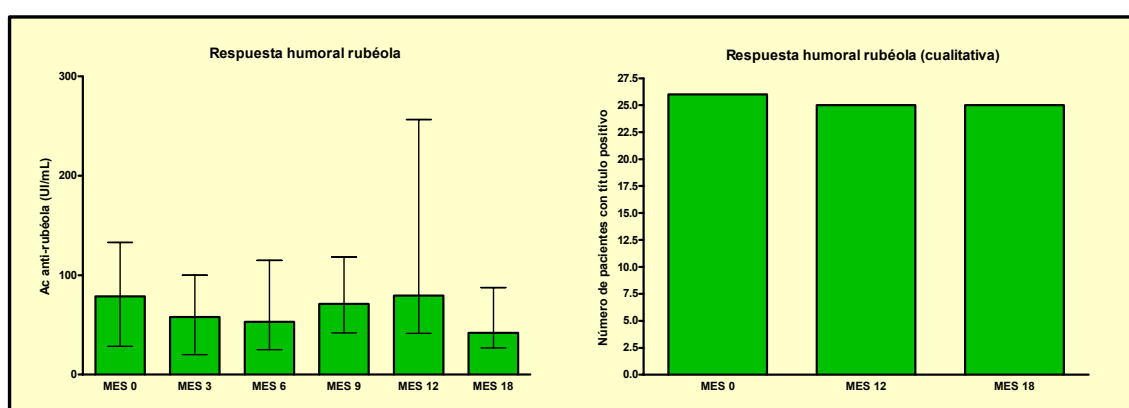


Figura R.4.10. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa al virus de la rubéola durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (Ac: Anticuerpos)

Tabla R.4.6. Respuestas inmune humoral y celular a rubéola, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción, en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo

Respuesta inmune a rubéola	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 18	P (12-18)
Humoral cuantitativa (UI/mL)	78,5 (28,75-128)	79,5 (43,25-251,25)	0,19	42 (27-87,5)	<0,001
Humoral cualitativa	26 (100)	25 (96,2)	1	25 (96,2)	1

4.8. RESPUESTA A SARAMPIÓN

4.8.1. Respuesta humoral

Ningún paciente de los positivos para sarampión en el mes 12 negativizó su serología en el mes 18 (Tabla R.4.7. y Figura R.4.11.).

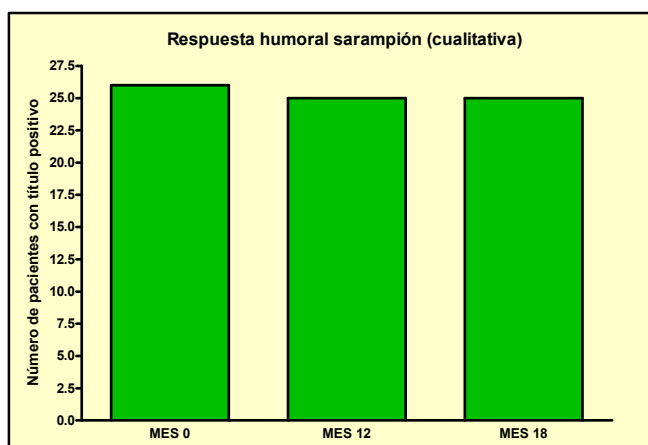


Figura R.4.11. Evolución de la respuesta humoral cualitativa al sarampión durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen el número de pacientes positivos

4.8.2. Respuesta celular

El único cambio significativo que se pudo objetivar en el estudio de la respuesta celular a sarampión tras la interrupción del tratamiento fue un aumento entre los meses 12 y 15 en la medida por AMPLISPOT, tanto cuantitativa ($p = 0,016$), como cualitativa ($p = 0,063$) (Tabla R.4.7. y Figura R.4.12.).

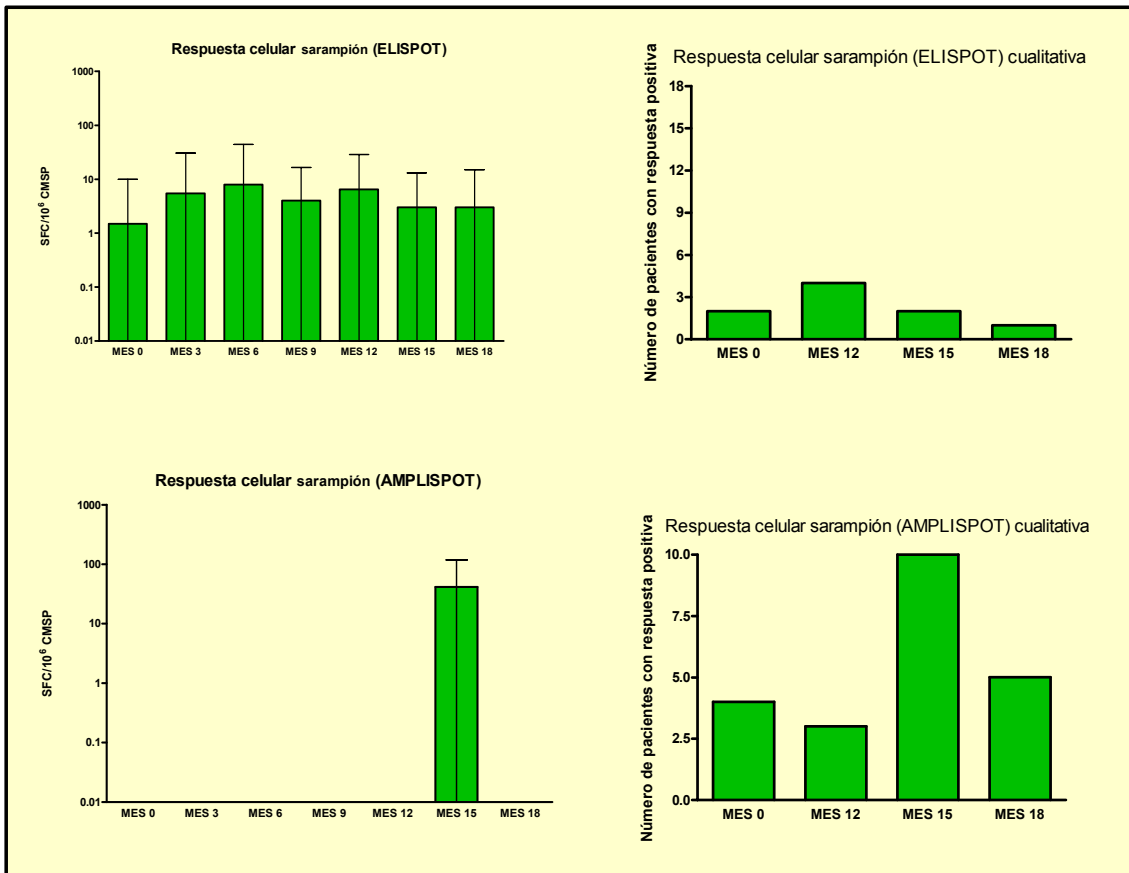


Figura R.4.12. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al virus sarampión durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.4.7 Respuestas inmune humoral y celular a sarampión, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción, en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de *spots*; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta inmune a sarampión	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Humoral cualitativa	26 (100)	25 (96,2)	1	-	-	25 (96,2)	1	-
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	1,5 (0-9)	6,5 (0-33,25)	0,52	3 (0-13)	0,36	3 (0-15)	0,53	0,31
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-30)	0 (0-17)	0,33	41,5 (0-119,5)	0,016	0 (0-112)	0,64	0,4
Celular (ELISPOT) cualitativa	2 (7,7)	4 (15,4)	1	2 (7,7)	1	1 (3,8)	0,5	0,5
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	4 (15,4)	3 (11,5)	0,69	10 (38,5)	0,063	5 (19,2)	0,45	0,62

4.9. RESPUESTA A NEUMOCOCO

4.9.1. Respuesta humoral

Tras los 6 meses del periodo de interrupción de tratamiento se objetivó un descenso significativo en el título de anticuerpos frente al neumococo ($p = 0,001$). Esta disminución situó estos títulos en un nivel inferior a los presentes en el mes 0 del protocolo, aunque esta diferencia no fue significativa ($p = 0,52$).

Cualitativamente, de los 7 pacientes considerados positivos en el mes 12 de protocolo, al finalizar los 6 meses sin TARGA dos habían negativizado. Sin embargo, también un paciente negativo antes de la parada presentó niveles positivos de anticuerpos frente al neumococo en el mes 18 (Tabla R.4.8. y Figura R.4.13.).

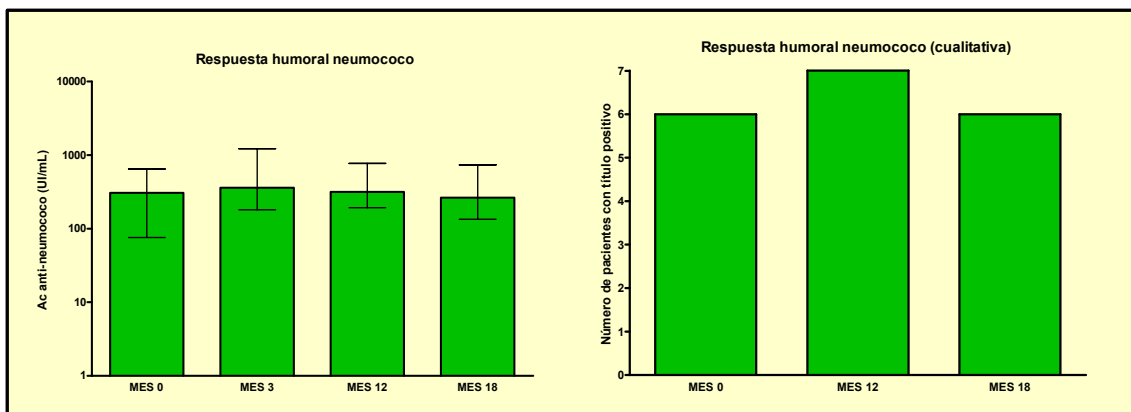


Figura R.4.13. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa al neumococo durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (Ac: Anticuerpos)

4.9.2. Respuesta celular

La evolución de la respuesta celular a neumococo tras la suspensión del tratamiento difirió en función de la técnica de medida. Mientras que por ELISPOT se detectó un descenso en la respuesta ($p = 0,091$), por AMPLISPOT se produjo un aumento ($p = 0,075$). Los cambios a nivel cualitativo no fueron significativos (Tabla R.4.8. y Figura R.4.14.).

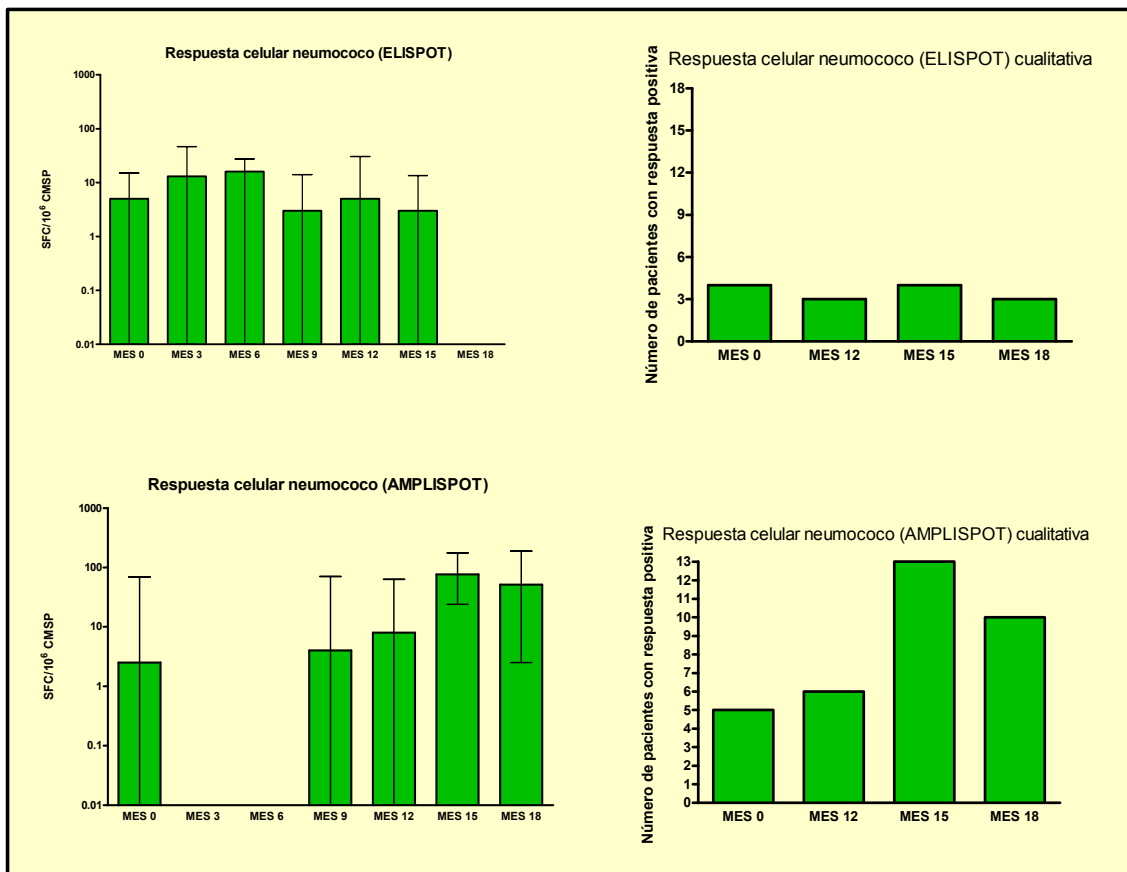


Figura R.4.14. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa al neumococo durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.4.8. Respuestas inmune humoral y celular a neumococo, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción, en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta inmune a neumococo	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Humoral cuantitativa (UI/mL)	306,5 (81,5-642,25)	317 (193-771)	0,074	-	-	264,5 (132-846,5)	-	0,001
Humoral cualitativa	6 (23,1)	7 (26,9)	1	-	-	6 (23,1)	-	1
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	5 (0-15)	5 (0-31,75)	0,53	3 (0-13,5)	0,89	0 (0-13,5)	0,42	0,091
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	2,5 (0-54,25)	8 (0-63)	0,71	76,5 (19,5-178)	0,009	51,5 (3,75-166)	0,69	0,075
Celular (ELISPOT) cualitativa	4 (15,4)	3 (11,5)	0,62	4 (15,4)	1	3 (11,5)	0,5	1
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	5 (19,2)	6 (23,1)	1	13 (50)	0,29	10 (38,5)	0,37	0,45

4.10. RESPUESTA A TÉTANOS

4.10.1. Respuesta humoral

Durante el periodo sin tratamiento se produjo un descenso significativo en el título de anticuerpos frente a *C. tetani* ($p < 0,001$), manteniéndose sin embargo los niveles superiores a los presentes al inicio del protocolo (mes 0) ($p = 0,81$). Cualitativamente, dos pacientes que presentaban serología positiva en el mes 12 negativizaron en el mes 18 (Tabla R.4.9. y Figura R.4.15.).

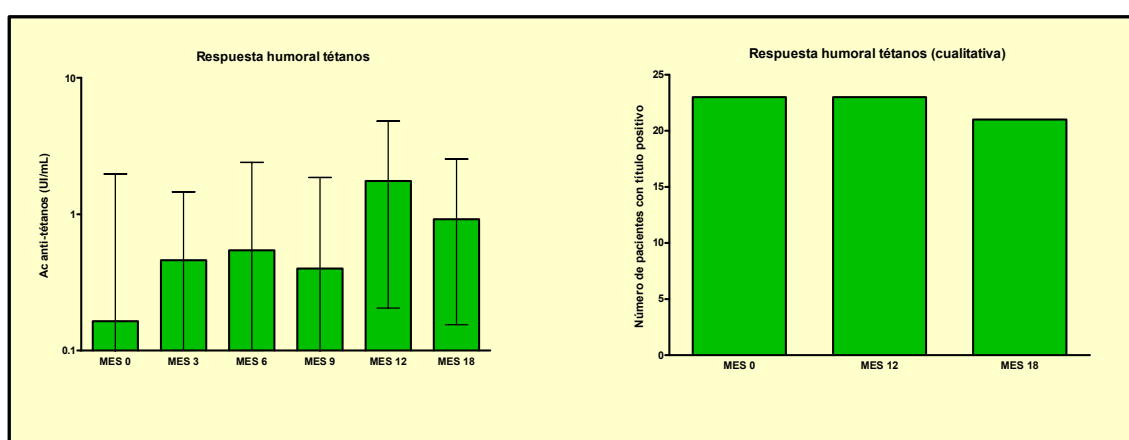


Figura R.4.15. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a tétanos durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (Ac: Anticuerpos)

4.10.2. Respuesta celular

Se produjo un aumento de la respuesta celular a tétanos en el periodo sin TARGA, tanto por ELISPOT como por AMPLISPOT, y tanto cuantitativo como cualitativo. Dicho aumento, sin embargo, sólo fue significativo para las respuestas medidas por AMPLISPOT ($p = 0,005$ para la cuantitativa 12-18 y $p = 0,039$ para la cualitativa 12-15). También se halló un aumento global en la respuesta celular desde el inicio del protocolo, siendo significativamente superiores en el mes 18 que en el mes 0 de forma cuantitativa, tanto por ELISPOT ($p = 0,001$), como por AMPLISPOT ($p = 0,009$) (Tabla R.4.9. y Figura R.4.16.).

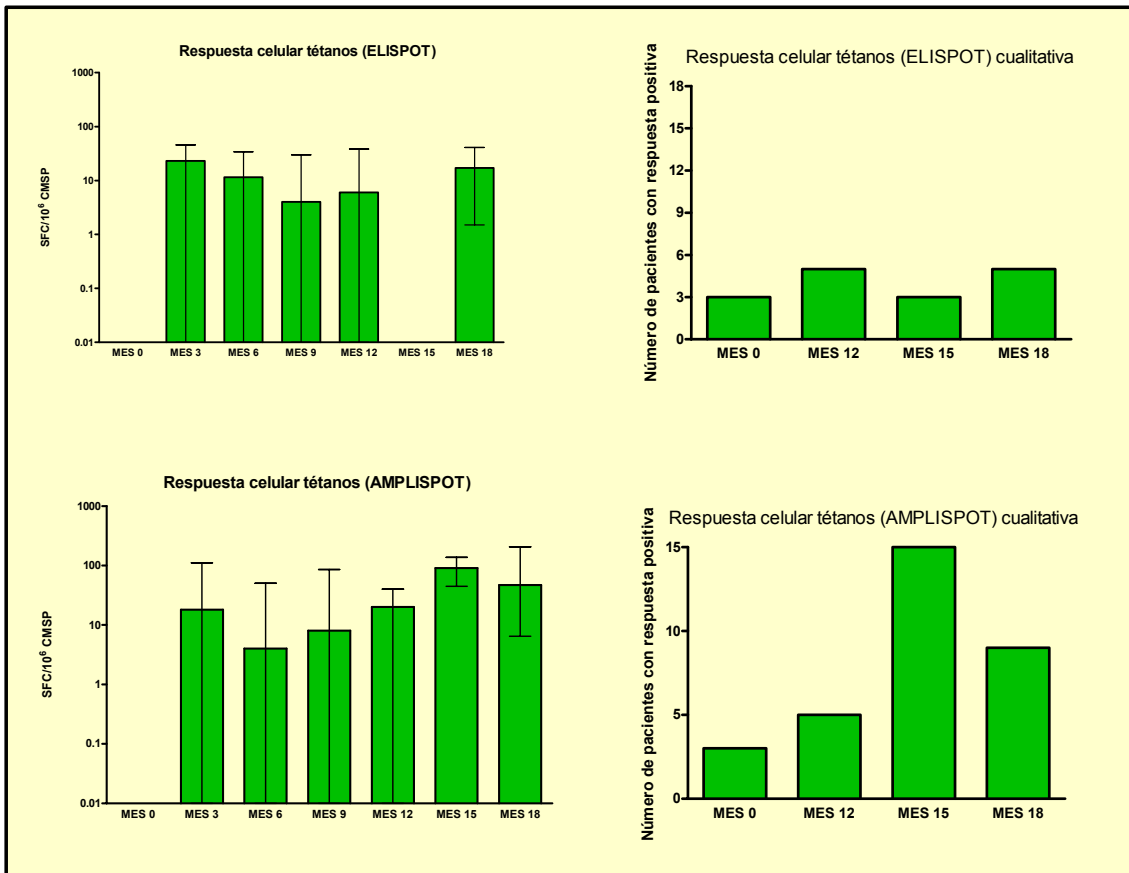


Figura R.4.16. Evolución de la respuesta celular cuantitativa y cualitativa a tétanos durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Tabla R.4.9. Respuestas inmune humoral y celular a tétanos, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción, en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo (SFC: Células formadoras de spots; CMSP: células mononucleares de sangre periférica)

Respuesta inmune a tétanos	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 15	P (12-15)	Mes 18	P (15-18)	P (12-18)
Humoral cuantitativa (U/ml)	0,16 (0,03-1,9)	1,76 (0,2-4,72)	0,006	-	-	0,92 (0,15-2,53)	-	<0,001
Humoral cualitativa	23 (88,5)	23 (88,5)	1	-	-	21 (80,8)	-	0,5
Celular (ELISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-10)	6 (0-42,5)	0,06	0 (0-24,5)	0,75	17 (1,5-41)	0,87	0,97
Celular (AMPLISPOT) cuantitativa (SFC/10 ⁶ CMSP)	0 (0-19)	20 (0-40)	0,38	91 (42,5-139,5)	0,004	47 (9,75-201,5)	0,35	0,005
Celular (ELISPOT) cualitativa	3 (11,5)	5 (19,2)	1	3 (11,5)	1	5 (19,2)	1	1
Celular (AMPLISPOT) cualitativa	3 (11,5)	5 (19,2)	0,37	15 (57,7)	0,039	9 (34,6)	0,22	0,25

4.11. RESPUESTA A DIFTERIA

4.11.1. Respuesta humoral

Tras la interrupción del TARGA se produjo un descenso en el título de anticuerpos frente a difteria, pero que no alcanzó la significación estadística ($p = 0,97$). Asimismo, 4 de los pacientes positivos para difteria en el mes 13 presentaron una serología cualitativamente negativa en el mes 18 (Tabla R.4.10. y Figura R.4.17.).

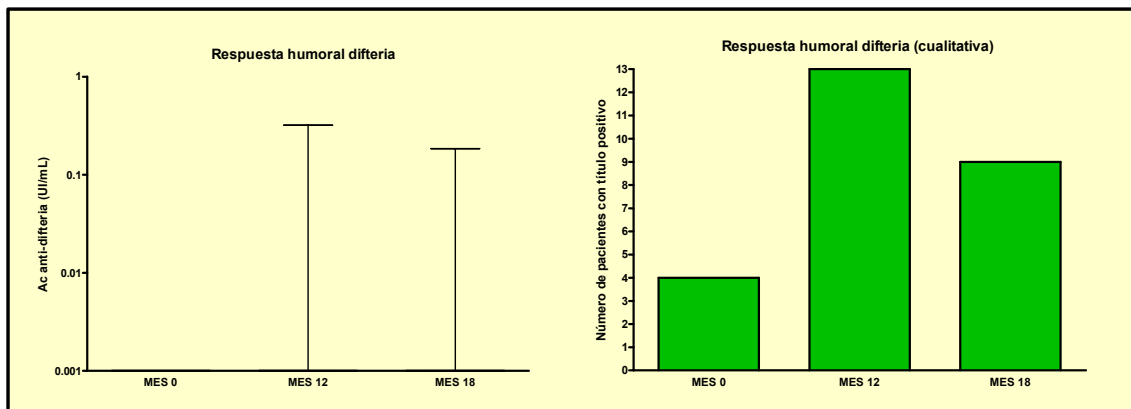


Figura R.4.17. Evolución de la respuesta humoral cuantitativa y cualitativa a difteria durante los periodos de tratamiento (meses 0-12) y parada (meses 12-18) en el global de la cohorte. Se exponen la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para la respuesta cuantitativa y el número de pacientes positivos para la cualitativa (Ac: Anticuerpos).

Tabla R.4.10. Respuestas inmune humoral y celular a difteria, tanto cuantitativa como cualitativa, durante el tratamiento y tras su interrupción en el global de la cohorte. Para los valores cuantitativos se expone la mediana y el rango intercuartílico. Para los valores cualitativos se exponen el número de pacientes positivos y el porcentaje que suponen respecto a su grupo

Respuesta inmune a difteria	Mes 0	Mes 12	P (0-12)	Mes 18	P (12-18)
Humoral cuantitativa (UI/mL)	0,01 (0,01-0,01)	0,01 (0,01-0,31)	0,002	0,01 (0,01-0,18)	0,97
Humoral cualitativa	4 (15,38)	13 (50)	0,004	9 (34,6)	0,29

4.12. RESUMEN DEL SUBESTUDIO C (APARTADO 4): ESTUDIO DE LA RESPUESTA ADQUIRIDA A ANTÍGENOS VACUNALES TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)

Se analizó la evolución de las respuestas frente a los antígenos vacunales evaluados tras la interrupción del TARGA.

Las respuestas humorales cuantitativas mostraron en todos los casos en los que se pudo valorar (rubéola, neumococo, tétanos y difteria), excepto para el VHB y VHA, una pérdida de los títulos de anticuerpos en los 6 meses tras la interrupción, llegando incluso en algunos casos como en la rubéola o el neumococo a tener niveles inferiores a los presentes al inicio del estudio (mes 0). Desde el punto de vista cualitativo, también pudo observarse una disminución en el número de pacientes seropositivos, es decir seronegativizaciones o seroreversiones: 1 caso para VVZ, 3 casos para parotiditis, 2 casos para neumococo, 2 casos para tétanos y 4 casos para difteria, todos pacientes diferentes excepto en el caso de las serologías para tétanos y difteria, que dos de los pacientes negativizaron para ambos antígenos. No se produjeron seroreversiones sin embargo en las respuestas cualitativas frente a rubéola, sarampión, VHA o VHB.

Contrariamente, las respuestas celulares presentaron una tendencia a aumentar para todos los antígenos tras la interrupción, excepto en el caso del VHB.

DISCUSIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Se presentan en esta tesis los resultados de un estudio que analiza los efectos, tanto positivos como potencialmente negativos, de un calendario vacunal sobre diferentes parámetros virológicos e inmunológicos en pacientes adultos infectados por el VIH y correctamente controlados con TARGA, y su potencial utilidad como terapia inmunomediada para facilitar el control de la infección tras suspender el TARGA.

Aunque en la literatura reciente se ha explorado el efecto de vacunaciones concretas sobre pacientes con infección por el VIH en múltiples ocasiones, los objetivos de este estudio van más allá, pues no se evalúa el efecto de una vacunación, sino de un calendario vacunal. Y no sólo se explora el efecto puntual y particular de la administración de la vacuna, sino la evolución global durante un periodo de tratamiento y las potenciales consecuencias beneficiosas o no tras su retirada.

Los pacientes con infección por VIH, aunque se encuentren en buena situación inmunológica, puede presentar determinadas infecciones con mayor frecuencia y/o gravedad (215). Por otro lado, los mismos factores de riesgo que los llevaron a adquirir la infección por el VIH facilitan su exposición a otros patógenos, como VHA y VHB (252). Por estos motivos se recomienda que estos pacientes reciban una serie de vacunaciones. Sin embargo, las vacunaciones en los pacientes con infección por el VIH plantean una serie de interrogantes. Por un lado, la respuesta vacunal en los pacientes con infección por el VIH está alterada, tanto por disfunción en la respuesta humoral como celular (253-257). Por otro lado, diferentes trabajos han planteado que la vacunación podría alterar el curso de la propia infección por el VIH, con la inducción de elevaciones en la CV que podrían incluso asociarse a la aparición de resistencias al TARGA y comprometer por tanto la evolución a largo plazo de la infección, y disminución en el recuento de linfocitos T CD4⁺ (283-285). Hasta la fecha, los resultados que se han publicado ofrecen informaciones contradictorias al respecto (275;290;292;295;296;299;300;300;302-304;362;368;771).

Además, no suele ser infrecuente que un mismo paciente necesite recibir más de una vacuna (VHA y VHB, sarampión-rubéola-parotiditis, tétanos...). Se ha demostrado que resulta eficiente combinar la administración de diferentes vacunas con la intención de no perder la oportunidad de vacunar y reducir el número de visitas e inyecciones (219).

Es posible también que, cada vez con mayor frecuencia, se recomienden más vacunaciones a los pacientes adultos con infección por el VIH. Aunque los niños son los principales protagonistas de las intervenciones vacunales, la población adulta puede requerir vacunarse por diferentes motivos y por tanto el paciente con infección por el VIH puede tener indicación de recibir vacunaciones en la edad adulta por múltiples causas:

- Por la propia infección (216-219).
- Por compartir factores de riesgo de transmisión de determinados agentes como el VHA o el VHB.
- Por edad avanzada, una indicación que será cada vez más frecuente.
- Por circunstancias epidemiológicas concretas (viajes, laborales).
- Por necesitar dosis de recuerdo. De hecho, la inmunidad vacunal es de menor duración, perdiéndose más rápidamente que en individuos sanos (270).

Resulta por todo ello imprescindible intentar valorar los riesgos y beneficios de las vacunaciones en los pacientes adultos con infección por el VIH.

El calendario vacunal que se utilizó incluía las vacunas actuales que con mayor frecuencia se indican en los pacientes adultos y que, o bien ya están indicadas, o probablemente lo estarán en los pacientes con infección por el VIH (ver **Tabla I.2.2.** de la **Introducción**). La única vacuna que actualmente todavía existen dudas de su inclusión en las guías para pacientes adultos infectados por el VIH es la de la varicela, pero, gracias a la seguridad demostrada en recientes trabajos en niños infectados por el VIH (380;381) y el buen control de la infección por VIH con TARGA, es probable que a medio plazo también se incluya en los calendarios habituales, bien la presentación actual para la prevención de la varicela o bien las vacunas que actualmente están en investigación para la prevención de la reactivación del VVZ (385).

Por otro lado, se planteó que el calendario vacunal pudiera servir como terapia inmunomediada. Como se ha comentado, se ha descrito que las vacunaciones se asociaban a la presencia de elevaciones transitorias de la CV (“blips” o EVI) (277;286;287) secundarias a la activación linfocitaria (271-273). Se ha descrito también que la presencia de EVI se asocia a un aumento de las respuestas específicas frente al VIH, tanto CD4⁺ como CD8⁺, lo que eventualmente podría asociarse a un mejor control de la replicación viral en ausencia de TARGA (538;753-755). Si las vacunaciones son capaces de inducir EVI, esta sería una manera “natural” de potenciar por tanto la respuesta anti-VIH.

Por último, las vacunaciones permiten explorar tanto el brazo aferente como el eferente del sistema inmunitario, y las interacciones que pudieran tener con el TARGA y con la interrupción del tratamiento son un buen modelo para el estudio patogénico del VIH. Además, dentro de la inmunofisiopatología de esta infección tiene un especial protagonismo el timo y la IL-7. Poco o nada se sabe de los efectos de las vacunaciones y de la interrupción del TARGA sobre estos aspectos, y su mejor conocimiento podría ayudar a entender mejor la patogenia del VIH y elaborar estrategias para el tratamiento de estos pacientes.

1.2. VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Como todos los estudios, éste presenta una serie de ventajas y de limitaciones que han de ser tenidas en cuenta para la interpretación de los resultados.

1.2.1. Ventajas

- **Diseño.** La principal ventaja de este estudio es su diseño: prospectivo, doble ciego y controlado con placebo. Esto permite dar consistencia a las conclusiones que se extraen de la comparación entre los GV y GP.
- **Unicéntrico.** Además es un estudio unicéntrico, por lo que las intervenciones y el seguimiento se han realizado de forma uniforme a lo largo del tiempo y con todos los

pacientes, y han sido desarrolladas por los mismos profesionales, lo que le confiere una mayor homogeneidad a los resultados.

- Análisis exhaustivo. En cada extracción se hicieron múltiples análisis para valorar diferentes aspectos del sistema inmune y su interacción con el VIH. Para ello fue necesario realizar una extracción de 100 mL de sangre a cada paciente en cada una de las extracciones.

- El objeto del estudio. El trabajo realizado es novedoso en cuanto a los temas que explora. Por un lado, el efecto de un “calendario vacunal” globalmente sobre el sistema inmune y su interacción con el VIH, a diferencia de trabajos previos en los que se valoraba el efecto de una o dos vacunas, pero siempre de forma independiente. En segundo lugar, valorar los efectos de este calendario, no sólo durante el tratamiento, sino tras su retirada, y explorar si esta estrategia puede ser válida como inmunoterapia. Finalmente, aprovechar el diseño del estudio para realizar tres subestudios: la influencia de presentar CV detectables sobre el sistema inmune durante el tratamiento y tras su retirada, independientemente de las vacunaciones; la influencia de retirar el tratamiento sobre la función tímica; y la influencia de retirar el tratamiento sobre la respuesta inmune a los antígenos vacunales.

- El perfil de los pacientes incluidos. Se plantearon unos criterios de inclusión estrictos desde el punto de vista inmunológico y virológico para limitar así la heterogeneidad de los pacientes y poder, paradójicamente, generalizar más las conclusiones a un grupo concreto y numeroso, si no mayoritario dependiendo del medio, de pacientes infectados por el VIH, el de los pacientes “bien controlados”.

- La ausencia de pérdidas de seguimiento y el buen cumplimiento de los pacientes. Sólo existió una salida del estudio durante el periodo de tratamiento, la de un paciente por *exitus* por motivos ajenos al protocolo, que se produjo en el mes 9. Por otro lado, sólo un paciente quiso reiniciar el TARGA antes de lo previsto en el protocolo, en el mes 15 a pesar de tener más de $350 \text{ CD4}^+/\text{mm}^3$. Todos los pacientes del GP o GV recibieron todas las vacunas o placebo respectivamente.

1.2.2. Limitaciones

- El tamaño muestral. Calculado para demostrar la influencia o no de una vacuna sobre la CV teniendo en cuenta los datos previamente publicados (285), 26 pacientes es un número relativamente pequeño que limita en algunos casos las posibles conclusiones que se derivan de nuestro trabajo.

- La no estratificación. Teniendo en cuenta que el tamaño muestral era limitado, no se incluyeron condiciones de estratificación en la randomización. De este modo no se pudo evitar que tras la randomización el GV tuviera pacientes de menor edad que el GP. Esto influyó probablemente en que algunos de los parámetros inmunológicos basales fuesen también diferentes, fundamentalmente la función tímica, más abundante en los individuos jóvenes (574). Es difícil precisar en qué medida ha podido influir en la respuesta posterior a las vacunas, sabiendo que la edad influye en la respuesta vacunal, y en la evolución de los parámetros tímicos (574). En cualquier caso, al ser un estudio longitudinal prospectivo permitió valorar los cambios en el tiempo desde el origen.

- El perfil de los pacientes incluidos. El haber incluido únicamente pacientes bien controlados con TARGA, con linfocitos T CD4⁺ por encima de 500 células/mm³, nadir de CD4⁺ >300 linfocitos T CD4⁺/mm³ y CV < 200 copias/mL, hace que los resultados sólo puedan limitarse a este tipo de pacientes. Se ha de considerar que se ha demostrado que el número de linfocitos T CD4⁺, el nadir o la CV pueden influir en la respuesta vacunal (82;262-269).

- La no consideración de la historia vacunal previa. Los antecedentes vacunales de los pacientes no condicionaron su inclusión en el estudio ni en un grupo en particular. Lógicamente, el uso de vacunas frente a infecciones con alta seroprevalencia en nuestro medio (sarampión, parotiditis, rubéola,..) hace que, haber intentado seleccionar sólo pacientes negativos para todas las vacunas administradas, hubiera resultado muy difícil. Sin embargo, cabe valorar que el haber sido expuesto o no a un determinado antígeno con anterioridad influye en la respuesta inmunitaria que la reexposición genera y que, por tanto, podría influir en las consecuencias observadas en las subpoblaciones celulares o la replicación viral. Podríamos pensar que los pacientes “naïve” para un estímulo vacunal concreto se activarían más al

recibirlo y serían los que más podrían aumentar la replicación viral. Para limitar este problema, se recogieron los antecedentes de vacunación de cada paciente. Pese a ello, la mayoría de los pacientes no recordaban con exactitud si se habían vacunado con anterioridad y qué tipo de vacuna habían recibido, ni tampoco tenía un carné vacunal de registro. Ésta es una situación que se da con frecuencia en la práctica clínica diaria, y a menudo, cuando se vacuna, se hace sin saber exactamente si el paciente había recibido previamente una vacuna en concreto. La determinación de la respuesta inmune basal a los antígenos vacunales es de ayuda para valorar este aspecto, pero lógicamente puede tener sus limitaciones.

- La realización de subestudios. Como se comentó con anterioridad, el diseño del estudio se realizó en base a los resultados previamente publicados en la literatura científica para comparar un grupo que recibía una intervención vacunal y un grupo placebo. Aprovechando este diseño y, teniendo en cuenta el minucioso control al que fueron sometidos estos pacientes y la interrupción reglada que realizaron con posterioridad, se realizaron otros análisis que, aunque estaban previstos realizar desde un inicio, el diseño del estudio no fue dirigido a encontrar diferencias significativas en esos aspectos. Esto podría afectar a las conclusiones que se extraen de dichos subestudios.

- La falta de alguna determinación. A pesar del buen cumplimiento de los pacientes a la hora de recibir las intervenciones, durante el periodo vacunal se deberían haber obtenido 338 determinaciones de CV pero sólo se obtuvieron 314 por diferentes motivos. Aunque las determinaciones ausentes se distribuyeron homogéneamente entre los grupos y los meses, quizás podrían haber afectado los resultados del estudio.

- El tiempo vacunación-extracción. Las extracciones para valorar los efectos de la vacunación o el placebo sobre las diferentes variables se realizaron 1 mes tras la intervención. En general, este tiempo debería ser suficiente para observar cambios inducidos por la exposición antigénica, pero cabe la posibilidad que se produjeran cambios más precoces (1-2 semanas) que no fuesen detectados.

- La combinación de vacunas. Aunque el utilizar un calendario con varias vacunas, que se administraron en diversas ocasiones conjuntamente, nos permite valorar una

situación cercana a la realidad y evaluar el efecto de las combinaciones, por otro lado puede dificultar la interpretación del efecto que puede tener cada vacunación por separado.

2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE UN CALENDARIO VACUNAL SOBRE LA CARGA VIRAL Y EL SISTEMA INMUNITARIO EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH CON CARGA DURANTE EL TRATAMIENTO Y TRAS SU INTERRUPCIÓN

2.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES

En general la randomización equilibró las características basales de los pacientes desde el punto de vista epidemiológico, excepto en tres aspectos que, aunque no llegaron a ser significativamente diferentes entre los GV y GP, presentaron tendencias que cabe comentar (**Tabla R.1.1.**).

Por un lado, y como aspecto más importante a considerar, los pacientes en el GV fueron más jóvenes que en el GP ($36,53 \pm 8,01$ años vs $43,09 \pm 8,94$ años; $p = 0,06$). Esta diferencia es importante, pues aunque el estudio es longitudinal prospectivo y se evalúan los cambios a partir del momento basal, la edad se ha demostrado que influye en diversos aspectos del sistema inmune y, de forma importante para nuestro estudio, en la respuesta a vacunas y en los parámetros de función tímica, de forma que los pacientes más jóvenes responden mejor a las vacunas (772) y tienen más elevados los parámetros de función tímica (574).

Por otro lado, los 3 pacientes que habían adquirido el VIH por vía parenteral (ex-ADVP) incluidos en el estudio fueron randomizados al GP ($p = 0,22$, test exacto de Fisher). En principio, aunque es discutido si la adquisición del VIH por vía sexual o parenteral puede influir en la evolución posterior, no se conoce influencia de esta variable en la evolución de la CV, la respuesta a vacunas o la función tímica. Además, en la actualidad ninguno de estos pacientes consumía de forma activa, lo que elimina las potenciales influencias de la presentación parenteral de nuevos antígenos durante el estudio.

Finalmente, y en relación con el punto anterior, 4 pacientes del estudio tenían serología positiva para el VHC, y los 4 estaban en el grupo de placebo ($p = 0,096$, test exacto de Fisher). Aunque existe controversia sobre la influencia de la infección por el VHC en la evolución de la infección por el VIH y viceversa (773-775), no se conocen hasta la fecha claras influencias de la infección por el VHC en la replicación viral, la función tímica o en la respuesta a vacunas.

El resto de variables generales relacionadas con la infección por el VIH no presentaron diferencia entre grupos (**Tabla R.1.1., Figuras R.1.1.-R.1.4.**), incluyendo el tiempo de evolución de la infección, el tiempo de TARGA y, sobre todo, el número previo de pautas y el uso de mono o biterapias con anterioridad. La ausencia de diferencias en este punto es importante, pues se ha descrito que recibir o haber recibido tratamientos antirretrovirales poco potentes, fundamentalmente en forma de mono o biterapia, se asocia a una mayor incidencia de CV detectables y podría falsear los resultados (475;476;479;515;532-534), aunque no se ha demostrado que haber recibido monoterapia con AZT, o tener mutaciones de resistencias a AZT o diferentes grados de resistencia se asocien a más EVI (370;475).

Tampoco existían diferencias en la CV más alta conocida previa a la inclusión en el estudio. Diversos trabajos han descrito que el nivel de la CV al inicio del primer TARGA estaría directamente relacionada con la frecuencia de los EVI, sobre todo cuando esa CV es la de equilibrio (*set point*) (475;512;532;770), y por ello es importante que no existiesen diferencias en este aspecto. Sin embargo, se da una circunstancia que, como en todos los estudios, limita la interpretación previa de las variables virológicas: dado que históricamente la aparición de fármacos antirretrovirales antecedió a la disponibilidad de medida de la CV plasmática de forma rutinaria, habría pacientes que iniciaron el tratamiento antes de cuantificar su ARN plasmático viral. Ello hace que, en pacientes con infección por el VIH de larga evolución, se desconozca su CV de equilibrio antes de cualquier tratamiento antirretroviral.

Respecto a las variables inmunológicas, los pacientes incluidos tenían un nadir de linfocitos T CD4⁺ elevado (media de $450 \pm 111,65$ linfocitos T CD4⁺/mm³ o un $24,20 \pm 7,27\%$ del total de los linfocitos), sin diferencias entre grupos. Teniendo en cuenta que se ha

demostrado que los pacientes con menor nadir responden peor a los antígenos vacunales (266), y que también se ha relacionado con una mayor incidencia de EVI (512;534;770), es importante que no existiesen diferencias.

En general los grupos GP y GV no difirieron en los diferentes parámetros del sistema inmunológico evaluados: subpoblaciones linfocitarias, subpoblaciones linfocitarias en proliferación, respuestas proliferativas frente a diferentes antígenos, incluyendo proteínas del VIH, respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH, y factores del sistema IL-7/IL-7R (**Tablas R.1.2.-R.1.7.**).

Respecto a la IL-7, los niveles séricos que se hallaron basalmente ($10,51 \pm 4,33$ pg/mL) fueron similares a los descritos previamente en la literatura, superiores a los niveles que habitualmente se pueden encontrar en pacientes sanos (700). No se encontraron diferencias en estos niveles en función del sexo ni correlación con la edad, contrariamente a lo que se había descrito en algún trabajo descriptivo previo (584;776). El limitado número de mujeres en el estudio (8) y el relativo estrecho rango de edad de los pacientes incluidos (24,74-58,24 años), sin pacientes en edades extremas de la vida, pueden explicar esta ausencia de diferencias.

Donde sí se hallaron diferencias, como se ha comentado con anterioridad, fue en los parámetros de función tímica. Todos, con mayor o menor significación, fueron mayores en el GV: volumen e índice tímico, copias de *TRECs*/μL, células CD8⁺ *naïve*, y, sobre todo, linfocitos T CD4⁺ *naïve*, y copias de *TRECs*/10⁶ CMSP. El motivo principal de estas diferencias reside, probablemente, en las diferencias de edad entre los grupos. Es conocido que con la edad disminuye la función tímica (214;574), y además, cuando se analizaron las correlaciones entre los parámetros tímicos y la edad en nuestra cohorte, se hallaron que fueron significativas para la mayoría de ellos (**Tabla R.1.6. y Figuras R.1.6-R.1.7.**).

Respecto a la exposición previa a los antígenos vacunales, no se hallaron diferencias entre los grupos cuando se valoró en función de las serologías en el mes 0 (**Tablas R.1.8.-R.1.18.**). Es importante aquí destacar varios aspectos.

Por un lado, la historia de exposiciones previas a determinados antígenos vacunales no formaba parte de los criterios de inclusión ni fue un factor de estratificación, a pesar de que el haber sido expuesto o no a un determinado antígeno con anterioridad influye en la respuesta inmunitaria que la reexposición genera. Para evaluar dicho aspecto se recogieron los antecedentes de vacunación de cada paciente, pero la mayoría no recordaban con exactitud si se habían vacunado con anterioridad y qué tipo de vacuna habían recibido, ni tampoco tenían un carné vacunal de registro. Esta situación, de hecho, es la que existe habitualmente en los centros de vacunación y es la más cercana a las circunstancias reales. Incluso, y según las recomendaciones actuales, sólo se deberían aceptar los antecedentes vacunales que se reflejan en registros escritos y no deberían ser válidos los derivados de la experiencia relatada por el propio paciente, debiendo considerar al mismo susceptible en caso de no existir registros y debiendo vacunarlo si es recomendable (219). Es probable entonces que, a menudo, vacunemos pacientes que ya habían estado en contacto, bien por vía natural o incluso con una vacunación previa, con el agente frente al que queremos proteger. Por tanto, el haber intentado seleccionar sólo pacientes negativos para todas las vacunas administradas hubiera resultado poco “natural”, además de difícil para aquellas infecciones con alta seroprevalencia en nuestro medio (sarampión, parotiditis, rubéola,...).

Por otro lado, las proporciones de pacientes con serologías positivas frente a los diferentes agentes resultaron muy representativas de la situación en nuestro medio en general y en la población con infección por el VIH en particular (**Figura I.2.2.**). Así se halló una alta proporción de pacientes positivos para sarampión, rubéola, parotiditis, VVZ y tétanos (>90% de pacientes positivos), siendo más baja para VHA y VHB (73 y 42% de pacientes positivos, respectivamente) y muy baja para neumococo y difteria (sólo 23 y 15% de pacientes positivos, respectivamente). Cabe destacar la seroprevalencia hallada en el caso de los virus hepatotrofos VHA y VHB. La primera porque muestra el patrón de descenso progresivo de la seroprevalencia en nuestro medio, con niveles similares a los de otros países ricos (311). La del VHB porque, siendo una vacuna recomendada en todos los pacientes infectados por el VIH,

presenta una baja tasa de seroprevalencia y probablemente de vacunaciones previas, tal como se ha descrito en la literatura (348).

Las proporciones de pacientes positivos en la respuesta celular fueron mucho menores que las humorales para todos los agentes, y las correlaciones entre las respuestas humoral y celular fueron en general bajas (cuantitativas y cualitativas). Aunque podría deberse a cuestiones técnicas, una posible explicación de estas diferencias sería que la exposición, cuando la hubo y provocó la respuesta humoral, fue hacía tiempo, de modo que las células memoria CD8⁺ para los determinados agentes se encontrarían en un número limitado y no se detectarían con los ensayos utilizados.

2.2. CAMBIOS DURANTE EL PERIODO VACUNAL

2.2.1. Efectos secundarios asociados al calendario vacunal

En primer lugar cabe destacar que la aplicación a los pacientes del calendario vacunal en general, y las vacunas en particular, fue segura. A pesar de que los 13 pacientes vacunados recibieron un total de 12 vacunaciones (con 10 antígenos vacunales diferentes y en 7 preparados vacunales distintos), muchas de ellas de antígenos a los cuales ya habían sido expuestos, ninguna de las vacunaciones (o placebo) se acompañó de efectos secundarios clínicos notificables locales o sistémicos.

Un temor que siempre ha existido en las vacunaciones en los pacientes con infección por el VIH es que, debido a la inmunosupresión, podrían desarrollar el cuadro infeccioso que se pretende prevenir inducido por la misma vacuna. Sin embargo, para ello se deberían dar dos circunstancias. Por un lado, que la vacuna sea de microorganismos vivos, sean virus o bacterias, que, a pesar de estar atenuadas, si se encuentran con un sistema inmunitario lo suficientemente debilitado podrían ser realmente patógenas. Y por otro lado, que el grado de inmunosupresión sea lo suficientemente importante como para ser “superado” por el germen atenuado. En este sentido, existe experiencia documentada sobre la potencial morbilidad de la vacuna del sarampión o varicela en pacientes muy inmunodeprimidos por el VIH (382;389;399;400). Sin embargo, estas vacunas se consideran en general seguras fuera de los casos de inmunosupresión grave (380;394;396;401;402;777). En nuestro estudio, en el que todos los pacientes estaban bajo TARGA, con >500 linfocitos T $CD4^+/\text{mm}^3$ y con un nadir >300 linfocitos T $CD4^+/\text{mm}^3$, no se produjo ningún efecto secundario atribuible a inmunosupresión con ningún tipo de vacuna, tampoco con la de la varicela.

Otra circunstancia que podría preocupar en la vacunación de estos pacientes es el hecho de revacunar frente a un agente al que ya existiese protección, natural o por vacunación previa. Se ha descrito que algunas vacunas como la de tétanos-difteria pueden producir tasas aumentadas de reacción local o sistémica en determinados receptores, cuando se administran con demasiada frecuencia o en pacientes que ya habían sido expuestos, como consecuencia de la probable formación de complejos antígeno-anticuerpo (778). En nuestro estudio, a pesar que

muchas de las vacunas administradas se hicieron en pacientes con serología positiva, ninguna de las vacunaciones se asoció a estos efectos secundarios. Este hecho es todavía más importante si tenemos en cuenta que, como se comentó anteriormente, los registros vacunales personales son inadecuados por depender del paciente, y que la determinación serológica previa a una vacunación conlleva costes y retrasos en la administración de la vacuna. Resulta interesante por lo tanto observar que, administrar una vacuna a un paciente del que desconocemos que su serología es positiva para ella no supone un riesgo en este sentido.

Finalmente, es importante ver que no sólo cada vacuna en particular fue segura en términos de efectos secundarios, sino como calendario global. En los últimos tiempos, cada vez se intenta más la administración simultánea de las vacunas que un paciente necesita, pues permite aumentar las posibilidades de realizar una inmunización completa y reducir el número de intervenciones. Y se ha demostrado que esta práctica tiene tasas de seroconversión y efectos secundarios similares a los observados cuando se usan de forma separada (779). No obstante, se ha de seguir la recomendación de que, en el caso de tener que administrar dos vacunas vivas parenterales, no se haga con menos de 30 días de diferencia, pues podría interferirse en la respuesta inmune generada por las vacunas (219).

Otro aspecto importante dentro de las generalidades del estudio es el hecho de que un paciente del GV presentase una infección aguda por el virus de la hepatitis A en el mes 2, antes de recibir la vacuna. Esta situación refleja dos circunstancias. Por un lado, que los pacientes con infección por el VIH, si comparten factores de riesgo (como fue el caso) tienen mayor probabilidad de presentar infección por VHA y por tanto deberían vacunarse. En segundo lugar que, fuera de estudios controlados, cuando se piensa en vacunar a un paciente, la vacunación se ha de realizar lo antes posible para evitar el contagio.

2.2.2. Efectos del calendario vacunal sobre la carga viral

Numerosos trabajos de la literatura científica han descrito que las vacunaciones en los pacientes con infección por el VIH podrían producir aumentos transitorios de la CV. Se ha

demostrado *in vitro* que la infección de los linfocitos T CD4⁺ por el VIH y la replicación viral son más eficientes cuando las células están activadas (271-273). Así, frente a un estímulo antigénico natural o vacunal podría existir una activación y proliferación clonal de linfocitos T CD4⁺, sobre todo memoria CD45RO⁺ (274), tanto antígeno específicos como inespecíficos por la liberación de citocinas (275;276). Estos linfocitos podrían estar, o bien quiescentemente infectados por el VIH, o bien convertirse en dianas para infectarse *de novo*, pudiendo potenciar la replicación viral (277). Diversos estudios han hallado aumentos de la CV de hasta 586 veces (283) tras la vacunación, con un aumento en el número de células infectadas (284) y aparición de resistencias al tratamiento antirretroviral (285).

Sin embargo, existe controversia al respecto de este potencial efecto perjudicial que puede tener la vacunación sobre la infección por el VIH, y las distintas publicaciones ofrecen resultados contradictorios (**Tabla I.2.1.**). Posibles explicaciones de la discordancia en las observaciones incluyen, sobre todo, la falta de estratificación por CV, recuento de linfocitos T CD4⁺ o TARGA, y variaciones en los diseños de los estudios en cuanto a tamaño muestral (siendo generalmente pequeños) o períodos de observación, a aparición de enfermedades agudas postvacunación, diferencias en los antígenos, ...

Los resultados de nuestro estudio muestran que, ni el calendario vacunal administrado en general y ninguna vacuna en particular, se asociaron a una mayor frecuencia de CV detectables ≥ 200 copias/mL ó ≥ 20 copias/mL ($p > 0,05$ entre grupos para ambas técnicas). El análisis no mostró diferencias ni cuando se realizó en función de las determinaciones ni en función de los pacientes. Si bien es cierto que la muestra en cuanto a número de pacientes es limitada (13 pacientes recibieron vacuna y 13 recibieron placebo), el número de estímulos vacunales recibidos por el GV fue de 195 en total, a pesar de lo cual no se detectó una mayor incidencia de CV detectables con el GP, que no recibió ningún estímulo vacunal.

Cuando se utilizó el ensayo con límite inferior de 200 copias/mL, se observó una incidencia global de 0,07 eventos/determinación, es decir que el 7% de las determinaciones (9,1% en GP y 5% en GV, $p = 0,22$) fueron detectables (**Tabla R.1.18.**), cifra acorde con las publicadas en la literatura para los EVI, por otro lado muy variables

(370;475;477;478;512;515;531;532;534;551). Respecto a los pacientes que presentaron más de una CV detectable ≥ 200 copias/mL, fueron 2 en el GP y 1 en el GV, es decir, un 15,4 y un 7,69%, también de acuerdo con lo previamente publicado (475;478;514;532).

Cuando se repitió el análisis de las CV con un ensayo cuyo límite inferior de detección estaba por debajo de 20 copias/mL, se produjo consecuentemente una detección de CV entre 20 y 200 copias/mL que anteriormente eran consideradas indetectables. Esto ocurrió concretamente en 28 determinaciones, 4 de las cuales resultaron superiores a 200 copias/mL, y supuso un aumento en la incidencia de CV detectables hasta el 15,6% en el global de la cohorte, también acorde con los resultados previamente publicados de incidencia de EVI (370;475;477;478;512;515;531;532;534;551).

Cabe decir que no todos los episodios de CV detectable que presentaron los pacientes durante el periodo de tratamiento fueron EVI, o al menos, no creemos que debieran considerarse así si somos fieles a la definición planteada en la **Introducción (apartado 3.4)**. Al analizar individualmente las CV detectables, globalmente podríamos hablar de que en el periodo de tratamiento se presentaron cuatro patrones diferentes de CV detectables (**Figuras R.1.9. y R.1.11.**):

- Viremia persistente de bajo nivel (VPBN): El paciente con código de randomización número 4 (GP) presentó CV detectables entre 200 y 1000 copias/mL durante 6 meses consecutivos, requiriendo un cambio de TARGA para volver a la indetectabilidad. Por tanto las CV eran “persistentemente” positivas y necesitó cambiar el tratamiento para hacerse indetectable.
- Viremia por ausencia de TARGA: El paciente con código de randomización número 5 (GP) abandonó voluntariamente el tratamiento y presentó durante el tiempo que estuvo sin TARGA (3 meses) CV detectables, volviendo a la indetectabilidad tras reiniciarlo. No puede considerarse un EVI porque apareció en ausencia de TARGA.
- Viremia por (probablemente) falta de adherencia: El paciente con código de randomización número 8 (GV) presentó CV progresivamente crecientes y de alto

rango, probablemente en el contexto de una baja adherencia (adherencia referida del 75%), que volvió a la indetectabilidad tras aumentar el cumplimiento pero con una mutación M184V. En sentido estricto, el paciente partía de una CV indetectable (< 200 copias/mL) y volvió a la indetectabilidad (< 200 copias/mL) sin realizar cambios en el TARGA (se prescribió un cambio y la extracción de ese mismo día, no disponible hasta 15 días después de iniciar el nuevo tratamiento, mostró una CV nuevamente indetectable [< 200 copias/mL]), y por tanto podría considerarse EVI. Sin embargo, presenta dos características que la hacen diferente del resto de episodios que deberían considerarse EVI: llega a ser de muy alto nivel (hasta 51.200 copias/mL) y se asocia a la aparición de una mutación, la M184V. Además, por el ensayo con límite de detectabilidad de 20 copias/mL no había vuelto a la indetectabilidad sin cambio en el TARGA (CV 88 copias/mL).

- EVI (o “*blip*”): Finalmente, el resto de pacientes presentaron episodios detectables transitorios de CV de bajo nivel, sin un claro desencadenante, ni falta de adherencia.

Estos 4 patrones también se presentan en la práctica clínica habitual y es importante realizar el diagnóstico diferencial pues las implicaciones pueden ser importantes. La anamnesis permitirá descartar las CV detectables por ausencia de TARGA e incluso las debidas a la disminución de la adherencia, si bien éstas son menos claras. Presentar una adherencia baja al TARGA se sabe que se asocia con una menor capacidad para suprimir la CV y una peor evolución (504;540;780). Por ello se asumió durante mucho tiempo que la mayoría de los EVI eran el resultado de periodos de pobre adherencia a TARGA. Sin embargo, se sabe que existe un “sesgo de observación”: normalmente se prejuzga una CV detectable como un signo de pobre adherencia y se interroga más intensamente al respecto (476;515), mientras que es menos probable que se interroge a conciencia acerca de la adherencia a un paciente con CV indetectable, a pesar de que hay datos que sugieren que la mayoría de pacientes con CV indetectable pierden alguna dosis (504). Aunque los métodos de notificación de autoadherencia se han demostrado asociar a un buen control de la CV (541;542), en general la medición de la

adherencia por cualquier método es imperfecta (543;544). Pero en estudios en los que se ha estudiado con rigor tanto la adherencia como las concentraciones de los fármacos antirretrovirales (370;533;537) no se ha hallado asociación entre éstos y la presencia de EVI, excepto cuando las CV son de gran magnitud (más de 1000 copias), como en nuestro caso (533).

La evolución en las subsiguientes determinaciones nos permitirá diferenciar entre el EVI y la VPBN, pues aunque no hay una duración definida, si son “pocas” las determinaciones detectables y vuelve a la indetectabilidad espontáneamente hablaremos de EVI, mientras que si las determinaciones son persistentemente positivas hablaremos de VPBN.

Cuando se valoraron únicamente estos EVI, fundamentalmente con el ensayo con límite de detectabilidad de 20 copias/mL, tampoco se halló que se asociaran con la vacunación. La incidencia y las características de los EVI estuvieron acorde con lo descrito previamente en la literatura (370;478;478;512;514;515;532;533;536;537;554).

Tampoco se observó que ninguna vacuna en concreto pudiera estar más asociada a la presencia de CV detectables, pues en general éstas aparecieron tras cualquiera de las vacunas (o placebo) o sin ir precedida de ellas en el mes previo (para el análisis a 200 copias/mL, en el GV presentaron CV detectable un mes tras alguna vacunación en 3 ocasiones, mientras que las 5 restantes no iban precedidas de vacunación alguna).

Finalmente, aunque el tamaño muestral fue pequeño, no se halló una mayor frecuencia de CV detectables en aquellos pacientes que recibían una vacuna frente a la cual fuesen seronegativos. Éste aspecto es importante, pues se ha descrito que las elevaciones de CV tras una vacunación son más probables en aquellos pacientes con mayor respuesta inmune a la vacuna, y por tanto aquél que se puede beneficiar más de la vacunación (250;276;284;286-293).

Cabría la posibilidad que las vacunaciones hubieran provocado elevaciones de la CV y que no las hubiésemos detectado. Una posibilidad sería que estas elevaciones se hubiesen producido en el tejido linfático, y no hubiesen sido visibles en sangre periférica. También podrían haber existido elevaciones transitorias de CV de corta duración (inferior a un mes) que no se hubiesen detectado con las extracciones mensuales del estudio. De hecho se ha descrito que las elevaciones de CV secundarias a la vacunación tendrían una cronología concordante a la hipótesis de la activación celular, de forma que si las respuestas proliferativas óptimas a un antígeno vacunal como el de la gripe se detectan generalmente en los humanos sobre el 7^o-10^o día tras vacunación, el aumento en la CV se esperaría 2 ó 3 días después (224). Sin embargo a este respecto cabe hacer algunos comentarios. Por un lado, muchos trabajos hablan de que los EVI tienen duración de 20-30 días o más (512;514), y en este caso, de ser provocados por la vacunación, se hubiesen detectado. De hecho se detectaron episodios de CV detectable, pero no se asociaron con las vacunaciones o incluso fueron más frecuentes en el GP. Además, un trabajo reciente con extracciones cada 2-3 días no halló elevaciones de CV tras la vacunación para la gripe (370). Finalmente, si se hubiese producido una elevación de la CV tras la vacunación que no se hubiese detectado a los 30 días, su significado clínico sería, por lo menos, discutible, pues permite el retorno a la indetectabilidad y, al menos en nuestro caso, no se asoció a una peor evolución durante el periodo de tratamiento.

2.2.3. Efectos del calendario vacunal sobre el sistema inmune

Nuestro estudio mostró que las vacunaciones se asociaron a un descenso en los linfocitos T CD4⁺, y a un aumento en la activación y maduración linfocitaria, así como en las respuestas linfoproliferativas, mientras que no se observaron cambios en las respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH.

Un hallazgo de suma importancia fue el hecho de que mientras el GP presentó el aumento habitual de la población linfocitaria CD4⁺ que se observa en los pacientes con TARGA (82), en el GV se produjo un descenso de los linfocitos T CD4⁺ de un 9,1% (\pm 18,9%).

Dicho descenso se acompañó de un aumento de las subpoblaciones linfocitarias con marcadores de activación, tanto CD4⁺ como CD8⁺ (CD38⁺, CD38⁺HLADR⁺, CCR5⁺) y a un aumento en las respuestas proliferativas a mitógenos, tétanos y proteínas del VIH, sugiriendo un aumento global de la activación linfocitaria secundaria a las vacunaciones (**Figuras R.1.12.-R.1.23. y Tablas R.1.20-R.1.25.**).

Diversos estudios habían hallado que las vacunaciones podrían disminuir el número de linfocitos T CD4⁺, pero básicamente eran trabajos con una vacunación aislada y en la época pre-TARGA (276;288). En nuestro estudio se producen hasta 15 estímulos vacunales durante el periodo de tratamiento. Aunque, como se ha comentado con anterioridad, estos estímulos no se asociaron a una mayor frecuencia de CV detectables, y por tanto, parece poco probable que aumentaran la replicación viral, lo que sí indujeron fue una activación generalizada durante ese periodo, tal como muestran los aumentos en los marcadores de activación. Se podría decir, por tanto, que el descenso de linfocitos T CD4⁺ que se observa en nuestro trabajo no es debido a una mayor replicación viral sino a un aumento en la activación linfocitaria. La activación de hecho está considerada por muchos autores como el mayor determinante de la depleción linfocitaria T CD4⁺ y un fuerte predictor de la progresión de la enfermedad, más que la propia replicación viral y el efecto citotóxico en sí mismo (23;29-31). Las causas de la activación inmune generalizada existente en los pacientes infectados por el VIH que se han considerado, en ausencia de estímulos vacunales, son complejas, incluyendo la activación de las células T por antígenos tanto específicos (el propio VIH y los agentes oportunistas), como una activación colateral por antígenos no específicos. En este último aspecto parece jugar un papel primordial la pérdida en los primeros días de la infección de los linfocitos del tejido linfoide asociado a mucosas, lo que provocaría el paso continuo de antígenos desde el tubo digestivo al organismo (18-22). Esta activación de linfocitos T CD4⁺ tendría distintas consecuencias, como proporcionar nuevas dianas para la replicación del VIH, un consumo crónico de células *naïve* y memoria en reposo por el recambio aumentado de las células T, con una expansión relativa de los linfocitos T CD4⁺ memoria efectores de vida media corta (30;32), y alteraciones en el control del ciclo celular, aumentando la propensión a caer en una apoptosis inducida por

activación (33;34). Por tanto, una consecuencia de esta activación, fisiológica por otro lado, es un aumento de la muerte celular. Se ha descrito que esta activación crónica afectaría tanto a los linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺, pero dañarían predominantemente a los primeros por ser más sensibles a los efectos perjudiciales de la activación inmune, ser regenerados menos eficientemente y, lógicamente, por ser las dianas directas del VIH.

Nuestro estudio ofrece por tanto un modelo *in vivo* de aumento de esta activación y de sus posibles consecuencias, y confirma la depleción linfocitaria secundaria que se le atribuye. Si el descenso de los linfocitos CD4⁺ es debido a una redistribución, por ejemplo al tejido linfático, o bien es debido a un aumento en su destrucción, no es posible asegurarlo con nuestros resultados. En cualquier caso, lo que no ocurrió fue un aumento superior en la proliferación celular entre los GP y GV (aumentó en los dos grupos de forma similar durante el periodo de tratamiento), de forma que, a pesar de mantener una proliferación aumentada, el GV no pudo compensar la pérdida de los linfocitos T CD4⁺.

Cabe decir que el aumento en la activación no se produjo en el GV de forma continua durante los 12 meses. Se observaron oscilaciones durante el periodo vacunal, fundamentalmente ascensos en los meses 3 y, sobre todo, 12. Estas oscilaciones podrían obedecer a que las diferentes vacunas podrían influir de forma distinta sobre el sistema inmune. Por un lado, alguna de las vacunas podría producir mayor activación que otras (por ejemplo en nuestro caso las vacunas de los meses 2 ó 10, que serían VHB (segunda dosis), gripe, Td o VHA (segunda dosis)). Por otro lado, cabe la posibilidad de que todas las vacunas aumentaran la activación, pero alguna la disminuyese, en este caso las administradas antes de los meses 6 y 9 (VHA y VVZ (mes 4), VHB y VVZ (mes 6) o sarampión-rubéola y parotiditis (mes 8)). De hecho, en individuos sanos se ha demostrado que existe una alteración inmune inespecífica y transitoria y de incierta relevancia clínica tras la administración de la vacuna frente al VHB, con un descenso de las respuestas linfoproliferativas T a PHA a los 8 días de la primera dosis y a los 4 días de la segunda dosis (353). También se ha descrito que la vacuna sarampión-rubéola-parotiditis suprime la inmunidad celular, durando esta supresión aproximadamente 4 semanas (225;282). Con otras vacunas como la neumocócica también se han observado efectos inmunomoduladores

e inmunosupresores tras su administración (280). Debido a la administración simultánea de varias vacunas, en nuestro caso no es posible saber cuál fue el efecto predominante de cada una o si lo que se observó fue la resultante de los efectos particulares. En cualquier caso, lo que sí está claro es que el calendario produjo un aumento global en la activación general.

El calendario vacunal también se asoció a cambios en las subpoblaciones *naïve* y memoria, fundamentalmente con un aumento de las últimas durante todo el periodo vacunal (**Figuras R.1.14. y R.1.16.**). Es sabido que la expresión de diversos receptores y ligandos en la superficie de los linfocitos cambia como resultado de la exposición antigénica del sistema inmune. Los linfocitos que expresan CD45RA son células T *naïve* que, cuando se activan en presencia de su antígeno específico, natural o vacunal, cambian a expresar la molécula más pequeña CD45RO como fenotipo memoria (235-237). CD45RARO se ha identificado como el fenotipo de células en la transición debido a la precoz expresión de la isoforma CD45RO y el relativo retraso en la pérdida del CD45RA de la superficie durante la estimulación (238;239). La vacunación (o la misma exposición al agente infeccioso vivo) produce entonces cambios en la expresión de las isoformas CD45, de forma que los pacientes vacunados muestran mayor proporción de CD45RO y descenso de CD45RA tras 6 días de estimulación *ex vivo* con antígenos de influenza (231). Lo que nosotros vemos en nuestro estudio es un aumento continuo en las células CD45RA⁻RO⁺, posiblemente por los estímulos vacunales “continuos”, y no deja de ser, en el fondo, otro marcador de “activación” celular.

Otro aspecto importante asociado a las vacunaciones fue el aumento hallado en las respuestas linfoproliferativas a diferentes activadores. De hecho, tanto las respuestas linfoproliferativas a mitógenos inespecíficos, como a toxoide tetánico, como a las proteínas del VIH gp160 y p24, aumentaron (**Figuras R.1.20.-R1.22 y Tablas R.1.24.-R.1.25.**). Esta elevación de las respuestas linfoproliferativas sugiere una activación policlonal de los linfocitos T colaboradores en el contexto de las vacunaciones, otro marcador de activación celular. De hecho, aumentaron las respuestas frente al toxoide tetánico antes de la administración de la

vacuna antitetánica, y aumentaron las respuestas frente al VIH cuando, aparentemente, no existió una mayor exposición al virus (al menos no se detectó) en el GV. Estos hallazgos pueden justificarse por observaciones recientes en las que se demuestra que, a pesar de la ausencia de estímulos antigénicos específicos, la respuesta memoria $CD4^+$ y $CD8^+$ específica puede mantenerse durante años (246-248). Esta capacidad estaría mediada por citocinas de forma que la exposición de células T específicas frente a su antígeno permitiría su activación y mantenimiento, así como la de otras células T memoria específicas para otros antígenos diferentes (249). Así, las células T colaboradoras memoria frente a un determinado antígeno son susceptibles *in vivo* a la estimulación procedente de T colaboradoras memoria que estén respondiendo a su antígeno. Esto, en términos de protección inmune, permitiría aumentar la efectividad de las respuestas específicas frente a un agente infeccioso. En términos de laboratorio sin embargo, dificulta la evaluación de las células memoria específicas.

Cabría la posibilidad de que el aumento de las respuestas linfoproliferativas frente al VIH fuese debido a un aumento de la exposición que, por los motivos anteriormente expuestos (aumento de la CV antes de la determinación, elevación de la CV en el tejido linfático), no se hubiesen detectado. Se sabe que cuando el sistema inmune se reexpone a los antígenos del VIH durante las interrupciones del TARGA (66;107-111) se recuperan parte de estas respuestas. También se ha visto en pacientes que se exponen al VIH pero que no llegan a infectarse que se produce un aumento en estas respuestas (Suy A, Castro P, y col., manuscrito en preparación). Sin embargo, el aumento de otras respuestas linfoproliferativas inespecíficas o frente al toxoide tetánico y la ausencia de aumento en las respuestas $CD8^+$ específicas van en contra de estas hipótesis. Respecto a este último aspecto, aunque inicialmente existía una buena correlación entre las respuestas linfoproliferativas y $CD8^+$ específicas a VIH, con las vacunaciones dicha correlación se perdió, de forma que las respuestas $CD8^+$ no aumentaron tanto como las linfoproliferativas, mayoritariamente $CD4^+$, lo que sugiere que la activación producida afecta de forma diferente ambas poblaciones, si bien cabe decir que las técnicas exploratorias son diferentes (los ensayos de linfoproliferación detectan proliferación y el ELISPOT producción de citocinas, en este caso IFN- γ) y no necesariamente habrían de coincidir .

Por otro lado, podría pensarse que el aumento en las respuestas linfoproliferativas anti-VIH podría jugar un papel en que no se observe un aumento de la CV en el GV. Pero el hecho de que tras la retirada del TARGA estas respuestas fuesen inefectivas para controlar mejor la replicación viral (el rebote en el GV fue igual o incluso superior) no apoyan esta idea.

2.2.4. Efectos del calendario vacunal sobre la función tímica y el sistema IL-7/IL-7R

Tal y como se ha descrito, las vacunaciones inducen cambios en las poblaciones linfocitarias T, básicamente produciendo un cambio de fenotipo celular *naïve* a memoria (127;245;759;760). Se planteó la hipótesis que estos cambios podrían producir un descenso inicial en el compartimiento de las células *naïve*, con un consecuente aumento de la citocina homeostásica reguladora IL-7 y, finalmente, una estimulación de la timopoyesis que daría lugar a nuevas *naïve*. Por ello se evaluaron los parámetros de función tímica y el sistema IL-7/IL-7R.

No se detectaron cambios significativos en el GV atribuibles al calendario vacunal ni en las copias de *TRECs*/μL, ni en el volumen o índice tímico, ni en las concentraciones séricas de IL-7 (**Figuras R.1.24-R.1.25** y **Tablas R.1.28-R.1.30**). Estos parámetros presentaron en ambos grupos aumentos durante el periodo de tratamiento, demostrando que, a pesar del tiempo de infección por el VIH (media de 2321 días) y la duración del TARGA (media de 1336 días), los pacientes seguían aumentando su función tímica. De hecho, ya es sabido que la función tímica aumenta con el TARGA de forma proporcional al aumento de linfocitos T CD4⁺ (85;86;572;575-583;600;633;745), pero es importante saber que esto ocurre incluso tras más de 1000 días de TARGA.

Donde existieron diferencias fue en la evolución de las copias de *TRECs*/10⁶ CMSP, en las subpoblaciones *naïve* y en la expresión del receptor de la IL-7.

El GV experimentó una tendencia a disminuir el número de copias de *TRECs*/10⁶ CMSP. Teniendo en cuenta que los otros parámetros de función tímica aumentaron, este cambio se debe probablemente a la combinación de un efecto dilucional por la expansión periférica celular asociada a las vacunaciones y a la disminución linfocitaria debida a la activación.

Por lo que respecta a los cambios en las poblaciones *naïve*, las CD4⁺ evolucionaron de forma similar en ambos grupos, con un aumento asociado al TARGA y en el que la timopoyesis podría jugar cierto papel (85;583). Pero en las CD8⁺ *naïve* las vacunaciones indujeron un descenso, que no se debería a una disminución en la función tímica sino a la maduración de estas células hacia células en transición (CD45RA⁺RO⁺) y memoria inducida por las vacunaciones recibidas (231).

Finalmente, se observó un aumento en el GV en la expresión de CD127 (IL-7R) en las poblaciones linfocitarias T CD4⁺ y CD8⁺ tanto CD45RA⁺ como CD45RO⁺. Aunque existe controversia respecto a los mecanismos que regulan su expresión linfocitaria, se han descrito cambios en ella en el contexto de la infección por el VIH, básicamente un descenso (y por tanto disminución de su sensibilidad a la IL-7) en los linfocitos T tanto CD8⁺ (728;729) como CD4⁺ (734), que jugarían un papel en la desregulación de la homeostasis linfocitaria. Tras el inicio del TARGA se produciría una recuperación de su expresión a partir de los 6 meses (729-732). En nuestro estudio lo que observamos es un aumento generalizado de la expresión de CD127 muy superior en el GV, y por tanto probablemente atribuido a las vacunaciones. Se ha descrito que el CD127 disminuye, sobre todo en las células *naïve*, asociado a su activación, re-expresándose o persistiendo expresado al final de la fase de expansión en una minoría de las células T (que representan un 5-10% de las células efectoras), sugiriendo tener un papel crucial en la transición de efector a memoria (692). Por tanto, lo que podríamos estar observando no es la primera fase de activación sino la expresión en las células efectoras, aumentada por las vacunaciones recibidas.

2.2.5. Efectos del calendario vacunal sobre las respuestas a los antígenos vacunales

La respuesta vacunal de los pacientes infectados por el VIH se encuentra comprometida (253) tanto por alteración en la función celular B (254), como la T (255-257). En general las respuestas a nuevos antígenos se afectan más que las de antígenos de recuerdo, que permanecen relativamente preservadas en las primeras fases de la infección (254;258;259). Ello parece debido a que para la elaboración de una respuesta de recuerdo o secundaria se requiere un

número bajo de células T colaboradoras y a que la activación de las células B memoria en las respuestas de recuerdo puede ser más eficiente que la de las células *naïve* en caso de respuestas primarias (254).

En nuestro estudio las vacunaciones indujeron aumentos valorables en la respuesta humoral para todas las vacunas en las que dicha respuesta pudo ser evaluada, tanto desde el punto de vista cuantitativo, con un aumento en el número de anticuerpos, como cualitativo, con un aumento en la proporción de pacientes seropositivos cuando existía algún paciente no protegido basalmente (**Figuras R.1.26.-R.1.42.** y **Tablas R.1.31.-R.1.49.**) Este aspecto es importante pues muestra que, aunque se administrasen diversas vacunas conjuntamente o de forma sucesiva, esto no supuso una incapacidad para responder a las mismas.

Sin embargo encontramos una serie de limitaciones en la interpretación de la respuesta “real” humoral. Por un lado, existen antígenos como el de la gripe de los que no se dispuso de la técnica para valorarla. De otros antígenos como el del sarampión, parotiditis y varicela, sólo se dispuso de una técnica cualitativa, con valores dicotómicos positivo o negativo, y dada la alta prevalencia de seropositividad para estos agentes, la capacidad de medir el efecto humoral de la vacuna (o placebo) resultó limitada. Finalmente, y de forma importante, todos los antígenos de los que se dispuso de serologías cuantitativas, tenían un límite superior de sensibilidad (y uno inferior) por encima del cual no se pudo cuantificar la variación “real” del título de anticuerpos. Esto supone un gran problema para interpretar tanto ascensos como descensos en pacientes con títulos muy altos o muy bajos, y puede justificar algunos de los resultados que pueden parecer controvertidos. Por ejemplo: si un paciente tiene una serología positiva para VHB de 1000 mUI/mL (límite superior) quiere decir que tiene una cifra de anticuerpos ≥ 1000 mUI/mL, p.ej. 1500 mUI/mL; si se vacuna, la siguiente determinación probablemente seguirá siendo de 1000 mUI/mL y no sabremos si hay una respuesta o no, cuando probablemente si la haya habido (y haya pasado de 1500 a 5000 mUI/mL p.ej.) (**Figura D.2.1.**)

A pesar de las limitaciones comentadas, se observaron aumentos en los títulos de anticuerpos en todas aquellas vacunaciones que disponían de cuantificación de la respuesta (VHA, VHB, rubéola, neumococo, tétanos y difteria).

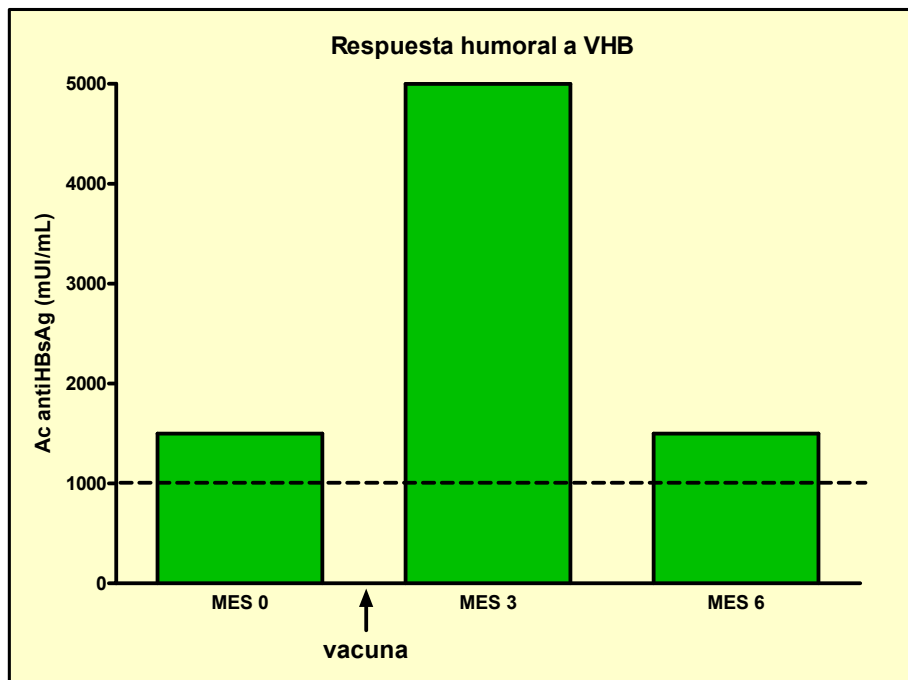


Figura D.2.1. Ejemplo de limitación de los estudios serológicos realizados. Si un paciente tiene una serología para VHB de 1000 mUI/mL en el mes 0, puede realmente ser de 1500 mUI/mL. Tras la vacuna, seguiremos detectando 1000 mUI/mL, cuando realmente se ha producido un aumento del título significativo (a 5000 mUI/mL). Posteriormente, volverá a bajar de forma significativa y no lo detectaremos.

Desde el punto de vista cualitativo se pudo constatar la seroconversión secundaria a la vacunación frente a VHA (los 3 pacientes negativos en el GV positivizaron), VHB (de los 8 pacientes negativos en GV, 6 positivizaron), parotiditis (el único paciente negativo en GV positivizó), neumococo (de los 10 pacientes negativos positivizaron 3), tétanos (los dos pacientes seronegativos positivizaron tras la vacunación) y difteria (de los 10 pacientes negativos, 5 positivizaron). No fue posible evaluar la respuesta cualitativa en el caso de las vacunaciones para VVZ, sarampión y rubéola por tener el 100% de los pacientes serologías positivas. Por tanto, globalmente de las 34 serologías negativas que presentaron los 13 pacientes, la probabilidad de que al menos una fuese negativa tras el calendario vacunal fue del 41,18% (95% IC: 24,67-59,28%). Es decir, que casi con un 50% de probabilidades no habría respondido a alguna de las vacunas. Viendo que las tasas de respuesta a cada vacuna dentro del

calendario no difieren de su administración por separado, sí hay que hacer notar que, cuantas más vacunas se administren, más probabilidades hay de que alguna no responda, no por interacciones, sino simplemente por una cuestión de probabilidades. En función de las necesidades de protección debidas al riesgo concreto frente a un determinado agente, sería necesario comprobar por tanto la respuesta a la vacuna.

Respecto a los resultados hallados en las respuestas humorales cabe además comentar algunos aspectos. En el caso de la vacunación con VHA, de los tres pacientes que respondieron a la vacunación, uno necesitó dos dosis para postivizar, confirmando que la respuesta mejora al administrar dos dosis (317;318;320).

En la vacunación con VHB, el 75% de los pacientes respondieron (95% IC: 34,9-96,82%), siendo una tasa de respondedores similar a la descrita previamente para pacientes bien controlados con TARGA (349).

Tras la vacunación neumocócica el 30% de los pacientes seroconvirtieron (95% IC: 6,7-65%). Como otras vacunas, se ha descrito menos inmunógena que en individuos sanos, con tasas de respuesta del 35% (frente al 60% en individuos sanos) (259;306;416;418;418;420;421;424;426-431). Las vacunas conjugadas neumocócicas son más inmunógenas que la polisacárida convencional en sanos (781), pero aunque un estudio también lo ha demostrado en adultos infectados por el VIH (442), de momento no parece ofrecer ventajas en esta población (428;443).

Finalmente, las respuestas a la vacunación de difteria fueron del 50% (95% IC: 18,7-81,3%). Diversos estudios han hallado que la vacuna Td tiene menor inmunogenicidad en los pacientes con infección por el VIH que en individuos sanos, tanto en niños (446) como adultos (254;262-264), y tanto en cantidad de anticuerpos producidos como en duración de la respuesta (262;446), siendo el toxoide diftérico incluso menos inmunogénico que el tetánico en estos pacientes (447).

Por tanto, aunque la muestra es pequeña y por tanto los resultados deberían confirmarse con muestras mayores, las tasas de respuesta a las diferentes vacunaciones fueron similares a las descritas en la literatura cuando se administraron las vacunas por separado. Esto apoyaría el

hecho de realizar varias vacunaciones de forma simultánea ya que no parece alterar la respuesta, facilitando la inmunización de los pacientes.

Por lo que respecta a las respuestas celulares, los cambios hallados entre el GV y el GP fueron mínimos. De hecho no se observaron cambios valorables en las respuestas a VHA, VVZ, sarampión, parotiditis, neumococo o tétanos. Únicamente en el caso del VHB y la gripe se observó un aumento de la respuesta celular tras la administración de la vacuna, fundamentalmente por ELISPOT.

Estos resultados de respuesta celular han de ser interpretados con precaución. Por un lado, se obtuvieron un número elevado de valores nulos y cero en las diferentes determinaciones (ver **apartado 3.19.3. de Métodos**), sobre todo en el caso del AMPLISPOT. Motivos técnicos podrían explicar parte de estos resultados, como problemas de viabilidad celular relacionados con citotoxicidad durante el proceso de congelación y descongelación, que afectan sobre todo a los linfocitos T CD4⁺ y a las células presentadoras de antígeno; o toxicidad inducida por los antígenos vacunales utilizados, bien por el propio antígeno, bien por sus excipientes. Además, al ser el tamaño muestral pequeño, valores nulos en una determinación influyen mucho en el resultado. Por ello, aunque analizadas globalmente (todas las determinaciones durante el periodo de estudio) las respuestas para cada antígeno por ELISPOT y AMPLISPOT tuvieron una buena correlación (**Figuras M.3.6 y M.3.7.**), para cada determinación puntual y en determinados antígenos se halló una baja correlación entre ellas.

Pero cabe también la posibilidad de que, por la propia naturaleza y diseño del estudio y de la respuesta inmune, los resultados hubiesen sido falseados. En este sentido, la administración conjunta de varias vacunaciones y el grado de activación generalizado pudiera haber interferido en la técnica, que evalúa la capacidad de producir *in vitro* ciertas citocinas (en nuestro caso IFN- γ). De hecho, las vacunaciones que primero se administraron (VHB y gripe) son las únicas que dieron resultados más valorables. La activación progresiva a la que fue sometido el sistema inmunitario, o bien la expansión de múltiples células memoria con múltiples antígenos específicos, podría haber alterado las respuestas posteriores. Otra

posibilidad reside en que la respuesta celular se hubiese producido antes de la extracción, que recordemos se hacía 1 mes después de la vacunación, y, tras la contracción de la población específica no se pudiese detectar. Por otro lado, podría existir una respuesta celular $CD8^+$ que no se estuviese detectando. Recientemente se ha publicado que la respuesta celular frente a diferentes antígenos puede producirse a través de diversas citocinas, es decir, que no siempre la exposición de una célula a su antígeno supone una producción de $IFN-\gamma$, sino que en ocasiones lo que se ha podido detectar es producción de IL-2 (p.ej en el caso de células específicas para el tétanos), IL-4 o $TNF-\alpha$ (770). Finalmente, existen antígenos T-independientes, como los polisacáridos capsulares, base de la vacuna neumocócica, que no necesitan el estímulo de la célula Th2 para producir anticuerpos y por tanto la respuesta celular que induzcan puede ser pequeña o inexistente (250).

Por todos estos motivos la correlación entre las medidas de respuesta antigénica humoral y celular fueron en general bajas excepto para el VHB.

Por último, dos factores influyeron en la respuesta inmune que se halló en el GV frente a algunas vacunas. Por un lado, se hallaron correlaciones negativas entre la edad y el aumento de la respuesta vacunal frente a VHA, VHB, gripe (respuesta celular), VVZ (respuesta celular) y rubéola. De hecho está descrito que la edad influye en la respuesta vacunal (772). Por otro lado, se halló una correlación positiva entre el nadir de linfocitos T $CD4^+$ y la respuesta celular a VHB, hecho que también se había descrito con anterioridad. La restricción de la inclusión en el estudio de pacientes con nadir ≥ 300 linfocitos T $CD4^+/\text{mm}^3$ posiblemente limitó que existiesen más correlaciones al no introducir pacientes con nadir bajo, que son los que peor responden a las vacunas en general (262-266).

2.3. CAMBIOS TRAS LA SUSPENSIÓN DEL TRATAMIENTO

2.3.1. Generalidades. Eventos clínicos

Tras la interrupción del TARGA en el mes 12, todos los pacientes estuvieron 6 meses sin tratamiento, excepto un paciente (GV) que voluntariamente lo quiso reiniciar en el mes 15 y otro (GV) que por deterioro inmunológico (linfocitos T CD4⁺ < 350/mm³) tuvo que volver a recibir TARGA en el mes 18. Ninguno de los 25 pacientes, incluido el que presentó la mayor caída de linfocitos T CD4⁺, presentó efectos secundarios atribuibles a la interrupción: síndrome retroviral agudo (204), aumento de infecciones oportunistas, plaquetopenia, u otros. Aunque el número de pacientes es pequeño y el tiempo de evolución es corto, es otra muestra de la seguridad clínica de las interrupciones guiadas. Contrariamente, en los últimos meses se han reportado dos estudios de interrupción, el SMART y el Trivacan, el primero de ellos con el mayor número de pacientes incluidos en un ensayo de este tipo, en los se había constatado un aumento de las infecciones oportunistas (200;201). Sin embargo, dos aspectos importantes diferencian estos trabajos de nuestro estudio, como son el nadir de linfocitos T CD4⁺, que en nuestro caso fue ≥ 300 células/mm³, mientras que en el SMART o el Trivacan no había límite, siendo la media de 250 células/mm³ en el SMART y 275 células/mm³ en el Trivacan; y el límite de caída de los linfocitos T CD4⁺, hasta 350 células/mm³ en nuestro estudio y hasta 250 células/mm³ en los estudios SMART y Trivacan. Otro trabajo reciente, el Staccato Trial, en el que el límite de caída fue como el de nuestro estudio, sólo mostró eventos leves (202).

2.3.2. Cambios en la carga viral

Tras la suspensión del TARGA los 25 pacientes presentaron un rebote de la CV. Aunque los valores medios de los diferentes parámetros para evaluar dicho rebote fueron superiores en el GV, su análisis no mostró diferencias significativas entre los grupos (**Tabla R.4.1.** y **Figura R.1.44.**). Tampoco fue significativamente diferente la proporción de pacientes que tras el periodo de 6 meses sin TARGA presentaba menos de 5000 copias/mL, y sólo 1 paciente en el GP y 2 en el GV estuvieron por debajo de esa cifra en el mes 18 ($p = 1$, test exacto de Fisher). De aquí se derivan dos conclusiones de diferente índole y aplicabilidad.

En primer lugar, el calendario vacunal propuesto no permite controlar mejor la CV del VIH tras retirar el TARGA. Esto va en contra de una de las hipótesis iniciales del estudio, en la que se planteaba que los pacientes infectados por el VIH que recibiesen múltiples dosis de vacunas presentarían elevaciones transitorias de virus. Estas elevaciones podrían comportarse como una forma simple de inmunoterapia activa, equiparable a una autovacunación con el “virus autólogo atenuado”, en la que la atenuación vendría dada por la supresión vírica con el TARGA. Esto conllevaría un aumento de las respuestas específicas contra el VIH y un mejor control de la replicación viral tras la suspensión del TARGA. Por tanto, diseñado de esta manera, el calendario vacunal no resultó una inmunoterapia eficaz frente al VIH.

Cabe destacar sin embargo que no se produce un mejor control de la replicación viral a pesar que el GV había aumentado las respuestas linfoproliferativas (CD4⁺) específicas frente al VIH. Esto iría parcialmente en contra de los trabajos en los que se asocia un aumento de estas respuestas a un mejor control de la CV (55;206), ya sea al potenciar la proliferación de respuestas CTL (67) o a través de su propia actividad antiviral (68). Sin embargo, un trabajo reciente halló resultados similares. El grupo de Pappasavas y colaboradores (550) observó un aumento de estas respuestas bajo TARGA en una cohorte de pacientes que presentaban EVI, pero que posteriormente no se asociaron a un mejor control de la CV tras suspender el tratamiento. Este resultado aparentemente paradójico puede explicarse por factores dependientes de los pacientes, como disfunciones acompañantes en la respuesta inmune natural (782;783), depleción clonal (784) o alteración de las células CD8⁺ (39), o bien por factores virológicos como el escape viral con variantes incapaces de ser reconocidas por el repertorio linfocitario T previamente establecido (71) y que pueden hacer que los péptidos presentados *in vitro* y los presentes *in vivo* sean diferentes. En este sentido, recientemente se han publicado los resultados de un estudio prospectivo en el que la presencia de respuestas linfoproliferativas específicas frente al VIH no se asociaban a una mejor evolución de la infección, y que con gran probabilidad eran el resultado de la exposición y no un evento protector (69;70).

Resulta interesante además que el aumento de las respuestas linfoproliferativas durante las vacunaciones no se acompañó de un aumento en las respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH,

que se consideran claves para el control de la replicación viral en ausencia de TARGA. (55;64;65). Finalmente, cabe la posibilidad que realmente estas células tuviesen un papel en el control de la replicación viral tras la interrupción, pero que este control se limitase a horas o días, ya que son estas células CD4⁺ específicas anti-VIH las que se infectan preferentemente (28) y se podrían perder rápidamente, no llegando a observar su efecto al realizar la primera observación 1 mes después de la interrupción.

En segundo lugar, el calendario vacunal que se utilizó no supuso una peor evolución virológica tras retirar el TARGA. Teniendo en cuenta que las vacunaciones habían inducido un aumento en la activación linfocitaria y que la infección de los linfocitos T CD4⁺ por el VIH y la replicación viral son más eficientes cuando las células están activadas (271-273), el rebote viral en el GV pudiera haber sido mayor. De hecho, los parámetros del rebote fueron mayores en el GV, pero no de forma significativa. Una posible explicación de que el rebote no fuese mucho mayor a pesar de la activación podría ser el hecho que los fenómenos de activación inducidos por las vacunaciones fuesen de bajo nivel y transitorios, mientras que el estímulo que provoca el rebote viral tras la interrupción es muy superior. Por ello, rápidamente el GP presentó niveles de activación similares a los del GV e igual “facilitación” a la infección linfocitaria.

Por otro lado, tampoco se halló una mayor incidencia de mutaciones virales asociadas al calendario vacunal (**Tabla R.1.50.**) (285). Durante el periodo de tratamiento, sólo un paciente (GV) presentó una elevación de CV lo suficientemente importante (> 1000 copias/mL) para poder genotipar su virus. En este caso se detectó una M184V, probablemente en el contexto de una baja adherencia por parte del paciente. Tras la interrupción, las mutaciones que se hallaron en el genotipado del primer virus que se aisló (en el mes 13) fueron sugestivas de que el virus aislado fue el virus salvaje, pero en cualquier caso no fueron diferentes entre grupos. De hecho, las mutaciones que aparecieron se produjeron en pacientes del GP. En el caso de la mutación a EFV que presentó un paciente, se debe con toda probabilidad a una mayor vida media de este fármaco en ese paciente en concreto, de forma que a pesar de que se suspendiera el fármaco 5

días antes que los otros fármacos del regimen, presentó mutaciones de resistencia intermedia (197).

2.3.3. Cambios en el sistema inmune

El calendario vacunal que recibieron los pacientes del GV durante la fase de tratamiento influyó en la evolución de los parámetros del sistema inmune tras la interrupción del TARGA, fundamentalmente en los dos primeros meses tras la suspensión (del mes 12 al 14), de forma que los pacientes del GV presentaron una menor (y más tardía) activación linfocitaria CD4⁺, pérdida de linfocitos T CD4⁺ totales y aumento de las respuestas linfoproliferativas, mientras que presentaron mayores (y más precoces) aumentos en la activación linfocitaria CD8⁺, aumento de los linfocitos T CD8⁺ totales y aumento de las respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH. Sin embargo, al final de los 6 meses de la interrupción, los diferentes parámetros tendieron a igualarse en los dos grupos (**Figuras R.1.46.-R.1.58.** y **Tablas R.1.51.-R.1.55.**).

Las diferencias en la evolución inicial en las subpoblaciones linfocitarias tras la interrupción son interesantes, pues aunque transitorias, indican una trascendencia inmunológica importante de las vacunaciones. Sin embargo, globalmente y sobre todo al final del periodo, ambos grupos presentaron tendencias similares en la evolución de las subpoblaciones linfocitarias y coincidentes con las descritas previamente en la literatura tras las interrupciones del TARGA, como el aumento de los marcadores de activación tras la interrupción (211); o el descenso en los linfocitos T CD4⁺ totales en dos fases, un descenso rápido inicial (211;212) y una segunda fase de descenso más lento. La caída final de linfocitos T CD4⁺ al final del estudio fue similar en los dos grupos, y sólo un paciente en el GV llegó a bajar de los 350 linfocitos T CD4⁺/mm³ antes del mes 18. Incluso, cuando se analizó por medio de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier los pacientes que cayeron en al menos una determinación por debajo de 500 linfocitos T CD4⁺/mm³ totales a partir del mes 12, tampoco se hallaron diferencias significativas ($p = 0,73$) (**Figura R.1.46.**).

Estas diferencias en la evolución, principalmente al inicio de la suspensión del TARGA, podrían obedecer a que el GV habría recibido lo que podríamos denominar una “preactivación”

o un “entrenamiento” al “caos” inmunitario que supone el rebote viral. Las diferentes vacunaciones provocaron en el GV aumentos en la activación celular $CD4^+$ y $CD8^+$ (tanto por marcadores fenotípicos como por las respuestas proliferativas) que harían que estas células estuvieran en un estadio más maduro, “preparadas” para la “mega-activación” que supone el rebote de la CV, una activación mucho mayor que la inducida por las vacunaciones. De este modo, las células más “susceptibles” al daño producido por la infección por el VIH, los linfocitos T $CD4^+$, sufren en el GP una mayor activación y un mayor descenso proporcionalmente en este periodo que el GV, porque éste último ya la había recibido, aunque en menor medida y de forma controlada, con anterioridad. Y por otro lado, las principales células con actividad anti-VIH, los linfocitos T $CD8^+$, aumentan y se activan más rápido en el GV que en el GP por partir de una situación más “ventajosa” desde el punto de vista de la activación. Otros autores habían descrito también recientemente que los pacientes que tras la interrupción tenían un mayor aumento en los linfocitos T $CD8^+$ y $CD8^+$ activados eran los que menos $CD4^+$ perdían (211;550). En nuestro caso, además no se puede descartar la posibilidad de que el aumento de las respuestas linfoproliferativas durante el tratamiento no sea en parte responsable de esta evolución inicial “más favorable” desde el punto de vista inmunológico al ayudar al control de la replicación, aunque no se observen los efectos en el virus en plasma. Sin embargo, estas mismas respuestas (las linfoproliferativas en general y las anti-VIH en particular) aumentan más en el GP tras la interrupción del TARGA, remedando lo ocurrido durante las vacunaciones en el GV. E igual que entonces, no se asocia a un mejor control de la replicación viral, siendo válidos los mismos motivos (disfunciones de los otros componentes del sistema inmune o escape viral (39;71;782-784)).

Por otro lado, en el GV también aumentaron tras la interrupción las respuestas $CD8^+$ específicas frente al VIH, de forma similar a como se ha descrito en las estrategias de STI (111;119;195) o como se ha descrito en el trabajo de Papasavvas y col. en los pacientes con EVI tras la interrupción (550). Sin embargo, este aumento no se asocia a un cambio sustancial en el control de la replicación viral, ni en nuestro estudio, ni en el de Papasavvas y col. (550) y tampoco en los de STI, donde sólo se han logrado controles relativos a corto-medio plazo en un

20% de los pacientes que la realizaban (111;119;180). En el caso de las estrategias STI se atribuye la falta de control a pesar de estas respuestas a que probablemente éstas no aumentan *de novo*, sino que ya estaban antes del TARGA (111), y que posiblemente existía sólo una débil y transitoria respuesta CD4⁺ (195). En nuestro caso, al igual que ocurre en el trabajo de Papisavvas y col. en el grupo de pacientes con EVI, el GV presentaba durante el TARGA mayores respuestas CD4⁺ anti-VIH y tras la interrupción mayores respuestas CD8⁺ anti-VIH, y a pesar de ello no se asoció a un mejor control. Alteraciones en otros sistemas como la inmunidad innata, la alteración de la respuesta citotóxica en forma de defectos en la producción de perforinas y granzimas secundaria a la desregulación y destrucción de los linfocitos T CD4⁺ mediada por el virus, o el escape viral, son posibles explicaciones para esta controversia (39;71;782-784). Finalmente, aunque viendo la evolución de la CV durante los 6 meses de interrupción es poco probable, este aumento en las respuestas anti-VIH podría acompañarse de un mejor control de la CV a medio plazo, logrando una CV de equilibrio o *set point* viral más bajo.

Por lo que respecta a los cambios de fenotipo *naïve* y memoria, los cambios más marcados se produjeron en los linfocitos T CD8⁺, que en general presentaron una disminución en el fenotipo *naïve* a expensas de aumentar los fenotipos doble positivo, sobre todo inicialmente, y memoria, durante todo el periodo. Los cambios en estos fenotipos en los linfocitos T CD4⁺ son mucho menos marcados, con apenas diferencias apreciables en los 6 meses sin TARGA. Estos cambios son similares a los referidos en los escasos trabajos que estudian estos fenotipos tras la interrupción (550;760). Como para los marcadores de activación, esta transición en los fenotipos se produjo de forma más precoz y marcada también en el GV, reflejando la “preactivación” que habíamos comentado con anterioridad, y acabando las células su proceso de “activación” o “maduración” en el contexto del rebote viral.

2.3.4. Cambios en la función tímica y el sistema IL-7/IL-7R

La administración del calendario vacunal no parece influir en la evolución de los parámetros de función tímica tras la interrupción del TARGA, pues ambos grupos presentaron tendencias similares (**Figura R.1.59.** y **Tabla R.1.56.**).

Las copias de *TRECs*, tanto los *TRECs*/μL como los *TRECs*/10⁶ CMSP, presentaron un descenso tras la suspensión del TARGA, fundamentalmente en los tres primeros meses. Dicha disminución ya había sido descrita en los primeros trabajos sobre *TRECs* por Douek y col., sin quedar claro que dicha disminución fuese por un aumento en la proliferación periférica o por un descenso real en la función tímica (608), dado que trabajos anteriores de timentomizados en seronegativos no habían hallado descensos en las copias de *TRECs* hasta después de los 3 meses (571). En nuestro caso, si bien es cierto que existe un aumento en la proliferación celular medida por la expresión del Ki-67 tras la interrupción, fundamentalmente en los linfocitos T CD8⁺CD45RA⁺, también se produce una tendencia a disminuir la masa tímica medida por TC. Aunque este descenso no es significativo, los cambios radiológicos que se pueden detectar tras sólo 6 meses sin TARGA deben ser limitados, en principio, limitados. Por lo que respecta a las poblaciones *naïve* como marcadores de ETR, como se comentó con anterioridad inicialmente disminuyeron, sobre todo los CD8⁺, pero este descenso parece más debido a cambios en el fenotipo por maduración hacia células transicionales y memoria que por disminución de la función tímica. En definitiva, es difícil saber en este periodo si existe un descenso de la función tímica.

A partir del mes 15 se produjo un cambio en la dinámica de los parámetros de función tímica, de forma que, tanto las copias de *TRECs* como las células *naïve*, dejaron de disminuir e incluso aumentaron, sobre todo las primeras. Aunque no se puede valorar la masa tímica pues sólo se realizaron TC en los meses 12 y 18 y, como se ha comentado, la tendencia entre estos meses es a un descenso no significativo, este cambio sugeriría un aumento en la función tímica entre los meses 15 y 18. Según nuestro conocimiento y, hasta la fecha, éste es el único estudio en el que se valoran estos parámetros tras la interrupción, y no podemos por tanto comparar con otros trabajos. El tamaño muestral es pequeño y el tiempo de evolución limitado, por lo que se deberían realizar otros estudios confirmatorios. Pero resulta interesante ver que el timo podría

jugar un papel en limitar el daño inmunológico producido por el VIH tras una interrupción. Explicaciones alternativas diferentes serían la existencia de fenómenos de redistribución de células portadoras de *TRECs* de tejidos linfoides a sangre periférica, o que existiese una destrucción preferencial de células no portadoras de *TRECs* (581;582;597;599).

Por lo que respecta a los niveles séricos de IL-7, se produjo en ambos grupos una elevación tras la interrupción del TARGA, aunque el patrón fue diferente según el grupo, pues mientras el GV presentó una mayor elevación inicial (meses 12-15) y un mantenimiento posterior, el GP presentó una elevación constante durante todo este periodo (**Figura R.1.60.** y **Tabla R.1.57.**). Dicho patrón está de acuerdo con diferentes trabajos en los que se ha visto que la IL-7 se correlaciona de forma positiva con la CV plasmática y aumenta el paso a fenotipo memoria, aumentando su administración las células CD4⁺ y CD8⁺ con este fenotipo, así como los marcadores de activación y proliferación (680;699-701;746;748), como ocurre de forma más marcada y precoz en el GV, el que presenta el aumento de IL-7 más marcado y más precoz. El enlentecimiento posterior en la elevación podría obedecer a la menor pérdida linfocitaria en el GV, pues se ha demostrado que tiene una correlación negativa con el recuento de linfocitos T CD4⁺ (680).

Por otro lado, la expresión del receptor de la IL-7 presentó una rápida disminución inicial, mayor en el GV. Dicha disminución coincide con la reportada tras la infección por el VIH tanto en linfocitos T CD4⁺ como en CD8⁺ (728;729;734), así como tras la administración de IL-7 en modelos animales (697), siendo mayor cuanto mayor es la activación (659;785).

2.3.5. Cambio en las respuestas a los antígenos vacunales

Teniendo en cuenta las limitaciones comentadas en el apartado **2.2.5** de la **Discusión**, no se detectó que la administración vacunal indujera diferencias significativas en la evolución de las respuestas humoral y celular frente a los diferentes antígenos vacunales tras la suspensión del TARGA, de forma que GV y GP evolucionaron de forma similar (**Figuras R.1.26.-R.1.42.** y **Tablas R.1.58.-R.1.67.**).

Sin embargo, aunque mayoritariamente no se detectaron cambios significativos, se produjo en general una tendencia a la disminución de las respuestas humorales y al aumento de las respuestas celulares en ambos grupos. Aunque más adelante en esta discusión se comentará con más detalle (**apartado 5**), lo primero es debido, en parte, a la evolución natural de toda respuesta inmunitaria de contraerse tras una expansión inicial (lo que ocurre fundamentalmente en el GV), pero también en parte a la propia interrupción. La infección por el VIH afecta a la respuesta inmunitaria B, y es un defecto que, según se ha descrito, ocurre precozmente en la infección, por lo que una interrupción de tratamiento podría aumentar esta disfunción y aumentar la pérdida de anticuerpos (786).

Respecto al aumento en la respuesta celular tras la interrupción, tanto en el GP y GV, podría obedecer a un fenómeno de activación policlonal secundario al rebote viral, con activación de células no específicas frente al VIH de forma colateral a la activación de las específicas frente al virus (249).

3. SUBESTUDIO A: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE EPISODIOS DE CARGA VIRAL DETECTABLE SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE EL TARGA Y TRAS SU INTERRUPCIÓN

3.1. Introducción

Como se expone en el apartado **1.1.** de la **Discusión**, una de las hipótesis que se habían planteado inicialmente al realizar el ensayo VAC-01 era que el calendario vacunal pudiera servir como terapia inmunomediada. Se había planteado que las vacunaciones se asociarían a la presencia de elevaciones transitorias de la CV (“blips” o EVI) (277;286;287) secundarias a la activación linfocitaria (271-273), y consecuentemente a un aumento de las respuestas específicas frente al VIH, tanto CD4⁺ como CD8⁺, lo que eventualmente podría asociarse a un mejor control de la replicación viral en ausencia de TARGA (538;753-755).

Sin embargo, no se halló que el calendario vacunal se asociase a un mayor número de EVI que el placebo, y aunque aumentaron las respuestas linfoproliferativas frente al VIH durante el TARGA, esto no supuso un mejor control de la CV tras la interrupción del tratamiento.

A pesar de todo, los pacientes de ambos grupos presentaron CV detectables durante el TARGA aunque éste era supresivo, por lo que se realizó un subestudio para valorar la influencia de estas CV detectables sobre los diferentes parámetros analizados en el estudio inicial, tanto durante el periodo de tratamiento como tras la interrupción: el sistema inmune, incluyendo subpoblaciones linfocitarias, respuestas linfoproliferativas ante diferentes activadores y respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH; la función tímica y el sistema IL7/IL-R; las respuestas adquiridas a los antígenos vacunales; y por último, el rebote de la CV.

Para ello se clasificaron los pacientes en función de si habían presentado episodios detectables de CV o no en grupo detectable (GD) o indetectable (GI), respectivamente. De hecho se realizaron dos subestudios, en función de los límites de detectabilidad de los ensayos

que se utilizaron para la cuantificación de la CV. En el primero de ellos (subestudio A1) se definió la detectabilidad como una $CV \geq 200$ copias/mL, obteniendo el GD y el GI. En el subestudio A2 la detectabilidad se definió en una $CV \geq 20$ copias/mL, diferenciando los grupos GI_{20} y GD_{20} , con la intención de valorar si la magnitud de la detectabilidad influía en los resultados hallados.

Al respecto de este análisis cabe tener en cuenta tres circunstancias inicialmente:

- Aunque la naturaleza del estudio siguió siendo prospectiva y randomizada, éste no se diseñó inicialmente para encontrar diferencias entre grupos con CV detectables y no detectables, por lo que la potencia estadística para detectar esas diferencias podría no ser suficiente. En cualquier caso, esto podría limitar las conclusiones negativas, las que hablasen de ausencia de diferencias. Pero no así las positivas, pues si con un tamaño muestral pequeño se detectan, probablemente se magnificasen con un mayor tamaño.

- Al clasificar los pacientes en dos grupos diferentes de los que inicialmente se crearon podrían haberse producido sesgos de selección en determinadas variables. Sin embargo, en principio no se consideraría necesario, para realizar un estudio de la influencia de episodios de viremia detectable, realizar estratificaciones, y por tanto cualquier sistema de randomización sería bueno en un grupo homogéneo en cuanto al control virológico e inmunológico como el nuestro: pacientes bien controlados con TARGA, con CV indetectables y linfocitos T $CD4^+$ >500 células/mm³. La única y más importante variable que podría inducir un sesgo sería, por tanto, la intervención que se realiza en el estudio, la vacunación o no de los pacientes, pero incluso esta variable quedó equilibrada: el 50% de los pacientes de cada grupo (tanto GD y GI como GD_{20} y GI_{20}) habían recibido el calendario vacunal y el 50% no, lo que igualaría, en principio, la influencia de esta variable. Si bien es cierto que lo correcto sería valorar o sólo pacientes no vacunados o sólo pacientes vacunados, en una muestra relativamente pequeña como la nuestra, esto supondría una “n” demasiado pequeña, pues supondría comparar, por ejemplo, 5 pacientes con CV detectable ≥ 200 copias/mL no vacunados con 8 pacientes con CV indetectable no vacunados, o el mismo número para los vacunados. En cualquier caso, este análisis también se realizó.

- Inicialmente el análisis se realizó para todos los episodios de CV detectable. Sin embargo, como se comentó con anterioridad en el apartado **2.2.2.** de esta **Discusión**, no todos los episodios de CV detectable que presentaron los pacientes durante el periodo de tratamiento fueron EVI, sino que podríamos hablar de que en el periodo de tratamiento se presentaron cuatro patrones diferentes de CV detectables: VPBN (en un paciente), viremia por ausencia de TARGA (en un paciente), viremia por (probable) falta de adherencia (en un paciente), y EVI (el resto). Por ser fisiopatológicamente diferentes, sus influencias sobre el sistema inmune probablemente resulten diferentes. Sin embargo, cuando el análisis se repitió sin estos pacientes, a pesar de disminuir el tamaño muestral, las diferencias se mantuvieron e incluso aumentaron. Por ello, en general hablaremos a partir de ahora de EVI para referirnos a todos los episodios de viremia detectables que detectamos a no ser que se especifique lo contrario.

3.2. Subestudio A1: Estudio de la influencia de episodios de carga viral detectable ≥ 200 copias/mL sobre el sistema inmunitario y el rebote de la carga viral durante el TARGA y tras su interrupción

3.2.1. Características basales

Todas las variables generales y virológicas analizadas basalmente fueron similares entre el GD y el GI, incluyendo el factor de riesgo para la adquisición del VIH, la duración de la infección y la duración del TARGA (**Tabla R.2.1.**). Respecto a este último punto, cabe decir que todos los pacientes incluidos en el estudio habían iniciado el TARGA durante la infección crónica, ninguno en la fase de primoinfección, lo cual es importante pues se han reportado diferencias tanto en la frecuencia como en la magnitud de los EVI entre los pacientes que habían iniciado TARGA durante la infección aguda (menos de 6 meses desde el inicio de los síntomas) y los que lo habían hecho durante la infección crónica (770). Así, según un estudio, los pacientes que iniciaban TARGA durante la primoinfección estaban siempre indetectables, mientras que lo hacían sólo el 21% de los crónicos (770).

Aunque algún autor ha hallado que los pacientes de menor edad se asocian a más EVI (532), las edades en los GD y GI fueron similares, al igual que en otros trabajos (370).

En el estudio sólo se incluyeron 5 mujeres (y 21 hombres). Todas estaban en el GI, es decir, que ninguna mujer presentó CV detectables en el periodo de estudio. Aunque la mayoría de autores no han encontrado diferencias en la detección de EVI en función de sexo (370), Easterbrook y col. (532) hallaron lo contrario, que las mujeres se asociaban a más EVI.

Tampoco se observaron diferencias basales en el TARGA que recibían los pacientes en el momento de la inclusión. En general, los trabajos en los que se han valorado los EVI tampoco encuentran relación entre el TARGA durante los EVI y la frecuencia o amplitud de éstos, observándose tanto con IP como con ITINAN, a pesar de que se tenía la sospecha de que, al tener estos últimos una barrera genética baja, podrían presentar una mayor frecuencia y una mayor incidencia de fracasos terapéuticos (370;478;479;533;534;537). Lo que sí parece asociarse a una mayor incidencia de EVI son los tratamientos poco potentes. Esto es así tanto en el momento del EVI, siendo más frecuentes los EVI con un tratamiento antirretroviral con biterapia en lugar de triple (476), como durante la historia previa. En nuestro estudio, aunque no alcanzó la significación estadística, el porcentaje de pautas que incluían un IP en el GD fue mayor que en el GI (70 vs 43,75%, $p = 0,69$, test exacto de Fisher). Cabe decir también que el IP mayoritario fue nelfinavir, que era el que estaban tomando todos los pacientes (excepto dos, que tomaban lopinavir/ritonavir), que se ha demostrado en diferentes estudios tener una potencia inferior a otros antirretrovirales (787-790).

El resto de variables relacionadas con el TARGA y que en algunos trabajos previos se habían asociado a una mayor incidencia de EVI, como haber recibido más tratamientos antirretrovirales (476;515;533;534), haber recibido monoterapia con indinavir o biterapia con ITIAN (475;479;532), fueron muy similares entre los grupos.

Por último, la proporción de pacientes vacunados en un grupo y el otro fue idéntica, del 50%, equilibrando así la variable que más confusión podría provocar en el análisis.

3.2.2. EVI y evolución virológica

No se hallaron diferencias entre los GD y GI en los parámetros virológicos basales, fundamentalmente la CV pico pre-TARGA y los episodios previos de EVI. Aunque en la literatura existen diferentes trabajos en el que el nivel de la CV al inicio del primer TARGA estaría directamente relacionada con la frecuencia de los EVI (475;512;532;770), sugiriendo que esos pacientes estarían predispuestos a tener mayores niveles de CV y controlar posteriormente peor la viremia durante el TARGA, otros trabajos no han confirmado estos hallazgos y, como en nuestro caso, no encuentran diferencias con la CV pre-TARGA (370;476) ni con el número previo de EVI (370). Sin embargo, cabe decir que existían pacientes que habían iniciado TARGA antes de disponer de las técnicas de cuantificación de ARN plasmático viral, por lo que el valor de la CV pre-TARGA ha de interpretarse con precaución.

Los EVI que se presentaron en el GD durante el TARGA no tuvieron un claro desencadenante, habiendo descartado la influencia de las vacunaciones en los mismos. De hecho, la mayoría de autores no han hallado relaciones directas entre eventos determinados y EVI (370). Otros, como Easterbrook y col. (532), hallaron factores “responsables” de EVI por encima de 400 copias/mL en la mayoría de sus pacientes (en el 75,8%, con pobre adherencia, interrupción o cambio de TARGA en el 42,66%, infección o vacunación intercurrente en el 26,2%, e interacción farmacológica en el 6,8% de los casos).

Uno de los factores más discutidos en su relación con los EVI es la falta de adherencia al TARGA. Presentar una adherencia baja al TARGA se sabe que se asocia con una menor capacidad para suprimir la CV y una peor evolución (504;540;780). Por ello se ha asumido durante mucho tiempo que la mayoría de los EVI eran el resultado de periodos de pobre adherencia a TARGA. Esta observación se ve reforzada por el hecho de que, cuando el clínico observa un EVI, interroga con más intensidad acerca de la adherencia, a lo que el paciente normalmente responde que ha olvidado alguna dosis. Inmediatamente se insiste en la adherencia del paciente y en el siguiente control se observa una normalización de la CV (476;515). Esto va a suponer por tanto un sesgo al prejuzgar una CV detectable como “signo” de pobre adherencia, pues es menos probable que se interroge a conciencia acerca de la adherencia a un paciente con CV indetectable, a pesar de que hay datos que sugieren que la mayoría de pacientes con CV

indetectable pierden alguna dosis de tratamiento (504). Sin embargo, en estudios en los que se ha estudiado con rigor tanto la adherencia como las concentraciones de los fármacos antirretrovirales (370;533;537) no se ha hallado asociación entre éstos y la presencia de EVI, excepto cuando las CV son de gran magnitud (más de 1000 copias) (533).

A este respecto, en nuestro estudio no se encontraron cambios en la notificación de autoadherencia asociados con los EVI. Aunque hay que considerar que en general la medición de la adherencia por cualquier método es imperfecta (543;544), los métodos de notificación de autoadherencia se han demostrado asociar a un buen control de la CV (541;542).

Merece mención especial el caso del paciente con número de randomización 8. Éste presentó CV progresivamente crecientes y de alto rango, asociadas a una notificación de disminución de la adherencia (adherencia referida del 75%), volviendo a la indetectabilidad tras aumentar el cumplimiento pero con una mutación M184V. En sentido estricto, el paciente partía de una CV indetectable (< 200 copias/mL) y volvió a la indetectabilidad (< 200 copias/mL) sin realizar cambios en el TARGA (se prescribió un cambio y la extracción de ese mismo día, no disponible hasta 15 días después de iniciar el nuevo tratamiento, mostró una CV nuevamente indetectable [< 200 copias/mL]), y por tanto podría considerarse EVI. Sin embargo, presentó dos características que la hacen diferente del resto de episodios que deberían considerarse EVI: llegó a ser de muy alto nivel (hasta 51.200 copias/mL) y se asoció a la aparición de una mutación, la M184V. Además, por el ensayo con límite de detectabilidad de 20 copias/mL no había vuelto a la indetectabilidad sin cambio en el TARGA (CV 88 copias/mL en el momento del cambio). Se han descrito otros casos en los que se han detectado virus resistentes y que posteriormente la CV volvió a ser indetectable (514;554), habiéndose justificado que el virus, aunque genéticamente resistente, podría ser fenotípicamente sensible a la combinación de fármacos (559;560).

Las diferentes formas de valoración de la frecuencia de EVI en nuestro estudio están acorde con los datos publicados en la literatura. Se halló una incidencia global de CV detectables de 0,07 eventos/determinación, es decir que el 7% de las determinaciones fueron

detectables, cuando los valores publicados oscilan entre un 3,6-9% de las determinaciones (370;512;531;551). Y cuando se valoraron únicamente los episodios que cumplían la definición de EVI, con una elevación de la CV por encima del límite de sensibilidad de forma transitoria, es decir, precedida y seguida de otra determinación de CV indetectable sin haber realizado cambios en el TARGA, teniendo en cuenta que un EVI podía incluir varias CV detectables consecutivas, se hallaron 7 episodios en los 26 pacientes, es decir, una tasa de incidencia de 26 episodios/100 pacientes/año. Aunque las tasas de incidencia se han mirado menos, las cifras publicadas oscilan entre 19,2 y 51,17 episodios/100 personas año (478;515;532;534). Sin embargo, esta incidencia dependerá del número de determinaciones que se realicen. Cuando éstas aumentan por un control más estricto, la probabilidad de hallar EVI aumenta.

Todos los EVI consistieron en una única determinación de CV detectable, excepto uno que constó de dos determinaciones, lo que está de acuerdo con los modelos matemáticos clásicos (512).

Los valores de la magnitud de los EVI (media, mediana y rango de 370,12, 320 y 210-631 copias/mL) también son similares a los publicados en la mayoría de trabajos, en los que la media es de 210 copias/mL (rango de medias 64-1153), aunque la mayoría de estudios tienen una media alrededor de 100 copias/mL (370;478;512;514;532;533;536;537;554), estando en el 70-80% de los casos por debajo de 400 copias/mL (478;515).

Respecto a la asociación de los EVI con cambios en el genotipado viral y posible aparición de resistencias, este ha sido uno de los puntos más controvertidos en la literatura sobre los EVI, pues aunque en diferentes trabajos se han asociado a la aparición de mutaciones de resistencia (514;532;554), en la mayoría de éstos el conocimiento de mutaciones preexistentes y/o la sensibilidad de los análisis genotípicos utilizados eran limitadas, y otros trabajos, algunos con métodos de genotipado ultrasensibles, no han hallado tal asociación (370;475;551). En nuestro caso, durante el periodo de tratamiento sólo dos pacientes presentaron un rebote de CV >1000 copias/mL, cifra necesaria para determinar el genotipado viral. Uno de ellos estaba sin TARGA, y el otro presentó una mutación M184V en un contexto probable de baja adherencia.

Del resto no se otuvieron genotipados durante el TARGA. Tras la interrupción, sólo se detectaron polimorfismos y dos pacientes con mutaciones, en un caso a efavirenz, que no había presentado previamente EVI y que muy probablemente estaba asociado a una mayor vida media de este fármaco en la retirada (197), en otro caso a D4T y AZT en un paciente que sí presentó EVI y que nunca había recibido estos fármacos. No se disponía de genotipado precarga para saber si estas mutaciones ya existían con anterioridad.

Aunque algún estudio ha relacionado la presencia de EVI con una mayor probabilidad de presentar fracaso virológico, sobre todo cuando son prolongados (479;532), en nuestro estudio, como en la mayoría, no encontramos tal asociación, pues, aunque el tiempo de seguimiento fue corto (12 meses), ninguno de los pacientes que presentó EVI fracasó durante los 12 meses de TARGA (475;477;478;514;533;534;537;537;554). Particularmente diferente es la situación del paciente que presentó VPBN, pues a diferencia de los EVI, promueven la selección de mutaciones de resistencia (567). El problema en los pacientes con VPBN es que a menudo, como en nuestro caso, tienen CV inferiores a 1000 copias/mL, y en estos niveles los métodos de detección de resistencias habituales no son precisos y presentan alta frecuencia de errores en la secuenciación (568). Pero cuando se utilizan métodos más precisos, se encuentra que el 57% de los pacientes con VPBN entre 50 y 400 copias/mL tienen mutaciones de resistencia (516), llegando hasta el 93% en los de VPBN con un límite superior de 1000 copias/mL en algún trabajo (563;569).

Uno de los aspectos más interesantes del análisis es el hecho que la presencia de EVI durante el TARGA se asoció a un mayor rebote de la CV, definido por una CV pico más elevada (5,33 vs 4,68 \log_{10} , $p = 0,022$), una CV más elevada en el mes 14 (4,85 vs 4,08 \log_{10} , $p = 0,005$) y un AUC de la CV tras la retirada mayor (13,51 vs 9,57, $p = 0,007$) (**Figura R.2.1.- R.2.2.** y **Tabla R.2.2.**). Hasta el momento, sólo un estudio observacional había estudiado la influencia de presentar EVI durante el TARGA en la evolución al suspender el tratamiento (550), y también halló que los pacientes que presentaban EVI (“*blippers*”) tenían un mayor rebote de CV a las 8 semanas de la interrupción (87.419 copias vs 12.252 copias, valores

similares a los obtenidos en nuestro caso), debiendo reiniciar antes el TARGA. Cabe destacar que en el estudio de Papasavvas y col la muestra era aún menor ($n = 16$, *blippers* = 7).

Aunque se podría pensar que este mayor rebote podría estar influenciado por la inclusión en el GD de los pacientes con VPBN y viremia detectable sin TARGA, incluso del paciente con EVI probablemente asociado a baja adherencia, cuando se excluyeron estos pacientes del análisis las diferencias se mantuvieron e incluso aumentaron. Cuando el análisis se realizó en los grupos vacunado o placebo por separado, también el grupo con EVI siempre fue el que presentó un mayor rebote viral (**Figuras y Tablas R.2.3.-R.2.4.**).

Debido a que el estudio se limitó a la valoración de la interrupción durante 6 meses, no es posible valorar si el mayor rebote tendría implicación en acortar una potencial interrupción de TARGA más prolongada o no. De hecho, las CV tendían a igualarse en los dos grupos cuando se acercaban al final del periodo, y en el mes 18 ya no existían diferencias significativas. No se puede asegurar que el GD no quedase posteriormente con una viremia en equilibrio superior y, en consecuencia, una peor evolución inmunológica. A este respecto, en el estudio de Papasavvas y col. (550), los pacientes que habían presentado EVI debían reiniciar antes el TARGA por mayor deterioro inmunológico. Este aspecto también podría tener relevancia en el caso de seleccionar pacientes para hacer interrupciones guiadas por diferentes motivos, de modo que aquellos siempre indetectables podrían tener una interrupción guiada por criterios virológicos e inmunológicos más prolongada.

El mayor rebote que experimentaron los pacientes que presentaron EVI podría justificarse por dos posibles causas (o una combinación de las mismas), que justificarían asimismo la presencia de los EVI:

- Un virus más agresivo. El VIH que presentase una mayor capacidad de replicación o una mejor capacidad de escapar, podría ser más difícil de controlar con el TARGA y dar lugar, por un lado a EVI, y por otro lado a un mayor rebote tras su retirada. Los trabajos que encuentran asociación entre los EVI y la CV al inicio del TARGA, o con el tiempo necesario para lograr la indetectabilidad (475;475;512;532;770), apoyan esta idea.

- Un sistema inmunitario menos eficaz. Ante virus con igual virulencia, pacientes que tuviesen menor capacidad de control virológico por los diferentes mecanismos antivirales (respuesta celular, humoral, factores solubles...), fuese por predisposición genética o por una mayor afectación del sistema inmunitario previa al TARGA, podrían ser los que presentasen EVI por peor control virológico durante el TARGA y un mayor rebote por el mismo motivo. Algunos autores han hallado una frecuencia de EVI inversamente relacionada con el recuento de linfocitos T CD4⁺ al inicio del tratamiento, sobre todo cuando el TARGA se inicia durante la primoinfección, sugiriendo factores específicos del huésped como determinantes de la frecuencia de estos episodios (512;534;770). Al tratar antes, el reservorio y la CV residual serían menores (83;770), y además, se preservarían en parte las respuestas inmunes CD4⁺ y CD8⁺ anti-VIH (538).

Los cambios en el sistema inmune que se observan en los pacientes con EVI y su influencia en el rebote de la CV tras la interrupción demuestran que estos episodios de CV \geq 200 copias/mL tienen trascendencia inmunológica y virológica, y no son simples variaciones aleatorias biológicas del paciente o del ensayo (370).

En cualquier caso, la ausencia de asociación de los EVI con el fracaso virológico (475;477;478;514;533;534;537;537;554) indica, probablemente, que el TARGA actual permite una buena supresión del virus que limita los efectos de estos EVI. Los trabajos de intensificación, en los que se intensifica el tratamiento introduciendo otro fármaco en pacientes que tenían una CV entre 5 y 50 copias/mL con TARGA y obtienen una reducción de la CV por debajo de 5 copias/mL (530) y a la vez un descenso en la frecuencia de los EVI (531), apoyan esta hipótesis.

Las consecuencias de los EVI a más largo plazo en pacientes bajo TARGA por tanto deberían ser evaluadas. Sería también interesante saber si estos pacientes responderán igual a futuras terapias inmunomediadas o vacunas terapéuticas pues, a priori, partirían con “desventaja” biológica.

Finalmente, como se comentó con anterioridad, las vacunaciones no se asociaron de forma significativa a un mayor rebote viral tras retirar el TARGA, a pesar de que provocaran una mayor activación linfocitaria durante el periodo de tratamiento. Cuando se compararon las evoluciones sin TARGA en aquellos pacientes que habían sido vacunados y presentaron CV detectables ($n = 7$) y los que ni habían sido vacunados y siempre estuvieron indetectables ($n = 5$), las diferencias en el rebote se magnificaron y fueron significativamente muy diferentes, a pesar de lo limitado de la muestra (**Figura y Tabla R.2.5.**). Esto podría indicar que, aunque la presencia de EVI se asocia a un mayor rebote y las vacunas por sí solas no provocan una peor evolución virológica tras la suspensión del TARGA, la asociación de estos dos fenómenos potencia la replicación viral durante la parada.

3.2.3. *EVI y sistema inmune*

Nuestro estudio halló una asociación de los EVI con cambios en el sistema inmune, de forma que, ya basalmente, el GD presentó un menor número fundamentalmente de linfocitos T CD4⁺ totales, CD4⁺ *naïve* (CD45RA⁺RO⁻ y CD45RA⁺CD62L⁺) y CD8⁺CD38⁺. Por el contrario, el GD presentó mayor proporción de linfocitos T CD8⁺ y de respuestas CD8⁺ específicas. Teniendo en cuenta que los factores epidemiológicos y los relacionados con la infección por el VIH eran similares entre el GD y el GI, estas diferencias basales estarían relacionadas por tanto a la presencia de EVI.

Durante el tratamiento, estas diferencias basales se mantuvieron y se añadieron otras como el aumento de la población CD4⁺CD38⁺HLADR⁺.

El descenso de los linfocitos T CD4⁺ en los pacientes con EVI ya había sido descrito con anterioridad (532;536;537), aunque en algún trabajo se habían incluso descrito mayores ganancias en estos pacientes que en los indetectables (478). También se habían asociado los EVI con una disminución en las células *naïve* CD4⁺ y CD8⁺ activadas (CD45RA⁺CD62L⁺) de forma proporcional a las elevaciones de la CV, con un incremento en las concentraciones de linfocitos T CD4⁺CD45RA⁻CD28⁻ (efectores) y del ADN proviral (532;536;537).

También se ha descrito que mayores niveles de activación ($CD4^+HLA^+DR^+$) son predictivos de un mayor riesgo de EVI (536), sugiriendo que estas células tienen mayor potencial para ser infectadas y proliferar y/o menor capacidad citotóxica. Aunque en nuestro estudio las subpoblaciones T $CD4^+CD28^+$ y los $CD4^+CD38^+HLADR^+$ presentaron tendencia a ser mayores durante el tratamiento en el GD, otros como los $CD4^+CD38^+$ y los $CD8^+CD28^+$ no se modificaron. Cabe la posibilidad de que la intervención vacunal cambiase el patrón espontáneo de estas subpoblaciones celulares al aumentar la activación, dificultando la interpretación. De hecho, cuando el análisis se limitó sólo al GP, no se observaron diferencias significativas, pero el tamaño muestral se limitó a 13 pacientes, con reducción del poder estadístico. Otros trabajos tampoco hallaron cambios en estas subpoblaciones linfocitarias asociados a los EVI (550).

El GD presentó, en general, mayores respuestas $CD8^+$ específicas anti-VIH (totales, p24, gag,...), diferencia que se mantuvo durante todo el periodo de tratamiento. Que los pacientes con EVI presentan niveles significativamente mayores en magnitud y amplitud de respuestas $CD8^+$ VIH-específicas que los pacientes con CV persistentemente indetectable, sobre todo en el mismo momento del EVI, ya había sido descrito por otros autores con anterioridad, confirmándose en nuestro estudio (528;550;555). Sin embargo, estos mismos autores también habían hallado un aumento en las respuestas $CD4^+$ que no hallamos en nuestro caso: no se observó en el GD un aumento en las respuestas linfoproliferativas frente al VIH en particular, ni frente a otros activadores en general, a diferencia de los hallazgos encontrados cuando se valoró al GV.

Estos cambios en el sistema inmune asociados a los EVI que hallamos en nuestra cohorte pueden ser interpretados en dos sentidos diferentes, bien como que estas alteraciones son consecuencia de la exposición del sistema inmune a una replicación viral de bajo nivel; o bien que alteraciones del sistema inmune provocan un peor control de la replicación viral que se manifiesta en forma de EVI. En cualquier caso no se pueden justificar interpretando el EVI como un artefacto de laboratorio o debido a una aleatoriedad biológica (370). Probablemente, estos EVI proceden de la activación de células infectadas antes del inicio del TARGA y que se

encuentran en reposo o latentes, con el ADN proviral integrado en su genoma, y que por motivos no aclarados se activen (lo que podría explicar el aumento de la proporción de linfocitos T CD4⁺ con marcadores de activación) y liberen virus (78;525-527). En estas circunstancias, el virus que aparece es el salvaje (*wild type*) o el previo al tratamiento que lo hizo indetectable, y aunque el TARGA no podría inhibir la producción de estos viriones, sí lo haría sobre sus ciclos subsiguientes de replicación, y por tanto estos viriones no serían infectivos para nuevas células, con lo que no se generarían virus resistentes (no hallamos mutaciones en nuestro estudio) y no existiría un aumento del riesgo de fracaso. Sin embargo, sí serían capaces de estimular las respuestas específicas anti-VIH, que aumentarían como en nuestro caso (538).

Otra posibilidad sería que el aumento en el ARN plasmático del VIH fuese consecuencia de una disminución de la inhibición de su replicación, resultado de concentraciones insuficientes de los fármacos antirretrovirales por diferentes circunstancias: adherencia intermitente, alteraciones transitorias en la absorción, interacciones con otros fármacos... En este caso, al estar coexistiendo virus con capacidad replicativa y fármacos a niveles no supresivos, sí se podrían generar mutaciones nuevas y adquirir virus resistentes. O bien que la replicación provenga de lugares en los que el TARGA no penetre de forma efectiva, de los “santuarios virales”. En este caso, la penetración puede ser lo suficientemente inefectiva como para que no se produzca una presión farmacológica selectiva y el virus resultante también sería sensible, sin mutaciones de resistencia (485-489). Este origen explicaría la disminución de los EVI con las estrategias de intensificación del TARGA (530;531).

La ausencia de elevación en las respuestas CD4⁺ VIH específicas a pesar del aumento de las CD8⁺ podría explicarse por el hecho que, al activarse, los linfocitos T CD4⁺ son más susceptibles a la infección (11;271-273), sobre todo los específicos anti-VIH (28), y de existir replicación podría existir una depleción generalizada, que podría explicar el descenso en los linfocitos T CD4⁺ totales, y clonal, que explicaría la ausencia de respuestas CD4⁺ VIH-específicas (784).

Tras la interrupción del TARGA, el GD no sólo presentó un mayor rebote virológico, sino que el sistema inmune también evolucionó de forma diferente, fundamentalmente en los cambios precoces (meses 12-14). De este modo, los linfocitos T CD4⁺, el cociente CD4⁺/CD8⁺ y los CD8⁺CD28⁺, aunque disminuyeron en los dos grupos, lo hicieron de forma mayor y más precoz en el GD, y aunque con posterioridad tendieran a igualarse las pérdidas a lo largo de los 6 meses, el GD mantuvo cifras inferiores. Y los linfocitos T con marcadores de activación (CD4⁺CD38⁺, CD4⁺CD38⁺HLADR⁺, CD8⁺CD38⁺, CD8⁺CD38⁺HLADR⁺ y CD8⁺CCR5⁺) presentaron la tendencia contraria, aumentando en los dos grupos, pero más y más precozmente en el GD. También la proliferación de las células *naïve* aumentó más en el GD tras la interrupción, a pesar de lo cual no aumentaron en proporción sino que incluso las CD8⁺ descendieron, sugiriendo una mayor afectación de este compartimiento en el GD.

Por lo que respecta a las respuestas celulares frente al VIH, las CD8⁺ específicas se mantuvieron en el GD tras la interrupción, y aumentaron en el GI hasta alcanzar niveles similares, mientras que las respuestas linfoproliferativas CD4⁺ aumentaron más en el grupo que había presentado EVI. A diferencia de éstas últimas, las respuestas linfoproliferativas a mitógenos aumentaron más en el GI.

Estos cambios tras la interrupción coinciden con los descritos por el único trabajo que hasta la fecha ha valorado el efecto de los EVI sobre los parámetros virológicos e inmunológicos tras una interrupción del TARGA (550). Papasavvas y col. observaron a las 4 semanas de la interrupción un aumento significativo en la frecuencia de células CD3⁺HLADR⁺ y CD8⁺ memoria y activadas (CD8⁺CD45RO⁺CD45RA⁻, CD8⁺HLADR⁺) y un descenso significativo en las CD8⁺ *naïve* y con expresión de CD28 (CD8⁺CD62L⁺/CD45RA⁺, CD8⁺CD28⁺). Y también son similares a los descritos en los trabajos de interrupciones estructuradas del tratamiento. Recientemente, se ha publicado un trabajo de nuestro grupo (760) donde se observa que los cambios precoces tras la interrupción definitiva del STI, tanto en las subpoblaciones celulares como en las respuestas linfoproliferativas, son similares a los hallados en estos pacientes. Otros trabajos previos ya habían descrito el aumento en las respuestas linfoproliferativas frente al VIH en estrategias de STI o interrupciones transitorias (195;791).

En general, los cambios en las subpoblaciones linfocitarias podrían reflejar un estado de maduración celular mayor en el GD, resultante de la estimulación antigénica repetida frente al VIH durante los EVI (792). Así, un descenso en las células CD8⁺CD28⁺ se ha observado en los estadios tempranos de la infección por el VIH, indicando una función inmunológica defectuosa (793;794).

Si los cambios en las respuestas linfoproliferativas y las subpoblaciones celulares tras la interrupción son consecuencia de los EVI previos y/o del mayor rebote tras la interrupción, o bien son causa de ambos al indicar un mayor número de células diana y por tanto una facilitación de la replicación viral, es algo que no es posible asegurar.

Un aspecto importante a destacar es que, a pesar de que el GD presentó durante el periodo de TARGA mayores respuestas CD8⁺ específicas frente al VIH, y tras la interrupción las mantuvo y aumentaron las CD4⁺, esto no se asoció con un mejor control de la replicación viral sin TARGA sino todo lo contrario, el rebote fue significativamente mayor. Diferentes trabajos en progresores lentos o no progresores hacían pensar que el aumento de estas respuestas específicas se debería asociar a un mejor control de la CV si se diese en pacientes progresores normales bajo TARGA (55;100;206), ya sea al potenciar la proliferación de respuestas CTL (67) o a través de su propia actividad antiviral (68). Sin embargo, los resultados de este estudio, en el que ni las respuestas específicas CD8⁺ ni CD4⁺ se correlacionaron con un mejor control de la CV, ni los ensayos de STI, ni otros trabajos similares (550) han hallado un mejor control asociado a estas respuestas. Este resultado aparentemente paradójico puede explicarse por factores dependientes de los pacientes, como disfunciones acompañantes en la respuesta inmune natural (782;783), depleción clonal (784) o alteración de las células CD8⁺ (39); o bien por factores virológicos, como el escape viral con variantes incapaces de ser reconocidas por el repertorio linfocitario T previamente establecido (71) y que pueden hacer que los péptidos presentados *in vitro* y los presentes *in vivo* sean diferentes. Resulta interesante además ver que el aumento en las respuestas CD8⁺ y CD4⁺ no está “sincronizado”, lo que podría reflejar una disfunción en la respuesta inmune.

Estos hallazgos podrían tener implicaciones en el manejo de los pacientes infectados por el VIH. Por un lado, deberían realizarse estudios prospectivos que confirmasen si realmente los EVI se asocian a un menor incremento de linfocitos T CD4⁺ con TARGA, y éste con una peor evolución clínica. Si esto fuese así, hallar EVI en el control rutinario de los pacientes debería provocar una intensificación en el tratamiento antiretroviral o, mejor, una optimización, de forma que disminuyeran o desaparecieran estos EVI. En este sentido existen dos trabajos en los cuales se observó que cuando se intensifica el tratamiento en pacientes que tienen una CV con TARGA entre 5 y 50 copias/mL, la CV se podía disminuir por debajo de 5 copias/mL al introducir otro fármaco (530), lo que daba lugar a un descenso en la frecuencia de EVI (531).

Por otro lado, si progresan las estrategias de interrupción de tratamiento, o en el caso de interrupciones por cualquier causa, cabría valorar que el presentar EVI supone un mayor riesgo de presentar un mayor rebote y una mayor depleción de linfocitos T CD4⁺, y por tanto serían pacientes en los que la interrupción sería más corta.

3.2.4. EVI, función tímica y sistema IL-7/IL-7R

El único trabajo que ha valorado hasta la fecha la influencia de los EVI sobre el timo (550) halló que los pacientes con EVI tenían mayor cantidad de *TRECs* de forma significativa que los que no tenían EVI, aunque no le dio ningún valor por la ausencia de diferencias basales, la pequeña magnitud del cambio en esa variable y la ausencia de cambios asociados en las subpoblaciones celulares T.

En nuestro estudio no se hallaron estas diferencias sino incluso un menor número de *TRECs*/μL y, sobre todo, *TRECs*/CMSP durante los periodos de TARGA e interrupción en el GD (**Figura R.2.19.** y **Tablas R.2.17.-R.2.18.**). Esto, junto a valores también inferiores en las células *naïve* podrían sugerir una menor función tímica en estos pacientes, que podría ser resultante de una mayor replicación viral que estuviese afectando al timo (42-47).

Sin embargo, se halló un aumento en la proliferación (identificado por el marcador Ki-67) de las células *naïve* tanto CD4⁺ como CD8⁺ en el GD durante el tratamiento y la interrupción, lo que podría justificar la disminución de los *TRECs* por dilución (597) (**Figura**

R.2.14.) Y también se observó un mayor volumen tímico en el GD según el método volumétrico que utilizamos y que ha sido validado con anterioridad en diversos trabajos como buen marcador de función tímica (576;577). Aunque cabe decir que no toda imagen sugestiva de timo por TC significa timopoyesis activa, y la grasa mediastínica no es siempre fácil de distinguir del tejido tímico (46), estos dos últimos resultados sugerirían que la función tímica no estaría alterada en los pacientes con EVI, o incluso aumentada. Una posible explicación es que el timo actuase de reservorio de replicación viral, de forma que aquellos pacientes que presentan un mayor timo en el momento de la infección son aquellos que se asociarían a una mayor replicación subyacente y a una mayor probabilidad de EVI. En este sentido, recientemente se ha descrito que el volumen basal se correlacionaba directamente con el rebote de la CV tras la interrupción y se proponía que un timo más funcional podría ser un sustrato de la replicación viral en sí mismo o que fuese una fuente de nuevas células T CD4⁺ diana para la infección y replicación viral (626). En este trabajo no se hizo una búsqueda específica de los EVI y podría ser que, en el fondo, el volumen tímico fuese un marcador asociado a los EVI y éstos al rebote viral. Otra posible explicación sería que el timo aumenta en estos pacientes para compensar las pérdidas en las células *naïve* que tienen los pacientes del GD como se comentó con anterioridad. Sin embargo, no se hallaron correlaciones entre el volumen tímico y las poblaciones *naïve* en ninguno de los grupos ($p > 0,1$), posiblemente por predominar un componente de expansión periférica.

Finalmente, aunque no se encontraron grandes diferencias en la evolución de las concentraciones de IL-7 durante los periodos de tratamiento e interrupción entre el GD y GI, sí se halló una mayor expresión del IL-7R en las células memoria, tanto CD4⁺ como CD8⁺, tras la interrupción (**Figura R.2.20.** y **Tablas R.2.17.-R.2.18.**). Se ha descrito, en el contexto de la infección por el VIH, un descenso en la expresión de estos receptores (y por tanto una disminución de su sensibilidad a la IL-7) en los linfocitos T tanto CD8⁺ (728;729) como CD4⁺ (734), sobre todo *naïve*, asociado a su activación. Pero el IL-7R se re-expresaría o persistiría expresado al final de la fase de expansión en las células efectoras (692). Aunque los marcajes

fenotípicos utilizados en nuestro estudio no permiten hacer una clara distinción entre las subpoblaciones *naïve* y efectora, lo que podría reflejar es la mayor maduración linfocitaria en la población de EVI consecuencia de la mayor exposición antigénica.

3.2.5. EVI y respuesta a antígenos vacunales

Se analizó si la presencia de CV detectables por encima de 200 copias/mL influía en la respuesta humoral y celular a antígenos vacunales, tanto desde el punto de vista basal, como tras la vacunación, como en la evolución de estas respuestas tras la interrupción de tratamiento.

Sólo se hallaron diferencias basalmente en la respuesta humoral, fundamentalmente cuantitativa. Los antígenos cuya respuesta pudo ser evaluada de esta forma (VHA, VHB, rubéola, neumococo y tétanos) mostraron en general menores títulos de anticuerpos en el GD. Dicha alteración podría estar en relación al menor número de linfocitos T CD4⁺ en el GD, pues tanto la respuesta celular como la humoral a los antígenos vacunales se ha descrito estar inversamente relacionada con el número de linfocitos T CD4⁺ de los pacientes, de forma que mientras que los infectados recientemente por el VIH muestran respuestas intensas a vacunas, comparables a las de los pacientes sanos (260;261), las respuestas empeoran con el estadio de la infección y el nadir de linfocitos T CD4⁺, (262-266), pudiendo mejorar, tanto la respuesta humoral como la celular, con la recuperación inmune inducida por el TARGA (82;267-269).

La ausencia de diferencias basales en las respuestas celulares y en los cambios durante el tratamiento y tras la interrupción en las respuestas celulares y humorales (**Figuras R.2.21-R.2.37.** y **Tablas R.2.21.-R.2.30.**) podría obedecer a los problemas técnicos comentados en el apartado **2.2.5.** de esta **Discusión.** Además, aunque el 50% de los pacientes en cada grupo (GD y GI) recibió vacunaciones, como el GI era más numeroso (n = 16), más pacientes en este grupo (8) recibieron vacunaciones que en el GD (n = 10, y por tanto 5 pacientes de este grupo recibieron vacunaciones), lo que podría influir en los resultados.

3.3. Subestudio A2: Estudio de la influencia de episodios de carga viral detectable ≥ 20 copias/mL sobre el sistema inmunitario y el rebote de la carga viral durante el TARGA y tras su interrupción. Diferencias con los episodios ≥ 200 copias.

Cuando se repitió el análisis de las CV con un ensayo cuyo límite inferior de detección estaba por debajo de 20 copias/mL se produjo una detección de CV entre 20 y 200 copias/mL en determinaciones que anteriormente eran consideradas indetectables. Esto ocurrió concretamente en 28 determinaciones, 4 de las cuales resultaron superiores a 200 copias/mL. Y supuso considerar detectables a 4 pacientes que anteriormente estaban incluidos en el GI. Los valores hallados siguieron estando acorde con los publicados en la literatura al respecto (370;512;531;551).

Aunque aumentaron algunas de las diferencias entre grupos en los parámetros generales, inmunológicos, y virológicos respecto al análisis realizado con límite inferior de 200 copias/mL, como las diferencias basales respecto al sexo y la utilización de IP, o la presencia de un menor nadir de linfocitos T CD4⁺ entre los pacientes detectables, en general se produjo una disminución de las diferencias entre el grupo que presentó CV detectables y el grupo que se mantuvo indetectable (**Tabla R.2.31.**). Esta disminución de las diferencias apareció tanto en las subpoblaciones linfocitarias, en las respuestas linfoproliferativas, sobre todo a p24, en las respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH, en los parámetros de función tímica, en los parámetros del sistema IL-7/IL-7R y en las respuestas a antígenos vacunales (**Figuras R.2.41.-R.2.71. y Tablas R.2.35.-R.2.59.**).

Esta disminución de las diferencias también ocurrió de forma sintomática en el rebote viral (**Figuras R.2.38.-R.2.39. y Tabla R.2.32.**). Así, aunque tras la interrupción del TARGA el GD₂₀ tuvo un mayor rebote que el GI₂₀, a diferencia de lo que ocurría en el análisis para ≥ 200 copias/mL ninguna de las variables que usamos para definir el rebote fue estadísticamente diferente entre los grupos. Cuando se analizaron los resultados con otras cifras de detectabilidad entre 20 y 200 copias/mL, los resultados fueron intermedios, siempre con menor significación estadística (**Tabla R.2.33.**). Y de hecho, los pacientes que presentaron EVI entre 20 y 200

copias/mL presentaron un rebote viral menor que incluso los pacientes con CV indetectables (**Tabla R.2.34.**).

La interpretación de estos resultados puede ser diversa. Por un lado, podría ocurrir que los pacientes con EVI entre 20 y 200 copias/mL fuesen los que realmente tuviesen las ventajas de una exposición controlada al virus, es decir, una replicación de muy bajo nivel que fuese el estímulo antigénico necesario para aumentar las respuestas específicas, pero sin las desventajas de una mayor activación que podría inducir una mayor capacidad replicativa (538). Sin embargo, no se observó un mayor aumento en las respuestas específicas anti-VIH CD8⁺ o CD4⁺, sino más bien el efecto contrario.

Otra posibilidad es que los EVI de estos pacientes no fuesen viremias “reales”, sino que representasen variabilidad de la técnica o variabilidad biológica. Diferentes estudios demuestran que analizando una misma extracción por laboratorios diferentes, incluso con la misma técnica, el nivel de concordancia en la determinación de la CV es pobre, hasta un coeficiente kappa del 4,4%, y variaciones inter e intra-ensayo del 35,4 y 40% respectivamente (370;517-519). Además, las técnicas de CV cuantitativas tienen limitaciones de precisión, sobre todo a bajos niveles de replicación del VIH (795), habiéndose encontrado ARN falsamente positivo en un 2-3% de los ensayos (520). De hecho, en nuestro estudio 4 de las determinaciones realizadas con el ensayo de detección con límite inferior de 20 copias/mL dieron un resultado > 200 copias/mL (media 235,25 copias/mL, rango 208-285 copias/mL), lo que reflejaría esta variabilidad. De este modo, se podrían estar incluyendo en el análisis pacientes que no tienen una elevación “real” de la viremia y en este sentido serían inmunológica y virológicamente iguales que los pacientes indetectables. Probablemente aquí se podría incluir el paciente 21, que presentó una CV aislada en el mes 3 de 22 copias/mL. Pero posiblemente no todas las determinaciones detectables de CV entre 20-200 copias/mL puedan explicarse de este modo. Se ha publicado que a menudo determinados pacientes acumulan EVI mientras que otros permanecen siempre indetectables. Este sería el caso por ejemplo del paciente número 7, que presentó hasta 5 determinaciones de CV detectable y sólo una de ellas >100 copias/mL. Modelos matemáticos afirman que la

variabilidad de frecuencias entre diferentes pacientes no se puede explicar asumiendo la distribución de probabilidades común como sería de esperar si fuesen simplemente variaciones del ensayo (521).

Pese a todo, cabe decir que pacientes entre 20 y 200 copias/mL en nuestro estudio sólo fueron 4, de los cuales uno fue *exitus* y por tanto no pudo ser analizado su rebote. Esto hace que cualquier interpretación de los resultados que hagan referencia únicamente a estos 3 pacientes ha de tomarse con gran precaución y necesitaría de un mayor número de pacientes para confirmarse, tanto los aspectos virológicos como inmunológicos.

4. SUBESTUDIO B: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TÍMICA Y EL SISTEMA IL-7/IL-7R TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)

4.1. Introducción

Aprovechando las determinaciones realizadas para la valoración de la función tímica, viendo que no existían diferencias significativas en los parámetros de función tímica tras la interrupción independientemente del grupo de estudio que hablemos y dado que la literatura acerca de la influencia de las interrupciones de tratamiento sobre el timo y el sistema IL-7/IL-7R es escasa, se realizó un análisis de la influencia de la interrupción sobre estos dos aspectos, incluyendo todos los pacientes de la cohorte.

Como en el caso del subestudio A, cabe aclarar que el cálculo del tamaño muestral no fue calculado para valorar exactamente la influencia de la interrupción del TARGA sobre el timo o el sistema IL-7/ IL-7R.

4.2. Efecto de la interrupción terapéutica sobre la función tímica

Si tal como se ha descrito el VIH afecta el tejido tímico (42-47), la interrupción del TARGA y el rebote viral subsiguiente podrían afectar su función. Hasta la fecha, el efecto de las interrupciones de tratamiento sobre la función tímica ha sido poco estudiado. Dos trabajos recientes del mismo grupo de investigación (Dr M. Leal y col., en Sevilla) han demostrado la existencia de una correlación entre el volumen basal tímico con la evolución virológica e inmunológica tras la suspensión del tratamiento (626;627). En el primero de ellos se encontró que, aunque sólo al inicio de la interrupción (semana 4), el volumen basal tímico (y no los *TRECs*) se correlacionaron directamente con la CV e inversamente con los cambios en los linfocitos T CD4⁺, sugiriendo que un timo más funcional podría ser un sustrato de la replicación viral en sí mismo, o que fuese una fuente de nuevas células T CD4⁺ diana para la infección y replicación viral (626). En el segundo se describió el volumen tímico como predictor de la

pérdida de linfocitos T CD4⁺ tras la interrupción, de forma que pacientes con volúmenes tímicos mayores (> 5,6 cm³) presentaban un menor descenso en las cifras de linfocitos T CD4⁺ tras la suspensión, tardando más tiempo en alcanzar un nivel de 350 linfocitos T CD4⁺/mm³, sucediendo lo contrario en aquellos pacientes con volúmenes tímicos menores (627). Sí que existen trabajos que valoran el efecto de la infección aguda por el VIH sobre el timo o de la timectomía sobre el sistema inmune, pero aunque se puede pensar *a priori* que el efecto pueda ser similar, no existen evidencias que lo apoyen.

Para el estudio del timo utilizamos los tres principales marcadores descritos en la literatura: las copias de *TRECs*, la medición del tejido tímico mediante TC y las poblaciones *naïve* CD4⁺ y CD8⁺.

Aunque los resultados obtenidos sugieren un cierto papel de la función tímica tras la interrupción, la complejidad de los fenómenos de muerte, proliferación y redistribución linfocitaria que tienen lugar tras la suspensión del TARGA hacen que su interpretación sea difícil.

Tras la interrupción se produjo un descenso significativo en las copias de *TRECs*, tanto las medidas por μL como en relación al número de células (**Figura R.3.1. y Tabla R.3.1.**). Las determinaciones realizadas en los meses 12, 15 y 18 nos permitieron observar que el descenso no fue continuo sino que, como ocurrió con la mayoría de subpoblaciones celulares, los principales cambios se dieron en los primeros tres meses. Posteriormente, lo que se suele observar en todas las variables es una estabilización, como en un intento homeostático del organismo de volver a la “normalidad”. De este modo, se observó hasta el mes 15 un descenso significativo de las copias de *TRECs*/ μL y *TRECs*/10⁶ CMSP, más marcado para las primeras, que cayeron un 67% en este periodo, mientras que las copias de *TRECs*/10⁶ CMSP lo hicieron la mitad, un 31,95%. Esta disminución en las copias de *TRECs* coincide con los datos publicados por Douek y col. en el único trabajo que hasta la fecha valora la influencia de la interrupción sobre este marcador (608), y de hecho es probablemente lo que ocurre tras la infección inicial, y hace que los niveles de *TRECs* en los pacientes con infección por VIH sin TARGA estén disminuidos (86). Sin embargo, asegurar que este descenso es debido a una alteración en la

función tímica es complejo. Modelos animales y en humanos han demostrado que tras una timectomía el descenso en las copias de *TRECs* no se produce hasta pasadas 12-20 semanas (571;610), de forma que disminuciones antes de este periodo serían con más probabilidad atribuibles a fenómenos de dilución por aumento en la proliferación. De hecho, la proliferación *naïve* en nuestros pacientes durante este periodo fue muy elevada, como indica el aumento de las poblaciones Ki-67 positivas. El descenso en las copias de *TRECs*/10⁶ CMSP sería menor que en los *TRECs*/μL porque al aumentar la destrucción celular su disminución se relativizaría.

Otra posible explicación de este descenso son los fenómenos de redistribución. Se ha descrito que cuando se inicia el TARGA se producen aumentos en los *TRECs* en sangre periférica, pero disminuyen a nivel linfático (191). Se sabe que las células *naïve* portadoras de *TRECs* pueden migrar preferentemente al tejido linfoide (87;582;599;796;797). Tras la interrupción, con el aumento de la CV, se podría producir por tanto un atrapamiento preferencial de estas células a nivel linfático.

Por último, lógicamente no se puede descartar que parte de este descenso sea por disminución real de la función tímica. Apoyando este punto, en nuestro estudio hallamos un descenso del tejido tímico (tanto por volumen como por índice) entre los meses 12 y 18, aunque no llegó a ser significativo.

Las variaciones de las poblaciones *naïve* en este periodo fueron importantes y diferentes según la población (**Figura R.3.2.** y **Tabla R.3.1.**). Debido a los fenómenos de proliferación, redistribución y muerte celular, posiblemente en esta situación no son un buen marcador de ETR y no ayudan a desvelar si el timo se afecta y juega un papel en la depleción linfocitaria tras la interrupción. Mientras que los linfocitos T CD4⁺ *naïve* se mantuvieron durante este periodo inicial, asociados a un aumento en la proliferación, los CD8⁺ *naïve*, que también aumentaron su proliferación, descendieron bruscamente, probablemente reflejando un aumento en la maduración y un cambio hacia el fenotipo memoria. Estos cambios en estas subpoblaciones son los que se hallan también en otros estudios de interrupción (760).

La evolución de estos parámetros a partir del mes 15 tiene una interpretación todavía más complicada. Se produce entonces un aumento en las copias de *TRECs*, proporcionalmente

mayor para los *TRECs*/μL, aunque sin llegar a alcanzar en el mes 18 los niveles previos a la parada (siendo para los *TRECs*/μL un 48,9% menor y para los *TRECs*/10⁶ CMSP un 17,3% menor). Este cambio en la tendencia de los *TRECs* se acompañó de una disminución de la proliferación en las poblaciones *naïve* tanto CD4⁺ como CD8⁺, con un aumento entre las primeras y una estabilización de las segundas.

El hecho de que exista una disminución en la proliferación podría justificar una estabilización en las copias de *TRECs*, que no descendiesen más, pero no un aumento. Este aumento se puede explicar nuevamente por diferentes situaciones, no necesariamente excluyentes. Por un lado, lo más intuitivo sería pensar en un aumento en la función tímica, que también explicaría el aumento en los linfocitos T CD4⁺ *naïve*. De hecho esta es una posibilidad que no se puede descartar. Pero existen estudios con hallazgos similares sin implicación tímica, como algunos en los que se han hallado células con fenotipo *naïve* y *TRECs* elevados en pacientes con poco timo radiológico (616) o incluso aumentos de linfocitos T *naïve* en pacientes con infección por el VIH timectomizados (46). Por otro lado, podría existir una pérdida preferencial de las células no portadoras de *TRECs* o una mayor supervivencia de las portadoras, lo que haría aumentar proporcionalmente a estas últimas. También cabe la posibilidad de una maduración T extratímica por migración de células madre pluripotenciales desde la médula ósea a tejidos no tímicos (médula ósea, hígado, intestino, ganglios linfáticos mesentéricos y periféricos). O, finalmente, una redistribución de células *naïve* portadoras de *TRECs* desde los ganglios linfáticos a sangre periférica, como ocurre al iniciar el TARGA (618-621). En todos estos procedimientos interviene la IL-7. Su aumento tras la interrupción podría mediar cualquiera o varios de estos procesos.

Aunque el hecho de no hallar un aumento en el volumen tímico podría ir en contra de que realmente existiese un aumento de la función tímica en este periodo, podría haber ocurrido que al realizar sólo el estudio de imagen en los meses 12 y 18, si se hubiese producido un descenso inicial en el volumen tímico como ocurrió con los *TRECs*, no se hubiese detectado y lo que estaríamos viendo es la fase de recuperación, como si sólo hubiésemos realizado determinaciones de *TRECs* en los meses 12 y 18. Por otro lado, la imagen tímica por TC no deja

de ser una prueba relativamente poco sensible para pequeños cambios en el tejido, que sería lo esperable en tan poco tiempo. Quizás otras pruebas de función tímica como la tomografía por emisión de positrones, que puede identificar el tejido tímico metabólicamente activo por captación de F18-fluorodeoxiglucosa (606), pudieran confirmar tales hipótesis.

Finalmente, cuando se exploraron las correlaciones descritas recientemente en la literatura entre el volumen tímico y rebote de la CV (626), no se hallaron correlaciones significativas con ninguno de los valores de volumen tímico (en cm^3 o índice) y los parámetros virológicos del rebote ($p > 0,5$). Tampoco se halló correlación entre el volumen tímico y la caída de linfocitos T CD4^+ en los primeros 6 meses de parada, aunque cabe decir que los hallazgos de Pinelo y col. (627) evaluaban las 80 primeras semanas y en nuestro caso sólo se valoraron las primeras 24.

4.3. Efecto de la interrupción sobre el sistema IL-7/IL-7R

La interrupción del tratamiento y el consecuente rebote de la CV suponen un ataque frontal a la homeostasis inmunitaria en general y a la linfocitaria en particular. En general, en condiciones de salud, el tamaño del compartimiento de linfocitos T se mantiene estable a lo largo de la vida, a pesar de la producción tímica de nuevas células T y la expansión de las existentes tras su estimulación por antígenos durante las respuestas inmunes (635). Para ello, se cree que debe existir una regulación homeostática que provoque cambios en la timopoyesis y/o redistribución-expansión periférica, así como en la supervivencia de las células existentes, cuando sea preciso. Para esta homeostasis serían necesarios estímulos antigénicos, complejos del MHC y factores de crecimiento (636). Entre las citocinas y hormonas identificadas como posibles reguladores, la IL-7 parece jugar un papel esencial. Por ello estudiamos la influencia de la interrupción sobre ella y sobre la expresión de sus receptores en las células linfocitarias.

Observamos que tras la suspensión del TARGA se produjo un aumento de las concentraciones séricas de IL-7, fundamentalmente en los tres primeros meses, en los que se produjo el 62% del total del aumento hasta el mes 6, continuando el ascenso los tres meses siguientes pero con una menor pendiente (**Figura R.3.3.** y **Tabla R.3.2.**).

Por otro lado, el porcentaje de expresión del receptor de la IL-7 presentó una evolución diferente en función de las células CD4⁺ o CD8⁺. Los cambios más evidentes se dieron en los linfocitos T CD8⁺, donde se produjo un marcado descenso de la expresión del CD127 en la primera mitad del periodo (meses 12-15) tanto en las células CD45RA⁺ como CD45RO⁺, estabilizándose después hasta el mes 18. En el caso de los linfocitos T CD4⁺, el porcentaje de expresión del CD127 se mantuvo estable tanto en las células CD45RA⁺ como RO⁺ (**Figura R.3.3. y Tabla R.3.2.**).

Estos hallazgos son similares a los descritos tras la infección por el VIH, tanto en primoinfección como en pacientes crónicos. La IL-7 se eleva como respuesta homeostásica tras la infección de forma proporcional al descenso de linfocitos T CD4⁺, y con la normalización de las cifras linfocitarias con el TARGA se producen descensos proporcionales en la IL-7 plasmática (636;675;676). Sin embargo, el VIH también induce alteraciones en la regulación de la expresión del receptor de la IL-7 que se consideran claves en la disrupción de la homeostasis linfocitaria. Diferentes trabajos han demostrado una disminución del CD127 en los linfocitos T CD8⁺ de los pacientes infectados por el VIH, sobre todo en la población memoria y efectora (617;726;728-730;732;798). En los linfocitos T CD4⁺ también se produce un descenso, aunque proporcionalmente es menor (732). El hecho de que no se observe un claro descenso en la expresión del CD127 en los linfocitos T CD4⁺ de nuestros pacientes, podría obedecer a que estuviésemos evaluando un periodo temprano de la parada (24 semanas) y posteriormente podrían también acabar disminuyendo. Otra posibilidad es que la evolución de esta expresión en los linfocitos T CD4⁺ sea diferente en las interrupciones de tratamiento que en los pacientes que nunca han recibido tratamiento. De hecho, el TARGA aumenta la expresión del CD127 y la sensibilidad de las células portadoras a la IL-7 (729-732).

Cabe comentar que en nuestros pacientes los niveles de IL-7 en el mes 12 (mes de la interrupción) se correlacionaron de forma negativa con la magnitud del rebote, o lo que es lo mismo, que niveles más altos de IL-7 se asociaron a un menor rebote. Este hallazgo discrepa con las observaciones de múltiples trabajos que han demostrado que la IL-7 es capaz de inducir

de forma potente la replicación del VIH-1 *in vitro* a partir de cultivos de células infectadas de forma latente o en modelos animales (714-720) y hace las células *naïve* más susceptibles a la infección por el virus (719;721). Además se han correlacionado los niveles de IL-7 con la CV (680), la progresión de la enfermedad (722;723) y la aparición de cepas X4 más virulentas (700). Sin embargo, hasta la fecha no se había valorado el papel de la IL-7 en las interrupciones y este hallazgo podría tener relevancia como predictivo del rebote. Posteriormente se observó que existió una correlación negativa entre el aumento de IL-7 entre los meses 12-15 y la caída de linfocitos T CD4⁺ en ese periodo ($r = 0,54$; $p = 0,01$), es decir, que cuanto mayor fue el aumento de IL-7, menor fue la caída de linfocitos T CD4⁺ (**Figura R.3.4.**). El mecanismo por el que mayores niveles se asocian a un menor rebote no está claro. Podríamos pensar que tener niveles más bajos de IL-7 está reflejando una situación del sistema inmune más preservada y más normalizada (los niveles de IL-7 descienden con el TARGA) y una mayor capacidad de respuesta frente a la agresión del rebote viral, con una mayor elevación que resulta beneficiosa al inducir un aumento linfocitario (por proliferación y/o timopoyesis) y regular las respuestas linfocitarias. En este sentido, se ha visto que la IL-7 se eleva rápidamente tras la infección por SIV de los “*sooty mangabeys*” y que ésta podría jugar algún papel en la falta de progresión a la enfermedad de estos primates (712). Otra interpretación posible es que la IL-7 más baja es secundaria a unos niveles de linfocitos T CD4⁺ mayores, y éstos se asocian a mayor rebote viral al proporcionar más “dianas” al virus. De hecho, se estableció una correlación positiva entre la magnitud del rebote y los linfocitos T CD4⁺ en el mes 12: cuanto mayor fue el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en el mes 12, mayor fue la caída ($p = 0,007$, $r = -0,529$ en la correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en el mes 12 y el AUC entre los meses 12 y 18) y también con la ganancia de linfocitos T CD4⁺ desde el nadir hasta la interrupción ($p = 0,001$, $r = 0,615$).

5. SUBESTUDIO C: ESTUDIO DE LA RESPUESTA ADQUIRIDA A ANTÍGENOS VACUNALES TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TARGA (EN EL GLOBAL DE LA COHORTE)

El efecto que tiene la interrupción del tratamiento antirretroviral sobre las respuestas adquiridas a antígenos vacunales, tanto humoral como celular, no ha sido estudiado previamente. Lo que sí es conocido es que la respuesta vacunal de los pacientes infectados por el VIH se encuentra comprometida (253), tanto por alteración en la función celular B (254), como la T (255-257). La alteración en la respuesta antigénica está inversamente relacionada con el número de linfocitos T CD4⁺ del paciente, de forma que mientras que los seroconvertidores recientes al VIH muestran respuestas a vacunas comparables a las de pacientes seronegativos (260;261), las respuestas empeoran con el estadio de la infección por el VIH y el nadir de linfocitos T CD4⁺ (262-266), pudiendo mejorar la respuesta vacunal (tanto humoral como celular) con la recuperación inmune inducida por el TARGA (82;267-269). Además, la inmunidad vacunal no sólo es de menor magnitud sino también de menor duración, perdiéndose más rápidamente que en individuos sanos (270). Trabajos recientes han demostrado también menores títulos de anticuerpos frente a determinados antígenos en pacientes con infección por el VIH asociados a disfunción en las células B (786;799). Por todo ello, las alteraciones en el sistema inmune que causa la interrupción del TARGA podrían dar lugar a una pérdida mayor en las respuestas adquiridas a diferentes antígenos vacunales y variar su curso habitual. Por ejemplo, la interrupción podría provocar un descenso en el título de anticuerpos frente al VHB que, si fuese lo suficientemente importante, podría llegar a niveles no protectores.

Por este motivo, se analizó globalmente la evolución de la respuesta a los antígenos vacunales tras la retirada del TARGA. Se incluyeron para ello los 25 pacientes del estudio que interrumpieron el tratamiento (recordamos que 1 paciente fue pérdida de seguimiento en el mes 9 por *exitus*).

Las respuestas humorales cuantitativas mostraron en todos los casos en los que se pudo valorar (rubéola, neumococo, tétanos y difteria), excepto para el VHB y VHA, una pérdida de los títulos de anticuerpos en los 6 meses tras la interrupción, llegando incluso en algunos casos como en la rubéola o el neumococo a tener niveles inferiores a los presentes al inicio del estudio (mes 0). Desde el punto de vista cualitativo, también pudo observarse una disminución en el número de pacientes seropositivos, es decir seronegativizaciones o seroreversiones: 1 caso para VVZ, 3 casos para parotiditis, 2 casos para neumococo, 2 casos para tétanos y 4 casos para difteria, todos pacientes diferentes excepto en el caso de las serologías para tétanos y difteria, que dos de los pacientes negativizaron para ambos antígenos. No se produjeron seroreversiones sin embargo en las respuestas cualitativas frente a rubéola, sarampión, VHA o VHB (**Figuras R.4.1.-R.4.17. y Tablas R.4.1.-R.4.10.**).

Por el contrario, las respuestas celulares presentaron una tendencia a aumentar para todos los antígenos tras la interrupción, excepto en el caso del VHB.

Estos hallazgos en la respuesta humoral van a favor de recientes trabajos que encuentran en pacientes con infección aguda y crónica, pero no en sanos o infectados no progresores, disfunciones en las células B asociadas a una menor producción de anticuerpos tanto para antígenos T-dependientes como independientes (786). La interrupción estaría produciendo, por tanto, alteraciones en las células B memoria (directas e indirectas, a través de la alteración en las células T colaboradoras) que disminuirían la respuesta humoral. Este hallazgo es novedoso por no haberse descrito hasta la fecha, pues aunque se conoce para la infección sin tratamiento, no se había valorado en las interrupciones de pacientes bien controlados.

Teniendo en cuenta que diferentes estudios han sugerido que un compromiso de la respuesta B y/o bajos niveles de anticuerpos específicos podrían incrementar el riesgo de infecciones (365;799-801), es importante tener en cuenta esta disminución en las estrategias de interrupción. Así, los pacientes que fueran candidatos a una interrupción programada o que tuviesen que interrumpir el tratamiento por cualquier motivo, estarían aumentando el riesgo de sufrir infecciones frente a las que se consideraban protegidos, lo que podría además provocar

situaciones de disminución de la alerta por parte del paciente en las actitudes preventivas, como por parte del médico en las actitudes diagnósticas y terapéuticas. Deberían además plantearse posibles estrategias para disminuir el impacto de la interrupción sobre este aspecto. Así, los pacientes que fuesen a realizar una interrupción del TARGA, podrían recibir vacunaciones previamente con la idea de conseguir títulos mayores y, tras la interrupción, podrían requerir seguimiento serológico (o no) y, eventualmente, revacunar, posiblemente en tiempos inferiores a los recomendados en población sana o pacientes infectados bajo TARGA.

En cualquier caso, la disminución de títulos no se asoció siempre a una seroreversión. Pero también es cierto que el tiempo de interrupción fue corto. Mayores tiempos de parada podrían asociarse a una mayor pérdida de anticuerpos.

El no haber hallado descensos en las respuestas humorales para VHA y VHB podría estar más en relación a cuestiones técnicas que a un comportamiento diferente de estos antígenos. Recordemos que las mediciones cuantitativas para estas serologías tenían límites superiores de sensibilidad por encima de los cuales no pudimos saber si existió una disminución en el título de anticuerpos o no.

Al interpretar estos resultados también hay que tener en cuenta que los pacientes habían recibido previamente vacunaciones. Éstas aumentan el título de anticuerpos inicialmente y posteriormente descienden. El descenso en la interrupción podría ser debido a la disminución habitual de los anticuerpos tras la respuesta inicial. Sin embargo, la situación de equilibrio se suele alcanzar tras 2-3 meses de la vacunación, de forma que probablemente ya se había conseguido al interrumpir. Además, en algunos casos el título de anticuerpos en el mes 18 fue incluso inferior al del mes 0. Y por último, si lo que se estuviese viendo es la evolución hacia el equilibrio en los títulos de anticuerpos, no tendría que implicar seroreversiones.

También hay que tener en consideración que los estudios sobre eficacia vacunal se realizan en base a parámetros de respuesta inmune mesurables, como puede ser la producción de un determinado anticuerpo o el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad retardada. La

correlación entre estos parámetros y la eficacia clínica real se ha establecido en pacientes con una función inmune normal y se desconoce por tanto, en la mayoría de los casos, si los mismos parámetros pueden ser usados en pacientes con una inmunidad alterada. De hecho, hay pocos o ningún dato de la capacidad de la mayoría de las vacunas para realmente prevenir la infección o sus complicaciones en pacientes inmunodeprimidos, pues la incidencia de las infecciones prevenibles por vacunas es a menudo baja y, sobre todo, hay relativamente pocos pacientes con alteración de la inmunidad que hayan sido vacunados y estudiados.

Además, una respuesta inmune correcta no dependerá sólo de la cantidad de anticuerpos generados, sino también de variables cualitativas como su afinidad, avidéz y eficacia funcional (215). Y los pacientes con alteración de la inmunidad, incluídos los infectados por el VIH, pueden tener cualitativamente respuestas de anticuerpos diferentes de los huéspedes normales. Si añadimos que una alteración de la inmunidad celular o de la inmunidad no específica como la activación del complemento puede llevar a la inmunidad mediada por anticuerpos a ser inefectiva, uno no debería asumir que un determinado nivel de anticuerpos tiene la misma eficacia protectora en pacientes con y sin alteración de la inmunidad.

Por lo que respecta a los cambios en las respuestas celulares, el aumento generalizado que se detecta sugiere más una estimulación policlonal celular en el contexto de la interrupción, que no un aumento específico a cada antígeno. Como se ha comentado con anterioridad, las respuestas celulares frente a un antígeno en concreto pueden estimularse de forma colateral cuando se estimulan células específicas para otro antígeno, que en este caso sería el VIH (249). De este modo, cabría la posibilidad que las células memoria para p.ej, varicela, se estimulasen por la liberación de citocinas mediada por las células VIH-específicas al contactar con su antígeno. Se ha descrito que esta estimulación colateral no afectaría a las respuestas humorales, como ocurre en nuestro caso (249).

CONCLUSIONES

1. Un calendario vacunal que incluye vacunas habituales en la práctica clínica de los pacientes con infección por el VIH es seguro y no se asocia a efectos secundarios valorables.
2. Las vacunaciones en particular y un calendario vacunal en general no parecen asociarse a una mayor incidencia de CV detectables al mes de seguimiento (tanto ≥ 200 copias/mL como ≥ 20 copias/mL) cuando se administran a pacientes con infección por el VIH en estadios tempranos de la infección y con buen control con TARGA.
3. Estímulos inmunológicos repetidos en forma de vacunas producen un aumento de la activación linfocitaria.
4. Estímulos inmunológicos repetidos en forma de vacunas se asocian a una disminución en la proporción de linfocitos T CD4⁺.
5. Estímulos inmunológicos repetidos en forma de vacunas se asocian a un aumento en las respuestas linfoproliferativas CD4⁺ específicas frente al VIH.
6. Una estrategia de estimulación inmunológica repetida con vacunas no es efectiva en controlar la replicación viral tras la interrupción del TARGA.
7. Estímulos repetidos en forma de vacunas no se asocian a una peor evolución tras una interrupción del TARGA.
8. Estímulos inmunológicos repetidos en forma de vacunas no parecen afectar a la función tímica ni durante el TARGA ni tras su interrupción.

9. Las vacunas administradas dentro en un calendario vacunal presentan respuestas humorales adecuadas en los pacientes con infección por VIH bien controlados y en estadios tempranos de la infección.
10. La presencia de episodios de viremia intermitente (EVI) ≥ 200 copias/mL se asocia a un menor número de linfocitos T CD4⁺.
11. La presencia de EVI ≥ 200 copias/mL se asocia a un aumento en las respuestas específicas CD8⁺ anti-VIH.
12. La presencia de EVI ≥ 200 copias/mL se asocia a un mayor rebote viral tras la interrupción del TARGA.
13. Los EVI entre 20-200 copias/mL parecen tener una influencia sobre el sistema inmune y el VIH diferente de los EVI ≥ 200 copias/mL.
14. La interrupción del TARGA provoca cambios en los parámetros de función tímica sugestivos de afectar su función. Sin embargo no se puede descartar que los cambios sean debidos a cambios en la regulación linfocitaria periférica.
15. La interrupción del TARGA se asocia a una disminución de las respuestas humorales frente a antígenos vacunales, provocando incluso la seroreversión frente a determinados agentes.

BIBLIOGRAFÍA

-
- (1) Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981; 30(21):250-252.
 - (2) UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: December 2005. Consultable en www.unaids.org. 1-1-2006.
 - (3) van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. Nat Rev Immunol 2003; 3(9):697-709.
 - (4) Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. Cell 2000; 100(5):587-597.
 - (5) Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. Cell 1986; 47(3):333-348.
 - (6) Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. Science 1998; 280(5371):1884-1888.
 - (7) Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annu Rev Immunol 1999; 17:657-700.
 - (8) Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. Cell 1990; 61(2):213-222.
 - (9) Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. Science 1991; 254(5030):423-427.
 - (10) Alcami J, Lain dL, Folgueira L, Pedraza MA, Jacque JM, Bachelerie F et al. Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. EMBO J 1995; 14(7):1552-1560.
 - (11) Bermejo M, Sanchez-Palomino S, Usan L, Alcami J. Dynamics of HIV replication in lymphocytes and the efficacy of protease inhibitors. J Med Virol 2004; 73(4):502-507.

- (12) von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E et al. The protein network of HIV budding. *Cell* 2003; 114(6):701-713.
- (13) Derdeyn CA, Silvestri G. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(4):366-373.
- (14) Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; 340(21):1614-1622.
- (15) Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, Carville AC, Shvetz DE, Forand AE et al. Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2000; 74(23):11001-11007.
- (16) Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998; 280(5362):427-431.
- (17) Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. Vaginal CD4+ T cells express high levels of CCR5 and are rapidly depleted in simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2003; 187(5):769-776.
- (18) Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200(6):749-759.
- (19) Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200(6):761-770.
- (20) Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003; 77(21):11708-11717.

-
- (21) Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005; 434(7037):1093-1097.
- (22) Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y et al. Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells. *Nature* 2005; 434(7037):1148-1152.
- (23) McCune JM. The dynamics of CD4⁺ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001; 410(6831):974-979.
- (24) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373(6510):123-126.
- (25) Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373(6510):117-122.
- (26) Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997; 387(6629):188-191.
- (27) Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271(5255):1582-1586.
- (28) Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* 2002; 417(6884):95-98.
- (29) Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4⁺ T cells go out of stock. *Nat Immunol* 2000; 1(4):285-289.
- (30) Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4⁺ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 2002; 8(4):319-323.
- (31) Silvestri G, Feinberg MB. Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin Invest* 2003; 112(6):821-824.

- (32) Hellerstein MK, Hoh RA, Hanley MB, Cesar D, Lee D, Neese RA et al. Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *J Clin Invest* 2003; 112(6):956-966.
- (33) Galati D, Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Bocchino M, Costantini A et al. Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2003; 188(10):1483-1491.
- (34) Yue FY, Kovacs CM, Dimayuga RC, Gu XX, Parks P, Kaul R et al. Preferential apoptosis of HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Immunol* 2005; 174(4):2196-2204.
- (35) McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001; 410(6831):980-987.
- (36) Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998; 279(5359):2103-2106.
- (37) Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996; 2(4):405-411.
- (38) Shankar P, Xu Z, Lieberman J. Viral-specific cytotoxic T lymphocytes lyse human immunodeficiency virus-infected primary T lymphocytes by the granule exocytosis pathway. *Blood* 1999; 94(9):3084-3093.
- (39) Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000; 192(1):63-75.
- (40) Alcami J. [Advances in the immunopathology of HIV infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(8):486-496.
- (41) Fry TJ, Mackall CL. What limits immune reconstitution in HIV infection? Divergent tools converge on thymic function. *AIDS* 2001; 15(14):1881-1882.

- (42) Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, Brown DA, Kosek J, McCune JM et al. HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature* 1993; 363(6431):728-732.
- (43) Papiernik M, Brossard Y, Mulliez N, Roume J, Brechot C, Barin F et al. Thymic abnormalities in fetuses aborted from human immunodeficiency virus type 1 seropositive women. *Pediatrics* 1992; 89(2):297-301.
- (44) Joshi VV, Oleske JM, Saad S, Gadol C, Connor E, Bobila R et al. Thymus biopsy in children with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110(9):837-842.
- (45) Rosenzweig M, Clark DP, Gaulton GN. Selective thymocyte depletion in neonatal HIV-1 thymic infection. *AIDS* 1993; 7(12):1601-1605.
- (46) Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ, Patel DD, Liao HX, Bressler PB et al. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1999; 103(4):453-460.
- (47) Baskin GB, Murphey-Corb M, Martin LN, Davison-Fairburn B, Hu FS, Kuebler D. Thymus in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Lab Invest* 1991; 65(4):400-407.
- (48) Haase AT, Henry K, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H et al. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 1996; 274(5289):985-989.
- (49) Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, Roos MT, de Wolf F, Hill A et al. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998; 4(2):208-214.
- (50) Nabel GJ, Sullivan NJ. Antibodies and resistance to natural HIV infection. *N Engl J Med* 2000; 343(17):1263-1265.
- (51) Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE et al. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 2000; 6(2):207-210.

- (52) Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7):4144-4149.
- (53) Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* 2004; 5(3):233-236.
- (54) Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C et al. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* 1987; 328(6128):348-351.
- (55) Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999; 283(5403):857-860.
- (56) Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, Mukherjee JS, Hecht FM, Eldridge RL et al. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* 2001; 193(2):169-180.
- (57) Allen TM, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Mothe BR, Vogel TU et al. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 2000; 407(6802):386-390.
- (58) Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 2001; 410(6824):106-111.
- (59) Goepfert PA, Bansal A, Edwards BH, Ritter GD, Jr., Tellez I, McPherson SA et al. A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon. *J Virol* 2000; 74(21):10249-10255.
- (60) Goulder PJ, Tang Y, Brander C, Betts MR, Altfeld M, Annamalai K et al. Functionally inert HIV-specific cytotoxic T lymphocytes do not play a major role in chronically infected adults and children. *J Exp Med* 2000; 192(12):1819-1832.
- (61) Gray CM, Lawrence J, Schapiro JM, Altman JD, Winters MA, Crompton M et al. Frequency of class I HLA-restricted anti-HIV CD8+ T cells in individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Immunol* 1999; 162(3):1780-1788.

(62) Kostense S, Ogg GS, Manting EH, Gillespie G, Joling J, Vandenberghe K et al. High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur J Immunol* 2001; 31(3):677-686.

(63) Trimble LA, Shankar P, Patterson M, Daily JP, Lieberman J. Human immunodeficiency virus-specific circulating CD8 T lymphocytes have down-modulated CD3zeta and CD28, key signaling molecules for T-cell activation. *J Virol* 2000; 74(16):7320-7330.

(64) Metzner KJ, Jin X, Lee FV, Gettie A, Bauer DE, Di Mascio M et al. Effects of in vivo CD8(+) T cell depletion on virus replication in rhesus macaques immunized with a live, attenuated simian immunodeficiency virus vaccine. *J Exp Med* 2000; 191(11):1921-1931.

(65) de Quiros JC, Shupert WL, McNeil AC, Gea-Banacloche JC, Flanigan M, Savage A et al. Resistance to replication of human immunodeficiency virus challenge in SCID-Hu mice engrafted with peripheral blood mononuclear cells of nonprogressors is mediated by CD8(+) T cells and associated with a proliferative response to p24 antigen. *J Virol* 2000; 74(4):2023-2028.

(66) Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000; 407(6803):523-526.

(67) Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994; 68(12):8056-8063.

(68) Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997; 278(5342):1447-1450.

(69) Jansen CA, van Baarle D, Miedema F. HIV-specific CD4+ T cells and viremia: who's in control? *Trends Immunol* 2006; 27(3):119-124.

(70) Jansen CA, De Cuyper IM, Hooibrink B, van der Bij AK, van Baarle D, Miedema F. Prognostic value of HIV-1 Gag-specific CD4+ T-cell responses for progression to AIDS analyzed in a prospective cohort study. *Blood* 2006; 107(4):1427-1433.

(71) Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Pfeffer N, Meyers H et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997; 3(2):205-211.

(72) Fauci AS, Mavilio D, Kottlilil S. NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(11):835-843.

(73) Kedzierska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* 2003; 13(1):39-56.

(74) Levy JA. The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol* 2003; 24(12):628-632.

(75) Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, He Y, Vesanen M, Lewin S et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; 340(21):1605-1613.

(76) Cavert W, Notermans DW, Staskus K, Wietgreffe SW, Zupancic M, Gebhard K et al. Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science* 1997; 276(5314):960-964.

(77) Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338(13):853-860.

(78) Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997; 387(6629):183-188.

(79) Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278(5341):1295-1300.

(80) Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278(5341):1291-1295.

(81) Zhang ZQ, Notermans DW, Sedgewick G, Cavert W, Wietgreffe S, Zupancic M et al. Kinetics of CD4+ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(3):1154-1159.

- (82) Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997; 277(5322):112-116.
- (83) Yerly S, Perneger TV, Vora S, Hirschel B, Perrin L. Decay of cell-associated HIV-1 DNA correlates with residual replication in patients treated during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2000; 14(18):2805-2812.
- (84) Lange CG, Lederman MM. Immune reconstitution with antiretroviral therapies in chronic HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(1):1-4.
- (85) Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998; 396(6712):690-695.
- (86) Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanickolas R et al. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med* 1999; 190(5):725-732.
- (87) Diaz M, Douek DC, Valdez H, Hill BJ, Peterson D, Sanne I et al. T cells containing T cell receptor excision circles are inversely related to HIV replication and are selectively and rapidly released into circulation with antiretroviral treatment. *AIDS* 2003; 17(8):1145-1149.
- (88) Nobile M, Correa R, Borghans JA, D'Agostino C, Schneider P, de Boer RJ et al. De novo T-cell generation in patients at different ages and stages of HIV-1 disease. *Blood* 2004; 104(2):470-477.
- (89) Kou ZC, Puhr JS, Wu SS, Goodenow MM, Sleasman JW. Combination antiretroviral therapy results in a rapid increase in T cell receptor variable region beta repertoire diversity within CD45RA CD8 T cells in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis* 2003; 187(3):385-397.
- (90) Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol Today* 1997; 18(5):245-251.

- (91) Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332(3):143-149.
- (92) Dalod M, Dupuis M, Deschemin JC, Sicard D, Salmon D, Delfraissy JF et al. Broad, intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex vivo CD8(+) responses in HIV type 1-infected patients: comparison with anti-Epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapy. *J Virol* 1999; 73(9):7108-7116.
- (93) Mollet L, Li TS, Samri A, Tournay C, Tubiana R, Calvez V et al. Dynamics of HIV-specific CD8+ T lymphocytes with changes in viral load. The RESTIM and COMET Study Groups. *J Immunol* 2000; 165(3):1692-1704.
- (94) Oxenius A, Price DA, Easterbrook PJ, O'Callaghan CA, Kelleher AD, Whelan JA et al. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7):3382-3387.
- (95) Pantaleo G. Unraveling the strands of HIV's web. *Nat Med* 1999; 5(1):27-28.
- (96) Spiegel HM, DeFalcon E, Ogg GS, Larsson M, Beadle TJ, Tao P et al. Changes in frequency of HIV-1-specific cytotoxic T cell precursors and circulating effectors after combination antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* 1999; 180(2):359-368.
- (97) Dalod M, Harzic M, Pellegrin I, Dumon B, Hoen B, Sereni D et al. Evolution of cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus type 1 in patients with symptomatic primary infection receiving antiretroviral triple therapy. *J Infect Dis* 1998; 178(1):61-69.
- (98) Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK, Jones NG, Trocha AK, Ogg GS et al. Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 1999; 73(8):6721-6728.
- (99) Ogg GS, Kostense S, Klein MR, Jurriaans S, Hamann D, McMichael AJ et al. Longitudinal phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J Virol* 1999; 73(11):9153-9160.

- (100) Pontesilli O, Kerkhof-Garde S, Notermans DW, Foudraine NA, Roos MT, Klein MR et al. Functional T cell reconstitution and human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity during highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1999; 180(1):76-86.
- (101) Rinaldo CR, Jr., Huang XL, Fan Z, Margolick JB, Borowski L, Hoji A et al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD8(+) T-lymphocyte reactivity during combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients with advanced immunodeficiency. *J Virol* 2000; 74(9):4127-4138.
- (102) Stranford SA, Ong JC, Martinez-Marino B, Busch M, Hecht FM, Kahn J et al. Reduction in CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV activity in individuals receiving highly active antiretroviral therapy during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(2):597-602.
- (103) Wilkinson J, Zaunders JJ, Carr A, Cooper DA. CD8+ anti-human immunodeficiency virus suppressor activity (CASA) in response to antiretroviral therapy: loss of CASA is associated with loss of viremia. *J Infect Dis* 1999; 180(1):68-75.
- (104) Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M et al. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998; 178(1):70-79.
- (105) Plana M, Garcia F, Gallart T, Miro JM, Gatell JM. Lack of T-cell proliferative response to HIV-1 antigens after 1 year of highly active antiretroviral treatment in early HIV-1 disease. Immunology Study Group of Spanish EARTH-1 Study. *Lancet* 1998; 352(9135):1194-1195.
- (106) Rinaldo CR, Jr., Liebmann JM, Huang XL, Fan Z, Al Shboul Q, McMahon DK et al. Prolonged suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viremia in persons with advanced disease results in enhancement of CD4 T cell reactivity to microbial antigens but not to HIV-1 antigens. *J Infect Dis* 1999; 179(2):329-336.
- (107) Lisziewicz J, Rosenberg E, Lieberman J, Jessen H, Lopalco L, Siliciano R et al. Control of HIV despite the discontinuation of antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; 340(21):1683-1684.

(108) Ortiz GM, Nixon DF, Trkola A, Binley J, Jin X, Bonhoeffer S et al. HIV-1-specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 1999; 104(6):R13-R18.

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

(110) Ruiz L, Carcelain G, Martinez-Picado J, Frost S, Marfil S, Paredes R et al. HIV dynamics and T-cell immunity after three structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2001; 15(9):F19-F27.

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

(112) Deeks SG, Martin JN, Sinclair E, Harris J, Neilands TB, Maecker HT et al. Strong cell-mediated immune responses are associated with the maintenance of low-level viremia in antiretroviral-treated individuals with drug-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2004; 189(2):312-321.

(113) Garcia F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G et al. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(11):F79-F86.

(114) Giovannetti A, Pierdominici M, Marziali M, Mazzetta F, Caprini E, Russo G et al. Persistently biased T-cell receptor repertoires in HIV-1-infected combination antiretroviral therapy-treated patients despite sustained suppression of viral replication. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34(2):140-154.

(115) Martinez E, Mocroft A, Garcia-Viejo MA, Perez-Cuevas JB, Blanco JL, Mallolas J et al. Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet* 2001; 357(9256):592-598.

(116) Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 2003; 9:861-866.

- (117) Martinez E, Arnaiz JA, Podzamczar D, Dalmau D, Ribera E, Domingo P et al. Substitution of nevirapine, efavirenz, or abacavir for protease inhibitors in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 2003; 349(11):1036-1046.
- (118) Autran B, Debre P, Walker B, Katlama C. Therapeutic vaccines against HIV need international partnerships. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(6):503-508.
- (119) Garcia F, Plana M, Ortiz GM, Bonhoeffer S, Soriano A, Vidal C et al. The virological and immunological consequences of structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2001; 15(9):F29-F40.
- (120) Castro P, Lopez A, Fumero E, Nomdedeu M, Guila M, Oliva H et al. Vacunas terapéuticas e inmunoterapia en la infección por VIH. *AIDS Cyber J* 2006; 8(3) www.prous.com/tmsida.
- (121) Patterson BK, Carlo DJ, Kaplan MH, Marecki M, Pawha S, Moss RB. Cell-associated HIV-1 messenger RNA and DNA in T-helper cell and monocytes in asymptomatic HIV-1-infected subjects on HAART plus an inactivated HIV-1 immunogen. *AIDS* 1999; 13(13):1607-1611.
- (122) Kinloch-de Loes S, Hoen B, Smith DE, Autran B, Lampe FC, Phillips AN et al. Impact of therapeutic immunization on HIV-1 viremia after discontinuation of antiretroviral therapy initiated during acute infection. *J Infect Dis* 2005; 192(4):607-617.
- (123) Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 2001; 292(5514):69-74.
- (124) Lisziewicz J, Bakare N, Lori F. Therapeutic vaccination for future management of HIV/AIDS. *Vaccine* 2003; 21(7-8):620-623.
- (125) Buge SL, Murty L, Arora K, Kalyanaraman VS, Markham PD, Richardson ES et al. Factors associated with slow disease progression in macaques immunized with an adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) envelope priming-gp120 boosting regimen and challenged vaginally with SIVmac251. *J Virol* 1999; 73(9):7430-7440.

- (126) Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 2004; 10(12):1359-1365.
- (127) Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcami J, Morente V et al. Therapeutic Immunization with Dendritic Cells Loaded with Heat-Inactivated Autologous HIV-1 in Patients with Chronic HIV-1 Infection. *J Infect Dis* 2005; 191(10):1680-1685.
- (128) Miro JM, Plana M, Garcia F, Ortiz GM, Maleno MJ, Sued O et al. Low-dose daily IL-2 combined with structured treatment interruptions (STI) did not increase the HIV-1-specific T-cell responses in patients receiving HAART within 90 days after onset primary HIV-1 infection (PHI) symptoms. XV International AIDS Conference, Bangkok Thailand. Book of abstracts. 2004.
- (129) Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, Falloon J, Davey RT, Jr., Walker RE et al. Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1996; 335(18):1350-1356.
- (130) Jacobson EL, Pilaro F, Smith KA. Rational interleukin 2 therapy for HIV positive individuals: daily low doses enhance immune function without toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(19):10405-10410.
- (131) Aladdin H, Ullum H, Dam NS, Espersen C, Mathiesen L, Katzenstein TL et al. Granulocyte colony-stimulating factor increases CD4+ T cell counts of human immunodeficiency virus-infected patients receiving stable, highly active antiretroviral therapy: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 2000; 181(3):1148-1152.
- (132) Brites C, Gilbert MJ, Pedral-Sampaio D, Bahia F, Pedroso C, Alcantara AP et al. A randomized, placebo-controlled trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and nucleoside analogue therapy in AIDS. *J Infect Dis* 2000; 182(5):1531-1535.
- (133) Alston B, Ellenberg JH, Standiford HC, Muth K, Martinez A, Greaves W et al. A multicenter, randomized, controlled trial of three preparations of low-dose oral alpha-interferon in HIV-infected patients with CD4+ counts between 50 and 350 cells/mm³. Division of AIDS Treatment Research Initiative (DATRI) 022 Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 22(4):348-357.

- (134) Angel JB, Jacobson MA, Skolnik PR, Giordano M, Shapiro L, LeBeaut A et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-10 in HIV-infected subjects. *AIDS* 2000; 14(16):2503-2508.
- (135) Jacobson MA, Hardy D, Connick E, Watson J, DeBruin M. Phase 1 trial of a single dose of recombinant human interleukin-12 in human immunodeficiency virus-infected patients with 100-500 CD4 cells/microL. *J Infect Dis* 2000; 182(4):1070-1076.
- (136) Kanai T, Thomas EK, Yasutomi Y, Letvin NL. IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL. *J Immunol* 1996; 157(8):3681-3687.
- (137) Truong MJ, Darcissac EC, Hermann E, Dewulf J, Capron A, Bahr GM. Interleukin-16 inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in macrophages and in dendritic cells. *J Virol* 1999; 73(8):7008-7013.
- (138) Mitsuyasu RT, Anton PA, Deeks SG, Scadden DT, Connick E, Downs MT et al. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 2000; 96(3):785-793.
- (139) Brodie SJ, Patterson BK, Lewinsohn DA, Diem K, Spach D, Greenberg PD et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death. *J Clin Invest* 2000; 105:1407-1417.
- (140) Brodie SJ, Lewinsohn DA, Patterson BK, Jiyamapa D, Krieger J, Corey L et al. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nat Med* 1999; 5(1):34-41.
- (141) Koenig S, Conley AJ, Brewah YA, Jones GM, Leath S, Boots LJ et al. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med* 1995; 1(4):330-336.
- (142) Lieberman J, Fabry JA, Shankar P, Beckett L, Skolnik PR. Ex vivo expansion of HIV type 1-specific cytolytic T cells from HIV type 1-seropositive subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11(2):257-271.

- (143) Levy J, Youvan T, Lee ML. Passive hyperimmune plasma therapy in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome: results of a 12-month multicenter double-blind controlled trial. *Blood* 1994; 84:2130-2135.
- (144) Vittecoq D, Chevret S, Morand-Joubert L, Heshmati F, Audat F, Bary M et al. Passive immunotherapy in AIDS: a double-blind randomized study based on transfusions of plasma rich in anti-human immunodeficiency virus 1 antibodies vs transfusions of seronegative plasma. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 1994:1195-1199.
- (145) Kuritzkes DR, Jacobson J, Powderly WG, Godofsky E, DeJesus E, Haas F et al. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* 2004; 189(2):286-291.
- (146) Karpas A, Hewlett IK, Hill F, Gray J, Byron N, Gilgen D et al. Polymerase chain reaction evidence for human immunodeficiency virus 1 neutralization by passive immunization in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(19):7613-7617.
- (147) Ruiz L, Ribera E, Bonjoch A, Romeu J, Martinez-Picado J, Paredes R et al. Role of structured treatment interruption before a 5-drug salvage antiretroviral regimen: the Retrogene Study. *J Infect Dis* 2003; 188(7):977-985.
- (148) Hellinger JA, Iwane MK, Smith JJ, Fleishman AN, Torres RA, Schrader S et al. A randomized study of the safety and antiretroviral activity of hydroxyurea combined with didanosine in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. American Foundation for AIDS Research Community-Based Clinical Trials Network. *J Infect Dis* 2000; 181(2):540-547.
- (149) Garcia F, Plana M, Arnedo M, Ortiz GM, Miro JM, Lopalco L et al. A cytostatic drug improves control of HIV-1 replication during structured treatment interruptions: a randomized study. *AIDS* 2003; 17(1):43-51.
- (150) Andrieu JM, Lu W, Levy R. Sustained increases in CD4 cell counts in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients treated with prednisolone for 1 year. *J Infect Dis* 1995; 171(3):523-530.

- (151) Rizzardi GP, Vaccarezza M, Capiluppi B, Tambussi G, Lazzarin A, Pantaleo G. Cyclosporin A in combination with HAART in primary HIV-1 infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14(1):79-81.
- (152) Chapuis A, Rizzardi P, D'Agostini C, Attinger A, Knabenhans C, Fleury S et al. Effects of mycophenolic acid on human immunodeficiency virus infection in vitro and in vivo. *Nat Med* 2000; 6:762-768.
- (153) Garcia F, Plana M, Arnedo M, Brunet M, Castro P, Gil C et al. Effect of mycophenolate mofetil on immune response and plasma and lymphatic tissue viral load during and after interruption of highly active antiretroviral therapy for patients with chronic HIV infection: a randomized pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36(3):823-830.
- (154) Jacobson JM, Greenspan JS, Spritzler J, Ketter N, Fahey JL, Jackson JB et al. Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1997; 336(21):1487-1493.
- (155) Markowitz M, Jin X, Hurley A, Simon V, RAMRATNAM B, Louie M et al. Discontinuation of antiretroviral therapy commenced early during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection, with or without adjunctive vaccination. *J Infect Dis* 2002; 2002 Sep 1;186(5):634-643.
- (156) MacGregor RR, Ginsberg R, Ugen KE, Baine Y, Kang CU, Tu XM et al. T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev. *AIDS* 2002; 16(16):2137-2143.
- (157) MacGregor RR, Boyer JD, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, Weiner DB. Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data. *J Infect Dis* 2000; 181(1):406.
- (158) Schooley RT, Spino C, Kuritzkes D, Walker BD, Valentine FA, Hirsch MS et al. Two double-blinded, randomized, comparative trials of 4 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope vaccines in HIV-1-infected individuals across a spectrum of disease severity: AIDS Clinical Trials Groups 209 and 214. *J Infect Dis* 2000; 182(5):1357-1364.

- (159) Smith D, Gow I, Colebunders R, Weller I, Tchamouff S, Weber J et al. Therapeutic vaccination (p24-VLP) of patients with advanced HIV-1 infection in the pre-HAART era does not alter CD4 cell decline. *HIV Med* 2001; 2(4):272-275.
- (160) Robbins GK, Addo MM, Troung H, Rathod A, Habeeb K, Davis B et al. Augmentation of HIV-1-specific T helper cell responses in chronic HIV-1 infection by therapeutic immunization. *AIDS* 2003; 17(8):1121-1126.
- (161) Lederman MM, Douek DC. Sometimes help may not be enough. *AIDS* 2003; 17(8):1249-1251.
- (162) Kahn JO, Cherng DW, Mayer K, Murray H, Lagakos S. Evaluation of HIV-1 immunogen, an immunologic modifier, administered to patients infected with HIV having 300 to 549 x 10⁶/L CD4 cell counts: A randomized controlled trial. *JAMA* 2000; 284(17):2193-2202.
- (163) Lu W, Wu X, Lu Y, Guo W, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. *Nat Med* 2003; 2003 Jan;9(1):27-32.
- (164) Lapenta C, Santini S, Logozzi M, Spada M, Andreotti M, Pucchio T et al. Potent Immune responses against HIV-1 and protection from virus challenge in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated virus-pulsed dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *J Exp Med* 2003; 198:361-367.
- (165) Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Takahashi Y, Koyanagi Y, Nakamura M et al. Induction of protective immune responses against R5 Human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intraesplenic immunization with HIV-1 pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4⁺ T-cell origin. *J Virol* 2003; 77:8719-8728.
- (166) McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med* 2003; 9(6):729-735.
- (167) Lisziewicz J, Trocio J, Xu J, Whitman L, Ryder A, Bakare N et al. Control of viral rebound through therapeutic immunization with DermaVir. *AIDS* 2005; 19(1):35-43.

- (168) Arno A, Ruiz L, Juan M, Jou A, Balague M, Zayat MK et al. Efficacy of low-dose subcutaneous interleukin-2 to treat advanced human immunodeficiency virus type 1 in persons with $\leq 250/\mu\text{L}$ CD4 T cells and undetectable plasma virus load. *J Infect Dis* 1999; 180(1):56-60.
- (169) Connors M, Kovacs JA, Krevat S, Gea-Banacloche JC, Sneller MC, Flanigan M et al. HIV infection induces changes in CD4⁺ T-cell phenotype and depletions within the CD4⁺ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med* 1997; 3(5):533-540.
- (170) Henry K, Katzenstein D, Cherng DW, Valdez H, Powderly W, Vargas MB et al. A pilot study evaluating time to CD4 T-cell count < 350 cells/mm³ after treatment interruption following antiretroviral therapy +/- interleukin 2: results of ACTG A5102. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42(2):140-148.
- (171) Levy Y, Gahery-Segard H, Durier C, Lascaux AS, Goujard C, Meiffredy V et al. Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *AIDS* 2005; 19(3):279-286.
- (172) Chun TW, Engel D, Mizell SB, Hallahan CW, Fischette M, Park S et al. Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4⁺ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 1999; 5(6):651-655.
- (173) Chun TW, Davey RT, Jr., Ostrowski M, Shawn JJ, Engel D, Mullins JI et al. Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000; 6(7):757-761.
- (174) McFarland EJ, Harding PA, MaWhinney S, Schooley RT, Kuritzkes DR. In vitro effects of IL-12 on HIV-1-specific CTL lines from HIV-1-infected children. *J Immunol* 1998; 161(1):513-519.
- (175) Forcina G, D'Ettorre G, Mastroianni CM, Carnevalini M, Scorzolini L, Ceccarelli G et al. Interleukin-15 modulates interferon-gamma and beta-chemokine production in patients with HIV infection: implications for immune-based therapy. *Cytokine* 2004; 25(6):283-290.
- (176) Mastroianni CM, D'Ettorre G, Forcina G, Vullo V. Teaching tired T cells to fight HIV: time to test IL-15 for immunotherapy? *Trends Immunol* 2004; 25(3):121-125.

(177) Landay AL, Clerici M, Hashemi F, Kessler H, Berzofsky JA, Shearer GM. In vitro restoration of T cell immune function in human immunodeficiency virus-positive persons: effects of interleukin (IL)-12 and anti-IL-10. *J Infect Dis* 1996; 173(5):1085-1091.

(178) Napolitano LA, Lo JC, Gotway MB, Mulligan K, Barbour JD, Schmidt D et al. Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS* 2002; 16(8):1103-1111.

(179) Nguyen BY, Clerici M, Venzon DJ, Bauza S, Murphy WJ, Longo DL et al. Pilot study of the immunologic effects of recombinant human growth hormone and recombinant insulin-like growth factor in HIV-infected patients. *AIDS* 1998; 12(8):895-904.

(180) Fagard C, Le Braz M, Gunthard H, Hirsch HH, Egger M, Vernazza P et al. A controlled trial of granulocyte macrophage-colony stimulating factor during interruption of HAART. *AIDS* 2003; 17(10):1487-1492.

(181) Kulkosky J, Nunnari G, Otero M, Calarota S, Dornadula G, Zhang H et al. Intensification and stimulation therapy for human immunodeficiency virus type 1 reservoirs in infected persons receiving virally suppressive highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2002; 186(10):1403-1411.

(182) Tan R, Xu X, Ogg GS, Hansasuta P, Dong T, Rostron T et al. Rapid death of adoptively transferred T cells in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 1999; 93(5):1506-1510.

(183) Levine BL, Bernstein WB, Aronson NE, Schlienger K, Cotte J, Perfetto S et al. Adoptive transfer of costimulated CD4+ T cells induces expansion of peripheral T cells and decreased CCR5 expression in HIV infection. *Nat Med* 2002; 8(1):47-53.

(184) Karpas A, Hill F, Youle M, Cullen V, Gray J, Byron N et al. Effects of passive immunization in patients with the acquired immunodeficiency syndrome-related complex and acquired immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(23):9234-9237.

(185) Karpas A, Gillson W, Bevan PC, Oates JK. Lytic infection by British AIDS virus and development of rapid cell test for antiviral antibodies. *Lancet* 1985; 2(8457):695-697.

(186) Parren PW, Marx PA, Hessel AJ, Luckay A, Harouse J, Cheng-Mayer C et al. Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human

immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *J Virol* 2001; 75(17):8340-8347.

(187) Hofmann-Lehmann R, Rasmussen RA, Vlasak J, Smith BA, Baba TW, Liska V et al. Passive immunization against oral AIDS virus transmission: an approach to prevent mother-to-infant HIV-1 transmission? *J Med Primatol* 2001; 30(4):190-196.

(188) Mascola JR. Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* 2002; 20(15):1922-1925.

(189) Armbruster C, Stiegler GM, Vcelar BA, Jager W, Michael NL, Vetter N et al. A phase I trial with two human monoclonal antibodies (hMAb 2F5, 2G12) against HIV-1. *AIDS* 2002; 16(2):227-233.

(190) Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; 179(4):859-870.

(191) Chun TW, Justement JS, Sanford C, Hallahan CW, Planta MA, Loutfy M et al. Relationship between the frequency of HIV-specific CD8+ T cells and the level of CD38+CD8+ T cells in untreated HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(8):2464-2469.

(192) Lori F, Lewis MG, Xu J, Varga G, Zinn DE, Jr., Crabbs C et al. Control of SIV rebound through structured treatment interruptions during early infection. *Science* 2000; 290(5496):1591-1593.

(193) Margolis DM, Kewn S, Coull JJ, Ylisastigui L, Turner D, Wise H et al. The addition of mycophenolate mofetil to antiretroviral therapy including abacavir is associated with depletion of intracellular deoxyguanosine triphosphate and a decrease in plasma HIV-1 RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31(1):45-49.

(194) Rizzardì GP, Harari A, Capiluppi B, Tambussi G, Ellefsen K, Ciuffreda D et al. Treatment of primary HIV-1 infection with cyclosporin A coupled with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 2002; 109(5):681-688.

- (195) Plana M, Garcia F, Oxenius A, Ortiz GM, Lopez A, Cruceta A et al. Relevance of HIV-1-specific CD4+ helper T-cell responses during structured treatment interruptions in patients with CD4+ T-cell nadir above 400/mm³. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36(3):791-799.
- (196) Dybul M. Structured Treatment Interruption: Approaches and Risks. *Curr Infect Dis Rep* 2002; 4(2):175-180.
- (197) Ananworanich J, Nuesch R, Le Braz M, Chetchotisakd P, Vibhagool A, Wicharuk S et al. Failures of 1 week on, 1 week off antiretroviral therapies in a randomized trial. *AIDS* 2003; 17(15):F33-F37.
- (198) Ananworanich J, Hirschel B. Interrupting highly active antiretroviral therapy in patients with HIV. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005; 3(1):51-60.
- (199) Lawrence J, Mayers DL, Hullsiek KH, Collins G, Abrams DI, Reisler RB et al. Structured treatment interruption in patients with multidrug-resistant human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 2003; 349(9):837-846.
- (200) El-Sadr W, Neaton J, for the SMART Study Investigators. Episodic CD4-guided use of antiretroviral therapy is inferior to continuous therapy: results of the SMART study. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infections, Denver, CO, USA; Book of abstracts. 2006.
- (201) Danel C, Moh R, Sorho S, Minga A, Anzian A, Ba-Gomis O et al. The CD4-guided strategy arm stopped in a randomized structured treatment interruption trial in West-African adults: ANRS 1268 Trivacan Trial. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infections, Denver, CO, USA; Book of abstracts. 2006.
- (202) Ananworanich J, Gayet-Ageron A, Le Braz M, Prasithsirikul W, Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S et al. CD4-guided scheduled treatments interruptions compared to continuous therapy: results of the Staccato Trial. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infections, Denver, CO, USA; Book of abstracts. 2006.
- (203) Harrigan PR, Whaley M, Montaner JS. Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(8):F59-F62.

- (204) Colven R, Harrington RD, Spach DH, Cohen CJ, Hooton TM. Retroviral rebound syndrome after cessation of suppressive antiretroviral therapy in three patients with chronic HIV infection. *Ann Intern Med* 2000; 133(6):430-434.
- (205) Metzner KJ, Bonhoeffer S, Fischer M, Karanickolas R, Allers K, Joos B et al. Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions. *J Infect Dis* 2003; 188(10):1433-1443.
- (206) Papasavvas E, Grant RM, Sun J, Mackiewicz A, Pistilli M, Gallo C et al. Lack of persistent drug-resistant mutations evaluated within and between treatment interruptions in chronically HIV-1-infected patients. *AIDS* 2003; 17(16):2337-2343.
- (207) Schweighardt B, Ortiz GM, Grant RM, Wellons M, Miralles GD, Kostrikis LG et al. Emergence of drug-resistant HIV-1 variants in patients undergoing structured treatment interruptions. *AIDS* 2002; 16(17):2342-2344.
- (208) Dybul M, Nies-Kraske E, Daucher M, Hertogs K, Hallahan CW, Csako G et al. Long-cycle structured intermittent versus continuous highly active antiretroviral therapy for the treatment of chronic infection with human immunodeficiency virus: effects on drug toxicity and on immunologic and virologic parameters. *J Infect Dis* 2003; 188(3):388-396.
- (209) Yerly S, Fagard C, Gunthard HF, Hirschel B, Perrin L. Drug resistance mutations during structured treatment interruptions. *Antivir Ther* 2003; 8(5):411-415.
- (210) Nuesch R, Ananworanich J, Sirivichayakul S, Ubolyam S, Siangphoe U, Hill A et al. Development of HIV with drug resistance after CD4 cell count-guided structured treatment interruptions in patients treated with highly active antiretroviral therapy after dual-nucleoside analogue treatment. *Clin Infect Dis* 2005; 40(5):728-734.
- (211) Thiebaut R, Pellegrin I, Chene G, Viallard JF, Fleury H, Moreau JF et al. Immunological markers after long-term treatment interruption in chronically HIV-1 infected patients with CD4 cell count above 400×10^6 cells/l. *AIDS* 2005; 19(1):53-61.
- (212) Fernandez Guerrero ML, Rivas P, Molina M, Garcia R, De Gorgolas M. Long-term follow-up of asymptomatic HIV-infected patients who discontinued antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005; 41(3):390-394.

- (213) Tebas P, Henry K, Mondy K, Deeks S, Valdez H, Cohen C et al. Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD4+ T cell decline in human immunodeficiency virus-infected patients: implications for intermittent therapeutic strategies. *J Infect Dis* 2002; 186(6):851-854.
- (214) Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Inmunobiología*. 2ª ed. Barcelona: Masson, 2003.
- (215) Pirofski LA, Casadevall A. Use of licensed vaccines for active immunization of the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(1):1-26.
- (216) Recomanacions vacunacions Departament Català de Salut <http://www.gencat.net/salut/depsan/units/sanitat/html/ca/vacunes/ttv.htm>. 2005.
- (217) Comisión de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo de España. Vacunación en Adultos. Recomendaciones 2004. Consultable en www.msc.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/vacunasProfesionales.htm. 2004.
- (218) Canadian Immunization Guide. Sixth ed. Ministry of Health of Canada, 2002.
- (219) Atkinson WL, Pickering LK, Schwartz B, Weniger BG, Iskander JK, Watson JC. General recommendations on immunization. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the American Academy of Family Physicians (AAFP). *MMWR Recomm Rep* 2002; 51(RR-2):1-35.
- (220) Ochnio JJ, Scheifele DW, Ho M. Hepatitis A virus infections in urban children--are preventive opportunities being missed? *J Infect Dis* 1997; 176(6):1610-1613.
- (221) Clemens R, Safary A, Hepburn A, Roche C, Stanbury WJ, Andre FE. Clinical experience with an inactivated hepatitis A vaccine. *J Infect Dis* 1995; 171 Suppl 1:S44-S49.
- (222) National, state, and urban area vaccination coverage levels among children aged 19-35 months--United States, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001; 50(30):637-641.
- (223) West DJ, Calandra GB. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. *Vaccine* 1996; 14(11):1019-1027.

- (224) Couch RB. Influenza, influenza virus vaccine, and human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1999; 28(3):548-551.
- (225) Measles--United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998; 47(14):273-276.
- (226) Butler JC, Breiman RF, Campbell JF, Lipman HB, Broome CV, Facklam RR. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy. An evaluation of current recommendations. *JAMA* 1993; 270(15):1826-1831.
- (227) Ortqvist A, Hedlund J, Burman LA, Elbel E, Hofer M, Leinonen M et al. Randomised trial of 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in prevention of pneumonia in middle-aged and elderly people. Swedish Pneumococcal Vaccination Study Group. *Lancet* 1998; 351(9100):399-403.
- (228) Moore RA, Wiffen PJ, Lipsky BA. Are the pneumococcal polysaccharide vaccines effective? Meta-analysis of the prospective trials. *BMC Fam Pract* 2000; 1:1.
- (229) French N. Use of pneumococcal polysaccharide vaccines: no simple answers. *J Infect* 2003; 46(2):78-86.
- (230) Influenza and pneumococcal vaccination coverage among persons aged > or =65 years and persons aged 18-64 years with diabetes or asthma--United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53(43):1007-1012.
- (231) McElhaney JE, Pinkoski MJ, Meneilly GS. Changes in CD45 isoform expression vary according to the duration of T-cell memory after vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2(1):73-81.
- (232) Ada G. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med* 2001; 345(14):1042-1053.
- (233) Morimoto C, Letvin NL, Boyd AW, Hagan M, Brown HM, Kornacki MM et al. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J Immunol* 1985; 134(6):3762-3769.
- (234) Smith SH, Brown MH, Rowe D, Callard RE, Beverley PC. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology* 1986; 58(1):63-70.

- (235) Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988; 140(7):2171-2178.
- (236) Clement LT, Yamashita N, Martin AM. The functionally distinct subpopulations of human CD4+ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation. *J Immunol* 1988; 141(5):1464-1470.
- (237) Serra HM, Krowka JF, Ledbetter JA, Pilarski LM. Loss of CD45R (Lp220) represents a post-thymic T cell differentiation event. *J Immunol* 1988; 140(5):1435-1441.
- (238) Salmon M, Kitas GD, Bacon PA. Production of lymphokine mRNA by CD45R+ and C. *J Immunol* 1989; 143(3):907-912.
- (239) Deans JP, Serra HM, Shaw J, Shen YJ, Torres RM, Pilarski LM. Transient accumulation and subsequent rapid loss of messenger RNA encoding high molecular mass CD45 isoforms after T cell activation. *J Immunol* 1992; 148(6):1898-1905.
- (240) Arthur RP, Mason D. T cells that help B cell responses to soluble antigen are distinguishable from those producing interleukin 2 on mitogenic or allogeneic stimulation. *J Exp Med* 1986; 163(4):774-786.
- (241) Bettens F, Walker C, Gauchat JF, Gauchat D, Wyss T, Pichler WJ. Lymphokine gene expression related to CD4 T cell subset (CD45R/CDw29) phenotype conversion. *Eur J Immunol* 1989; 19(9):1569-1574.
- (242) Budd RC, Schreyer M, Miescher GC, MacDonald HR. T cell lineages in the thymus of lpr/lpr mice. Evidence for parallel pathways of normal and abnormal T cell development. *J Immunol* 1987; 139(7):2200-2210.
- (243) Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannel I, Hulstaert F, Hamilton C et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1992; 120(2 Pt 1):216-222.
- (244) Sanders ME, Makgoba MW, Sharrow SO, Stephany D, Springer TA, Young HA et al. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-

3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J Immunol* 1988; 140(5):1401-1407.

(245) Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N et al. Memory T cells and vaccines. *Vaccine* 2003; 21(5-6):419-430.

(246) Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* 2003; 171(10):4969-4973.

(247) Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 2003; 9(9):1131-1137.

(248) Demkowicz WE, Jr., Littau RA, Wang J, Ennis FA. Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J Virol* 1996; 70(4):2627-2631.

(249) Di Genova G, Roddick J, McNicholl F, Stevenson FK. Vaccination of human subjects expands both specific and bystander memory T cells but antibody production remains vaccine specific. *Blood* 2006; 107(7):2806-2813.

(250) Vigano A, Bricalli D, Trabattoni D, Salvaggio A, Ruzzante S, Barbi M et al. Immunization with both T cell-dependent and T cell-independent vaccines augments HIV viral load secondarily to stimulation of tumor necrosis factor alpha. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14(9):727-734.

(251) Wieder ED. Real-time monitoring of immune responses. *Cytotherapy* 2002; 4(4):347-352.

(252) Cooley L, Sasadeusz J. Clinical and virological aspects of hepatitis B co-infection in individuals infected with human immunodeficiency virus type-1. *J Clin Virol* 2003; 26(2):185-193.

(253) Birx DL, Rhoads JL, Wright JC, Burke DS, Redfield RR. Immunologic parameters in early-stage HIV-seropositive subjects associated with vaccine responsiveness. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4(2):188-196.

(254) Janoff EN, Hardy WD, Smith PD, Wahl SM. Humoral recall responses in HIV infection. Levels, specificity, and affinity of antigen-specific IgG. *J Immunol* 1991; 147(7):2130-2135.

(255) Ballet JJ, Couderc LJ, Rabian-Herzog C, Duval-Roy C, Janier M, Danon F et al. Impaired T-lymphocyte-dependent immune responses to microbial antigens in patients with HIV-1-associated persistent generalized lymphadenopathy. *AIDS* 1988; 2(4):291-297.

(256) Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, Fauci AS. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1983; 309(8):453-458.

(257) Lane HC, Depper JM, Greene WC, Whalen G, Waldmann TA, Fauci AS. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *N Engl J Med* 1985; 313(2):79-84.

(258) Rhoads JL, Birx DL, Wright DC, Brundage JF, Brandt BL, Redfield RR et al. Safety and immunogenicity of multiple conventional immunizations administered during early HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4(7):724-731.

(259) Kroon FP, van Dissel JT, de Jong JC, van Furth R. Antibody response to influenza, tetanus and pneumococcal vaccines in HIV-seropositive individuals in relation to the number of CD4+ lymphocytes. *AIDS* 1994; 8(4):469-476.

(260) Weiss PJ, Wallace MR, Oldfield EC, III, O'Brien J, Janoff EN. Response of recent human immunodeficiency virus seroconverters to the pneumococcal polysaccharide vaccine and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1995; 171(5):1217-1222.

(261) Janoff EN, Tasker SA, Stevenson M, Rubins JB, O'Brien J, Utz G et al. Immune activation and virologic response to immunization in recent HIV type 1 seroconverters. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15(9):837-845.

(262) Kroon FP, van Dissel JT, Labadie J, van Loon AM, van Furth R. Antibody response to diphtheria, tetanus, and poliomyelitis vaccines in relation to the number of CD4+ T lymphocytes in adults infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1995; 21(5):1197-1203.

(263) Bonetti TC, Succi RC, Weckx LY, Tavares-Lopes L, Moraes-Pinto MI. Tetanus and diphtheria antibodies and response to a booster dose in Brazilian HIV-1-infected women. *Vaccine* 2004; 22(27-28):3707-3712.

- (264) Dieye TN, Sow PS, Simonart T, Gueye-Ndiaye A, Popper SJ, Delforge ML et al. Immunologic and virologic response after tetanus toxoid booster among HIV-1- and HIV-2-infected Senegalese individuals. *Vaccine* 2001; 20(5-6):905-913.
- (265) Nelson KE, Clements ML, Miotti P, Cohn S, Polk BF. The influence of human immunodeficiency virus (HIV) infection on antibody responses to influenza vaccines. *Ann Intern Med* 1988; 109(5):383-388.
- (266) Lange CG, Lederman MM, Medvik K, Asaad R, Wild M, Kalayjian R et al. Nadir CD4+ T-cell count and numbers of CD28+ CD4+ T-cells predict functional responses to immunizations in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2003; 17(14):2015-2023.
- (267) Jacobson MA, Khayam-Bashi H, Martin JN, Black D, Ng V. Effect of long-term highly active antiretroviral therapy in restoring HIV-induced abnormal B-lymphocyte function. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31(5):472-477.
- (268) Glaser JB, Volpe S, Aguirre A, Simpkins H, Schiffman G. Zidovudine improves response to pneumococcal vaccine among persons with AIDS and AIDS-related complex. *J Infect Dis* 1991; 164(4):761-764.
- (269) Melvin AJ, Mohan KM. Response to immunization with measles, tetanus, and Haemophilus influenzae type b vaccines in children who have human immunodeficiency virus type 1 infection and are treated with highly active antiretroviral therapy. *Pediatrics* 2003; 111(6 Pt 1):e641-e644.
- (270) Rousseau MC, Moreau J, Delmont J. Vaccination and HIV: a review of the literature. *Vaccine* 1999; 18(9-10):825-831.
- (271) Virelizier JL. Cellular activation and human immunodeficiency virus infection. *Curr Opin Immunol* 1989; 2(3):409-413.
- (272) Poli G, Fauci AS. The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(2):191-197.
- (273) Lewis P, Hensel M, Emerman M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* 1992; 11(8):3053-3058.

(274) Schnittman SM, Denning SM, Greenhouse JJ, Justement JS, Baseler M, Kurtzberg J et al. Evidence for susceptibility of intrathymic T-cell precursors and their progeny carrying T-cell antigen receptor phenotypes TCR alpha beta + and TCR gamma delta + to human immunodeficiency virus infection: a mechanism for CD4+ (T4) lymphocyte depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(19):7727-7731.

(275) Gunthard HF, Wong JK, Spina CA, Ignacio C, Kwok S, Christopherson C et al. Effect of influenza vaccination on viral replication and immune response in persons infected with human immunodeficiency virus receiving potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2000; 181(2):522-531.

(276) Staprans SI, Hamilton BL, Follansbee SE, Elbeik T, Barbosa P, Grant RM et al. Activation of virus replication after vaccination of HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1995; 182(6):1727-1737.

(277) Stanley SK, Ostrowski MA, Justement JS, Gantt K, Hedayati S, Mannix M et al. Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1996; 334(19):1222-1230.

(278) Hadler SC, Judson FN, O'Malley PM, Altman NL, Penley K, Buchbinder S et al. Outcome of hepatitis B virus infection in homosexual men and its relation to prior human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1991; 163(3):454-459.

(279) Pape JW, Jean SS, Ho JL, Hafner A, Johnson WD, Jr. Effect of isoniazid prophylaxis on incidence of active tuberculosis and progression of HIV infection. *Lancet* 1993; 342(8866):268-272.

(280) Nurmi T, Koskela P. Immunosuppressive effect of pneumococcal vaccine contaminated with blood-group-A-like substance. *Lancet* 1988; 1(8588):771.

(281) Ruder H, Kerling F, Daniel V, Korn K, Wassmuth R. Decreased alloreactivity after vaccination against hepatitis B. *Transplantation* 1995; 59(9):1339-1342.

(282) Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, Ahearn JM, Cuomo PJ, Sherry B et al. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* 1996; 273(5272):228-231.

(283) Ho DD. HIV-1 viraemia and influenza. *Lancet* 1992; 339(8808):1549.

- (284) Rosok B, Voltersvik P, Bjerknes R, Axelsson M, Haaheim LR, Asjo B. Dynamics of HIV-1 replication following influenza vaccination of HIV+ individuals. *Clin Exp Immunol* 1996; 104(2):203-207.
- (285) Kolber MA, Gabr AH, De La RA, Glock JA, Jayaweera D, Miller N et al. Genotypic analysis of plasma HIV-1 RNA after influenza vaccination of patients with previously undetectable viral loads. *AIDS* 2002; 16(4):537-542.
- (286) Brichacek B, Swindells S, Janoff EN, Pirruccello S, Stevenson M. Increased plasma human immunodeficiency virus type 1 burden following antigenic challenge with pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174(6):1191-1199.
- (287) O'Brien WA, Grovit-Ferbas K, Namazi A, Ovcak-Derzic S, Wang HJ, Park J et al. Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood* 1995; 86(3):1082-1089.
- (288) Ramilo O, Hicks PJ, Borvak J, Gross LM, Zhong D, Squires JE et al. T cell activation and human immunodeficiency virus replication after influenza immunization of infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(3):197-203.
- (289) Tasker SA, O'Brien WA, Treanor JJ, Weiss PJ, Olson PE, Kaplan AH et al. Effects of influenza vaccination in HIV-infected adults: a double-blind, placebo-controlled trial. *Vaccine* 1998; 16(9-10):1039-1042.
- (290) Glesby MJ, Hoover DR, Farzadegan H, Margolick JB, Saah AJ. The effect of influenza vaccination on human immunodeficiency virus type 1 load: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 1996; 174(6):1332-1336.
- (291) Jackson CR, Vavro CL, Valentine ME, Pennington KN, Lanier ER, Katz SL et al. Effect of influenza immunization on immunologic and virologic characteristics of pediatric patients infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16(2):200-204.
- (292) Fowke KR, D'Amico R, Chernoff DN, Pottage JC, Jr., Benson CA, Sha BE et al. Immunologic and virologic evaluation after influenza vaccination of HIV-1-infected patients. *AIDS* 1997; 11(8):1013-1021.

- (293) Donovan RM, Moore E, Bush CE, Markowitz NP, Saravolatz LD. Changes in plasma HIV RNA levels and CD4 cell counts after vaccination of pediatric patients. *AIDS* 1997; 11(8):1054-1056.
- (294) Rich JD, Merriman NA, Mylonakis E, Greenough TC, Flanigan TP, Mady BJ et al. Misdiagnosis of HIV infection by HIV-1 plasma viral load testing: a case series. *Ann Intern Med* 1999; 130(1):37-39.
- (295) Macias J, Pineda JA, Leal M, Abad MA, Delgado J, Rosa R et al. HIV-1 plasma viremia not increased in patients receiving highly active antiretroviral therapy after influenza vaccination. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(1):46-48.
- (296) Pinto LA, Blazevic V, Anderson SA, Venzon DJ, Trubey CM, Rowe T et al. Influenza virus-stimulated generation of anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity after influenza vaccination in HIV-infected individuals and healthy control subjects. *J Infect Dis* 2001; 183(7):1000-1008.
- (297) Pinto LA, Blazevic V, Patterson BK, Mac TC, Dolan MJ, Shearer GM. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication prior to reverse transcription by influenza virus stimulation. *J Virol* 2000; 74(10):4505-4511.
- (298) Katzenstein TL, Gerstoft J, Nielsen H. Assessments of plasma HIV RNA and CD4 cell counts after combined Pneumovax and tetanus toxoid vaccination: no detectable increase in HIV replication 6 weeks after immunization. *Scand J Infect Dis* 1996; 28(3):239-241.
- (299) Tasker SA, Treanor JJ, Paxton WB, Wallace MR. Efficacy of influenza vaccination in HIV-infected persons. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1999; 131(6):430-433.
- (300) Sullivan PS, Hanson DL, Dworkin MS, Jones JL, Ward JW. Effect of influenza vaccination on disease progression among HIV-infected persons. *AIDS* 2000; 14(17):2781-2785.
- (301) Gutierrez F, Maestre A, Manuel RJ, Masia M, Escolano C, Hidalgo AM. [Influenza vaccination of human immunodeficiency virus-infected patients with severe immunodepression. Impact on CD4 lymphocytes and plasma viral load]. *Med Clin (Barc)* 2001; 117(11):410-412.

- (302) Skiest DJ, Machala T. Comparison of the effects of acute influenza infection and Influenza vaccination on HIV viral load and CD4 cell counts. *J Clin Virol* 2003; 26(3):307-315.
- (303) Zanetti AR, Amendola A, Besana S, Boschini A, Tanzi E. Safety and immunogenicity of influenza vaccination in individuals infected with HIV. *Vaccine* 2002; 20 Suppl 5:B29-B32.
- (304) Iorio AM, Francisci D, Camilloni B, Stagni G, De Martino M, Toneatto D et al. Antibody responses and HIV-1 viral load in HIV-1-seropositive subjects immunised with either the MF59-adjuvanted influenza vaccine or a conventional non-adjuvanted subunit vaccine during highly active antiretroviral therapy. *Vaccine* 2003; 21(25-26):3629-3637.
- (305) Fuller JD, Craven DE, Steger KA, Cox N, Heeren TC, Chernoff D. Influenza vaccination of human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults: impact on plasma levels of HIV type 1 RNA and determinants of antibody response. *Clin Infect Dis* 1999; 28(3):541-547.
- (306) Amendola A, Tanzi E, Zappa A, Colzani D, Boschini A, Musher DM et al. Safety and immunogenicity of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in HIV-1 infected former drug users. *Vaccine* 2002; 20(31-32):3720-3724.
- (307) Santos J, Palacios R, Ruiz J, Gonzalez M, Marquez M. Comparative trial of the effect of pneumococcal vaccine on viral load and CD4+ lymphocytes in asymptomatic and antiretrovirally naive HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(6):488-489.
- (308) Goetz MB, Feikin DR, Lennox JL, O'Brien WA, Elie CM, Butler JC et al. Viral load response to a pneumococcal conjugate vaccine, polysaccharide vaccine or placebo among HIV-infected patients. *AIDS* 2002; 16(10):1421-1423.
- (309) Kemper CA, Haubrich R, Frank I, Dubin G, Buscarino C, McCutchan JA et al. Safety and immunogenicity of hepatitis A vaccine in human immunodeficiency virus-infected patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 2003; 187(8):1327-1331.
- (310) Wallace MR, Brandt CJ, Earhart KC, Kuter BJ, Grosso AD, Lakkis H et al. Safety and immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine among HIV-infected subjects. *Clin Infect Dis* 2004; 39(8):1207-1213.

- (311) Laurence JC. Hepatitis A and B immunizations of individuals infected with human immunodeficiency virus. *Am J Med* 2005; 118 Suppl 10A:75S-83S.
- (312) Fonquernie L, Meynard JL, Charrois A, Delamare C, Meyohas MC, Frottier J. Occurrence of acute hepatitis A in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2001; 32(2):297-299.
- (313) Ridolfo AL, Rusconi S, Antinori S, Balotta C, Galli M. Persisting HIV-1 replication triggered by acute hepatitis A virus infection. *Antivir Ther* 2000; 5(1):15-17.
- (314) Ida S, Tachikawa N, Nakajima A, Daikoku M, Yano M, Kikuchi Y et al. Influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on acute hepatitis A virus infection. *Clin Infect Dis* 2002; 34(3):379-385.
- (315) Costa-Mattioli M, Allavena C, Poirier AS, Billaudel S, Raffi F, Ferre V. Prolonged hepatitis A infection in an HIV-1 seropositive patient. *J Med Virol* 2002; 68(1):7-11.
- (316) Wallace MR, Hill HE, Tasker SA, Miller LK. Hepatitis A in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1998; 27(3):651-653.
- (317) Hess G, Clemens R, Bienzle U, Schonfeld C, Schunck B, Bock HL. Immunogenicity and safety of an inactivated hepatitis A vaccine in anti-HIV positive and negative homosexual men. *J Med Virol* 1995; 46(1):40-42.
- (318) Tilzey AJ, Palmer SJ, Harrington C, O'Doherty MJ. Hepatitis A vaccine responses in HIV-positive persons with haemophilia. *Vaccine* 1996; 14(11):1039-1041.
- (319) Neilsen GA, Bodsworth NJ, Watts N. Response to hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected homosexual men. *J Infect Dis* 1997; 176(4):1064-1067.
- (320) Santagostino E, Gringeri A, Rocino A, Zanetti A, de Biasi R, Mannucci PM. Patterns of immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine in anti-HIV positive and negative hemophilic patients. *Thromb Haemost* 1994; 72(4):508-510.
- (321) Valdez H, Smith KY, Landay A, Connick E, Kuritzkes DR, Kessler H et al. Response to immunization with recall and neoantigens after prolonged administration of an HIV-1 protease

inhibitor-containing regimen. ACTG 375 team. AIDS Clinical Trials Group. AIDS 2000; 14(1):11-21.

(322) Shire NJ, Welge JA, Sherman KE. Efficacy of inactivated hepatitis A vaccine in HIV-infected patients: a hierarchical bayesian meta-analysis. Vaccine 2006; 24(3):272-279.

(323) Weissman S, Feucht C, Moore BA. Response to hepatitis A vaccine in HIV-positive patients. J Viral Hepat 2006; 13(2):81-86.

(324) Lederman HM, Williams PL, Wu JW, Evans TG, Cohn SE, McCutchan JA et al. Incomplete immune reconstitution after initiation of highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected patients with severe CD4+ cell depletion. J Infect Dis 2003; 188(12):1794-1803.

(325) Bodsworth NJ, Neilsen GA, Donovan B. The effect of immunization with inactivated hepatitis A vaccine on the clinical course of HIV-1 infection: 1-year follow-up. AIDS 1997; 11(6):747-749.

(326) Gouvea AF, Moraes-Pinto MI, Ono E, Dinelli MI, Machado DM, Weckx LY et al. Immunogenicity and tolerability of hepatitis A vaccine in HIV-infected children. Clin Infect Dis 2005; 41(4):544-548.

(327) Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R, Jr., Phair J, Visscher B, Munoz A et al. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). Lancet 2002; 360(9349):1921-1926.

(328) Scharschmidt BF, Held MJ, Hollander HH, Read AE, Lavine JE, Veereman G et al. Hepatitis B in patients with HIV infection: relationship to AIDS and patient survival. Ann Intern Med 1992; 117(10):837-838.

(329) Puoti M, Airoldi M, Bruno R, Zanini B, Spinetti A, Pezzoli C et al. Hepatitis B virus co-infection in human immunodeficiency virus-infected subjects. AIDS Rev 2002; 4(1):27-35.

(330) Kellerman SE, Hanson DL, McNaghten AD, Fleming PL. Prevalence of chronic hepatitis B and incidence of acute hepatitis B infection in human immunodeficiency virus-infected subjects. J Infect Dis 2003; 188(4):571-577.

- (331) Lascar RM, Lopes AR, Gilson RJ, Dunn C, Johnstone R, Copas A et al. Effect of HIV infection and antiretroviral therapy on hepatitis B virus (HBV)-specific T cell responses in patients who have resolved HBV infection. *J Infect Dis* 2005; 191(7):1169-1179.
- (332) Colin JF, Cazals-Hatem D, Lioriot MA, Martinot-Peignoux M, Pham BN, Auperin A et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on chronic hepatitis B in homosexual men. *Hepatology* 1999; 29(4):1306-1310.
- (333) Carr A, Cooper DA. Restoration of immunity to chronic hepatitis B infection in HIV-infected patient on protease inhibitor. *Lancet* 1997; 349(9057):995-996.
- (334) Horvath J, Raffanti SP. Clinical aspects of the interactions between human immunodeficiency virus and the hepatotropic viruses. *Clin Infect Dis* 1994; 18(3):339-347.
- (335) Chang JJ, Wightman F, Bartholomeusz A, Ayres A, Kent SJ, Sasadeusz J et al. Reduced hepatitis B virus (HBV)-specific CD4+ T-cell responses in human immunodeficiency virus type 1-HBV-coinfected individuals receiving HBV-active antiretroviral therapy. *J Virol* 2005; 79(5):3038-3051.
- (336) Lincoln D, Petoumenos K, Dore GJ. HIV/HBV and HIV/HCV coinfection, and outcomes following highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2003; 4(3):241-249.
- (337) Thio CL. Natural history of hepatitis B in coinfecting persons. First International Workshop on HIV and Hepatitis Coinfection; Amsterdam, Netherlands. Book of Abstracts. 2004.
- (338) Carne CA. ABC of AIDS. Neurological manifestations. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; 294(6584):1399-1401.
- (339) Drake JH, Parmley RT, Britton HA. Loss of hepatitis B antibody in human immunodeficiency virus-positive hemophilia patients. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6(11):1051-1054.
- (340) Bruguera M, Cremades M, Salinas R, Costa J, Grau M, Sans J. Impaired response to recombinant hepatitis B vaccine in HIV-infected persons. *J Clin Gastroenterol* 1992; 14(1):27-30.

- (341) Collier AC, Corey L, Murphy VL, Handsfield HH. Antibody to human immunodeficiency virus (HIV) and suboptimal response to hepatitis B vaccination. *Ann Intern Med* 1988; 109(2):101-105.
- (342) Keet IP, van Doornum G, Safary A, Coutinho RA. Insufficient response to hepatitis B vaccination in HIV-positive homosexual men. *AIDS* 1992; 6(5):509-510.
- (343) Wong EK, Bodsworth NJ, Slade MA, Mulhall BP, Donovan B. Response to hepatitis B vaccination in a primary care setting: influence of HIV infection, CD4+ lymphocyte count and vaccination schedule. *Int J STD AIDS* 1996; 7(7):490-494.
- (344) Zanetti AR, Mannucci PM, Tanzi E, Moroni GA, De Paschale M, Morfini M et al. Hepatitis B vaccination of 113 hemophiliacs: lower antibody response in anti-LAV/HTLV-III-positive patients. *Am J Hematol* 1986; 23(4):339-345.
- (345) Mannucci PM, Zanetti AR, Gringeri A, Tanzi E, Morfini M, Messori A et al. Long-term immunogenicity of a plasma-derived hepatitis B vaccine in HIV seropositive and HIV seronegative hemophiliacs. *Arch Intern Med* 1989; 149(6):1333-1337.
- (346) Biggar RJ, Goedert JJ, Hoofnagle J. Accelerated loss of antibody to hepatitis B surface antigen among immunodeficient homosexual men infected with HIV. *N Engl J Med* 1987; 316(10):630-631.
- (347) Leroux-Roels G, Van Hecke E, Michiels W, Voet P, Hauser P, Petre J. Correlation between in vivo humoral and in vitro cellular immune responses following immunization with hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccines. *Vaccine* 1994; 12(9):812-818.
- (348) Tedaldi EM, Baker RK, Moorman AC, Wood KC, Fuhrer J, McCabe RE et al. Hepatitis A and B vaccination practices for ambulatory patients infected with HIV. *Clin Infect Dis* 2004; 38(10):1478-1484.
- (349) Postel N, Wolf E, Bucberger A, et al. Anti-HBV vaccination in HIV infection: successful only with CD4 count >500/mL combined with a viral load below 1000 cps/mL. First International Workshop on HIV and Hepatitis Coinfection; Amsterdam, Netherlands. Book of Abstracts. 2004.

(350) Fonseca MO, Pang LW, de Paula CN, Barone AA, Heloisa LM. Randomized trial of recombinant hepatitis B vaccine in HIV-infected adult patients comparing a standard dose to a double dose. *Vaccine* 2005; 23(22):2902-2908.

(351) Gandhi RT, Wurcel A, Lee H, McGovern B, Shopis J, Geary M et al. Response to hepatitis B vaccine in HIV-1-positive subjects who test positive for isolated antibody to hepatitis B core antigen: implications for hepatitis B vaccine strategies. *J Infect Dis* 2005; 191(9):1435-1441.

(352) Rey D, Krantz V, Partisani M, Schmitt MP, Meyer P, Libbrecht E et al. Increasing the number of hepatitis B vaccine injections augments anti-HBs response rate in HIV-infected patients. Effects on HIV-1 viral load. *Vaccine* 2000; 18(13):1161-1165.

(353) Filion LG, Saginur R. Induction of the in vitro anti-HBs response by hepatitis B surface antigen. *Clin Exp Immunol* 1988; 74(3):321-325.

(354) Neuzil KM, Reed GW, Mitchel EF, Jr., Griffin MR. Influenza-associated morbidity and mortality in young and middle-aged women. *JAMA* 1999; 281(10):901-907.

(355) Lin JC, Nichol KL. Excess mortality due to pneumonia or influenza during influenza seasons among persons with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 2001; 161(3):441-446.

(356) Safrin S, Rush JD, Mills J. Influenza in patients with human immunodeficiency virus infection. *Chest* 1990; 98(1):33-37.

(357) Radwan HM, Cheeseman SH, Lai KK, Ellison III RT. Influenza in human immunodeficiency virus-infected patients during the 1997-1998 influenza season. *Clin Infect Dis* 2000; 31(2):604-606.

(358) Fine AD, Bridges CB, De Guzman AM, Glover L, Zeller B, Wong SJ et al. Influenza A among patients with human immunodeficiency virus: an outbreak of infection at a residential facility in New York City. *Clin Infect Dis* 2001; 32(12):1784-1791.

(359) Cohen JP, Macauley C. Susceptibility to influenza A in HIV-positive patients. *JAMA* 1989; 261(2):245.

- (360) Chadwick EG, Chang G, Decker MD, Yogev R, Dimichele D, Edwards KM. Serologic response to standard inactivated influenza vaccine in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13(3):206-211.
- (361) Huang KL, Ruben FL, Rinaldo CR, Jr., Kingsley L, Lyter DW, Ho M. Antibody responses after influenza and pneumococcal immunization in HIV-infected homosexual men. *JAMA* 1987; 257(15):2047-2050.
- (362) Kroon FP, van Dissel JT, de Jong JC, Zwinderman K, van Furth R. Antibody response after influenza vaccination in HIV-infected individuals: a consecutive 3-year study. *Vaccine* 2000; 18(26):3040-3049.
- (363) Miotti PG, Nelson KE, Dallabetta GA, Farzadegan H, Margolick J, Clements ML. The influence of HIV infection on antibody responses to a two-dose regimen of influenza vaccine. *JAMA* 1989; 262(6):779-783.
- (364) Kroon FP, Rimmelzwaan GF, Roos MT, Osterhaus AD, Hamann D, Miedema F et al. Restored humoral immune response to influenza vaccination in HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1998; 12(17):F217-F223.
- (365) Malaspina A, Moir S, Orsega SM, Vasquez J, Miller NJ, Donoghue ET et al. Compromised B cell responses to influenza vaccination in HIV-infected individuals. *J Infect Dis* 2005; 191(9):1442-1450.
- (366) Yamanaka H, Teruya K, Tanaka M, Kikuchi Y, Takahashi T, Kimura S et al. Efficacy and immunologic responses to influenza vaccine in HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39(2):167-173.
- (367) Huengsberg M, Chakraverty MP, Cooper G, Shahmanesh M. Response to influenza immunisation in asymptomatic HIV infected men. *Genitourin Med* 1995; 71(6):355-357.
- (368) Gabutti G, Guido M, Durando P, De Donno A, Quattrocchi M, Bacilieri S et al. Safety and immunogenicity of conventional subunit and MF59-adjuvanted influenza vaccines in human immunodeficiency virus-1-seropositive patients. *J Int Med Res* 2005; 33(4):406-416.

- (369) Ranieri R, Veronelli A, Santambrogio C, Pontiroli AE. Impact of influenza vaccine on response to vaccination with pneumococcal vaccine in HIV patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21(5):407-409.
- (370) Nettles RE, Kieffer TL, Kwon P, Monie D, Han Y, Parsons T et al. Intermittent HIV-1 viremia (Blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA* 2005; 293(7):817-829.
- (371) von Seidlein L, Gillette SG, Bryson Y, Frederick T, Mascola L, Church J et al. Frequent recurrence and persistence of varicella-zoster virus infections in children infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Pediatr* 1996; 128(1):52-57.
- (372) Prevention of varicella. Update recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1999; 48(RR-6):1-5.
- (373) Derryck A, LaRussa P, Steinberg S, Capasso M, Pitt J, Gershon AA. Varicella and zoster in children with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(10):931-933.
- (374) Wallace MR, Hooper DG, Pyne JM, Graves SJ, Malone JL. Varicella immunity and clinical disease in HIV-infected adults. *South Med J* 1994; 87(1):74-76.
- (375) Gershon AA. Prevention and treatment of VZV infections in patients with HIV. *Herpes* 2001; 8(2):32-36.
- (376) Gershon AA, Mervish N, LaRussa P, Steinberg S, Lo SH, Hodes D et al. Varicella-zoster virus infection in children with underlying human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1997; 176(6):1496-1500.
- (377) Veenstra J, Krol A, van Praag RM, Frissen PH, Schellekens PT, Lange JM et al. Herpes zoster, immunological deterioration and disease progression in HIV-1 infection. *AIDS* 1995; 9(10):1153-1158.
- (378) Levin MJ, Gershon AA, Weinberg A, Blanchard S, Nowak B, Palumbo P et al. Immunization of HIV-infected children with varicella vaccine. *J Pediatr* 2001; 139(2):305-310.

- (379) LaRussa P, Steinberg S, Gershon AA. Varicella vaccine for immunocompromised children: results of collaborative studies in the United States and Canada. *J Infect Dis* 1996; 174 Suppl 3:S320-S323.
- (380) Levin MJ, Gershon AA, Weinberg A, Song LY, Fentin T, Nowak B. Administration of live varicella vaccine to HIV-infected children with current or past significant depression of CD4(+) T cells. *J Infect Dis* 2006; 194(2):247-255.
- (381) Armenian SH, Han JY, Dunaway TM, Church JA. Safety and immunogenicity of live varicella virus vaccine in children with human immunodeficiency virus type 1. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(4):368-370.
- (382) Kramer JM, LaRussa P, Tsai WC, Carney P, Leber SM, Gahagan S et al. Disseminated vaccine strain varicella as the acquired immunodeficiency syndrome-defining illness in a previously undiagnosed child. *Pediatrics* 2001; 108(2):E39.
- (383) Hardy I, Gershon AA, Steinberg SP, LaRussa P. The incidence of zoster after immunization with live attenuated varicella vaccine. A study in children with leukemia. Varicella Vaccine Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1991; 325(22):1545-1550.
- (384) Levin MJ, Barber D, Goldblatt E, Jones M, LaFleur B, Chan C et al. Use of a live attenuated varicella vaccine to boost varicella-specific immune responses in seropositive people 55 years of age and older: duration of booster effect. *J Infect Dis* 1998; 178 Suppl 1:S109-S112.
- (385) Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE, Gelb LD et al. A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med* 2005; 352(22):2271-2284.
- (386) Berkelhamer S, Borock E, Elsen C, Englund J, Johnson D. Effect of highly active antiretroviral therapy on the serological response to additional measles vaccinations in human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Infect Dis* 2001; 32(7):1090-1094.
- (387) Palumbo P, Hoyt L, Demasio K, Oleske J, Connor E. Population-based study of measles and measles immunization in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11(12):1008-1014.

- (388) Markowitz LE, Chandler FW, Roldan EO, Saldana MJ, Roach KC, Hutchins SS et al. Fatal measles pneumonia without rash in a child with AIDS. *J Infect Dis* 1988; 158(2):480-483.
- (389) Krasinski K, Borkowsky W. Measles and measles immunity in children infected with human immunodeficiency virus. *JAMA* 1989; 261(17):2512-2516.
- (390) Kaplan LJ, Daum RS, Smaron M, McCarthy CA. Severe measles in immunocompromised patients. *JAMA* 1992; 267(9):1237-1241.
- (391) Wallace MR, Hooper DG, Graves SJ, Malone JL. Measles seroprevalence and vaccine response in HIV-infected adults. *Vaccine* 1994; 12(13):1222-1224.
- (392) Arpadi SM, Markowitz LE, Baughman AL, Shah K, Adam H, Wiznia A et al. Measles antibody in vaccinated human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Pediatrics* 1996; 97(5):653-657.
- (393) Oshitani H, Suzuki H, Mpabalwani ME, Mizuta K, Numazaki Y. Measles case fatality by sex, vaccination status, and HIV-1 antibody in Zambian children. *Lancet* 1996; 348(9024):415.
- (394) Frenkel LM, Nielsen K, Garakian A, Cherry JD. A search for persistent measles, mumps, and rubella vaccine virus in children with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148(1):57-60.
- (395) Lima M, De Menezes Succi RC, Nunes Dos Santos AM, Weckx LY, De Moraes-Pinto MI. Rubella immunization in human immunodeficiency virus type 1-infected children: cause for concern in vaccination strategies. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(7):604-607.
- (396) Watson JC, Hadler SC, Dykewicz CA, Reef S, Phillips L. Measles, mumps, and rubella--vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella syndrome and control of mumps: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1998; 47(RR-8):1-57.
- (397) Monafu WJ, Haslam DB, Roberts RL, Zaki SR, Bellini WJ, Coffin CM. Disseminated measles infection after vaccination in a child with a congenital immunodeficiency. *J Pediatr* 1994; 124(2):273-276.

- (398) Mawhinney H, Allen IV, Beare JM, Bridges JM, Connolly JH, Haire M et al. Dysgammaglobulinaemia complicated by disseminated measles. *Br Med J* 1971; 2(758):380-381.
- (399) Angel JB, Walpita P, Lerch RA, Sidhu MS, Masurekar M, DeLellis RA et al. Vaccine-associated measles pneumonitis in an adult with AIDS. *Ann Intern Med* 1998; 129(2):104-106.
- (400) Goon P, Cohen B, Jin L, Watkins R, Tudor-Williams G. MMR vaccine in HIV-infected children -- potential hazards? *Vaccine* 2001; 19(28-29):3816-3819.
- (401) McLaughlin M, Thomas P, Onorato I, Rubinstein A, Oleske J, Nicholas S et al. Live virus vaccines in human immunodeficiency virus-infected children: a retrospective survey. *Pediatrics* 1988; 82(2):229-233.
- (402) Control and prevention of rubella: evaluation and management of suspected outbreaks, rubella in pregnant women, and surveillance for congenital rubella syndrome. *MMWR Recomm Rep* 2001; 50(RR-12):1-23.
- (403) Janoff EN, Breiman RF, Daley CL, Hopewell PC. Pneumococcal disease during HIV infection. Epidemiologic, clinical, and immunologic perspectives. *Ann Intern Med* 1992; 117(4):314-324.
- (404) Hirschtick RE, Glassroth J, Jordan MC, Wilcosky TC, Wallace JM, Kvale PA et al. Bacterial pneumonia in persons infected with the human immunodeficiency virus. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333(13):845-851.
- (405) Gilks CF, Ojoo SA, Ojoo JC, Brindle RJ, Paul J, Batchelor BI et al. Invasive pneumococcal disease in a cohort of predominantly HIV-1 infected female sex-workers in Nairobi, Kenya. *Lancet* 1996; 347(9003):718-723.
- (406) Janoff EN, Rubins JB. Invasive pneumococcal disease in the immunocompromised host. *Microb Drug Resist* 1997; 3(3):215-232.
- (407) Hibbs JR, Douglas JM, Jr., Judson FN, McGill WL, Rietmeijer CA, Janoff EN. Prevalence of human immunodeficiency virus infection, mortality rate, and serogroup distribution among patients with pneumococcal bacteremia at Denver General Hospital, 1984-1994. *Clin Infect Dis* 1997; 25(2):195-199.

- (408) Crewe-Brown HH, Karstaedt AS, Saunders GL, Khoosal M, Jones N, Wasas A et al. Streptococcus pneumoniae blood culture isolates from patients with and without human immunodeficiency virus infection: alterations in penicillin susceptibilities and in serogroups or serotypes. Clin Infect Dis 1997; 25(5):1165-1172.
- (409) Bartlett JG. Pneumonia in the patient with HIV infection. Infect Dis Clin North Am 1998; 12(3):807-20, xi.
- (410) Mundy LM, Auwaerter PG, Oldach D, Warner ML, Burton A, Vance E et al. Community-acquired pneumonia: impact of immune status. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152(4 Pt 1):1309-1315.
- (411) Redd SC, Rutherford GW, III, Sande MA, Lifson AR, Hadley WK, Facklam RR et al. The role of human immunodeficiency virus infection in pneumococcal bacteremia in San Francisco residents. J Infect Dis 1990; 162(5):1012-1017.
- (412) Stoneburner RL, Des J, Benezra D, Gorelkin L, Sotheran JL, Friedman SR et al. A larger spectrum of severe HIV-1--related disease in intravenous drug users in New York City. Science 1988; 242(4880):916-919.
- (413) Boschini A, Smacchia C, Di Fine M, Schiesari A, Ballarini P, Arlotti M et al. Community-acquired pneumonia in a cohort of former injection drug users with and without human immunodeficiency virus infection: incidence, etiologies, and clinical aspects. Clin Infect Dis 1996; 23(1):107-113.
- (414) Rodriguez-Barradas MC, Tharapel RA, Groover JE, Giron KP, Lacke CE, Houston ED et al. Colonization by Streptococcus pneumoniae among human immunodeficiency virus-infected adults: prevalence of antibiotic resistance, impact of immunization, and characterization by polymerase chain reaction with BOX primers of isolates from persistent S. pneumoniae carriers. J Infect Dis 1997; 175(3):590-597.
- (415) Dworkin MS, Ward JW, Hanson DL, Jones JL, Kaplan JE. Pneumococcal disease among human immunodeficiency virus-infected persons: incidence, risk factors, and impact of vaccination. Clin Infect Dis 2001; 32(5):794-800.
- (416) Rodriguez-Barradas MC, Musher DM, Lahart C, Lacke C, Groover J, Watson D et al. Antibody to capsular polysaccharides of Streptococcus pneumoniae after vaccination of human

immunodeficiency virus-infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1992; 165(3):553-556.

(417) Subramaniam KS, Segal R, Lyles RH, Rodriguez-Barradas MC, Pirofski LA. Qualitative change in antibody responses of human immunodeficiency virus-infected individuals to pneumococcal capsular polysaccharide vaccination associated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003; 187(5):758-768.

(418) Janoff EN, Douglas JM, Jr., Gabriel M, Blaser MJ, Davidson AJ, Cohn DL et al. Class-specific antibody response to pneumococcal capsular polysaccharides in men infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1988; 158(5):983-990.

(419) Rodriguez-Barradas MC, Groover JE, Lacke CE, Gump DW, Lahart CJ, Pandey JP et al. IgG antibody to pneumococcal capsular polysaccharide in human immunodeficiency virus-infected subjects: persistence of antibody in responders, revaccination in nonresponders, and relationship of immunoglobulin allotype to response. *J Infect Dis* 1996; 173(6):1347-1353.

(420) Falco V, Jordano Q, Cruz MJ, Len O, Ribera E, Campins M et al. Serological response to pneumococcal vaccination in HAART-treated HIV-infected patients: one year follow-up study. *Vaccine* 2006; 24(14):2567-2574.

(421) Unsworth DJ, Rowen D, Carne C, Sonnex C, Baglin T, Brown DL. Defective IgG2 response to Pneumovax in HIV seropositive patients. *Genitourin Med* 1993; 69(5):373-376.

(422) Vandenbruaene M, Colebunders R, Mascart-Lemone F, Haerden Y, Van Hove D, Peeters M et al. Equal IgG antibody response to pneumococcal vaccination in all stages of human immunodeficiency virus disease. *J Infect Dis* 1995; 172(2):551-553.

(423) Rodriguez-Barradas MC, Alexandraki I, Nazir T, Foltzer M, Musher DM, Brown S et al. Response of human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy to vaccination with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Infect Dis* 2003; 37(3):438-447.

(424) Janoff EN, Fasching C, Ojoo JC, O'Brien J, Gilks CF. Responsiveness of human immunodeficiency virus type 1-infected Kenyan women with or without prior pneumococcal disease to pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1997; 175(4):975-978.

- (425) French N, Gilks CF, Mujugira A, Fasching C, O'Brien J, Janoff EN. Pneumococcal vaccination in HIV-1-infected adults in Uganda: humoral response and two vaccine failures. *AIDS* 1998; 12(13):1683-1689.
- (426) Opravil M, Fierz W, Matter L, Blaser J, Luthy R. Poor antibody response after tetanus and pneumococcal vaccination in immunocompromised, HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 1991; 84(2):185-189.
- (427) Carson PJ, Schut RL, Simpson ML, O'Brien J, Janoff EN. Antibody class and subclass responses to pneumococcal polysaccharides following immunization of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1995; 172(2):340-345.
- (428) Ahmed F, Steinhoff MC, Rodriguez-Barradas MC, Hamilton RG, Musher DM, Nelson KE. Effect of human immunodeficiency virus type 1 infection on the antibody response to a glycoprotein conjugate pneumococcal vaccine: results from a randomized trial. *J Infect Dis* 1996; 173(1):83-90.
- (429) Gibb D, Spoulou V, Giacomelli A, Griffiths H, Masters J, Misbah S et al. Antibody responses to Haemophilus influenzae type b and Streptococcus pneumoniae vaccines in children with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14(2):129-135.
- (430) Loeliger AE, Rijkers GT, Aerts P, Been-Tiktak A, Hoepelman AI, van Dijk H et al. Deficient antipneumococcal polysaccharide responses in HIV-seropositive patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 12(1):33-41.
- (431) Mascart-Lemone F, Gerard M, Libin M, Crusiaux A, Franchioly P, Lambrechts A et al. Differential effect of human immunodeficiency virus infection on the IgA and IgG antibody responses to pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* 1995; 172(5):1253-1260.
- (432) Nielsen H, Kvinesdal B, Benfield TL, Lundgren JD, Konradsen HB. Rapid loss of specific antibodies after pneumococcal vaccination in patients with human immunodeficiency virus-1 infection. *Scand J Infect Dis* 1998; 30(6):597-601.
- (433) Tasker SA, Wallace MR, Rubins JB, Paxton WB, O'Brien J, Janoff EN. Reimmunization with 23-valent pneumococcal vaccine for patients infected with human immunodeficiency virus type 1: clinical, immunologic, and virologic responses. *Clin Infect Dis* 2002; 34(6):813-821.

- (434) Hung CC, Chen MY, Hsieh SM, Hsiao CF, Sheng WH, Chang SC. Clinical experience of the 23-valent capsular polysaccharide pneumococcal vaccination in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: a prospective observational study. *Vaccine* 2004; 22(15-16):2006-2012.
- (435) Gebo KA, Moore RD, Keruly JC, Chaisson RE. Risk factors for pneumococcal disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1996; 173(4):857-862.
- (436) Breiman RF, Keller DW, Phelan MA, Sniadack DH, Stephens DS, Rimland D et al. Evaluation of effectiveness of the 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine for HIV-infected patients. *Arch Intern Med* 2000; 160(17):2633-2638.
- (437) Flannery B, Heffernan RT, Harrison LH, Ray SM, Reingold AL, Hadler J et al. Changes in invasive Pneumococcal disease among HIV-infected adults living in the era of childhood pneumococcal immunization. *Ann Intern Med* 2006; 144(1):1-9.
- (438) Guerrero M, Kruger S, Saitoh A, Sorvillo F, Cheng KJ, French C et al. Pneumonia in HIV-infected patients: a case-control survey of factors involved in risk and prevention. *AIDS* 1999; 13(14):1971-1975.
- (439) Lopez-Palomo C, Martin-Zamorano M, Benitez E, Fernandez-Gutierrez C, Guerrero F, Rodriguez-Iglesias M et al. Pneumonia in HIV-infected patients in the HAART era: incidence, risk, and impact of the pneumococcal vaccination. *J Med Virol* 2004; 72(4):517-524.
- (440) French N, Nakiyingi J, Carpenter LM, Lugada E, Watera C, Moi K et al. 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in HIV-1-infected Ugandan adults: double-blind, randomised and placebo controlled trial. *Lancet* 2000; 355(9221):2106-2111.
- (441) Shinefield HR, Black S. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines in large scale field trials. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(4):394-397.
- (442) Feikin DR, Elie CM, Goetz MB, Lennox JL, Carlone GM, Romero-Steiner S et al. Specificity of the antibody response to the pneumococcal polysaccharide and conjugate vaccines in human immunodeficiency virus-infected adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(1):137-141.

- (443) Kroon FP, van Dissel JT, Ravensbergen E, Nibbering PH, van Furth R. Antibodies against pneumococcal polysaccharides after vaccination in HIV-infected individuals: 5-year follow-up of antibody concentrations. *Vaccine* 1999; 18(5-6):524-530.
- (444) Negredo E, Domingo P, Sambeat MA, Rabella N, Vazquez G. Effect of pneumococcal vaccine on plasma HIV-1 RNA of stable patients undergoing effective highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(4):287-288.
- (445) Kroon FP, van Furth R, Bruisten SM. The effects of immunization in human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1996; 335(11):817-818.
- (446) Rosenblatt HM, Song LY, Nachman SA, Stanley KE, Krogstad PA, Johnson GM et al. Tetanus immunity after diphtheria, tetanus toxoids, and acellular pertussis vaccination in children with clinically stable HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(3):698-703.
- (447) Ryder RW, Oxtoby MJ, Mvula M, Batter V, Baende E, Nsa W et al. Safety and immunogenicity of bacille Calmette-Guerin, diphtheria-tetanus-pertussis, and oral polio vaccines in newborn children in Zaire infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Pediatr* 1993; 122(5 Pt 1):697-702.
- (448) Farber CM, Barath AA, Dieye T. The effects of immunization in human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1996; 335(11):817-819.
- (449) Broder KR, Cortese MM, Iskander JK, Kretsinger K, Slade BA, Brown KH et al. Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2006; 55(RR-3):1-34.
- (450) Casadevall A, Dobroszycki J, Small C, Pirofski LA. Haemophilus influenzae type b bacteremia in adults with AIDS and at risk for AIDS. *Am J Med* 1992; 92(6):587-590.
- (451) Dockrell DH, Poland GA, Mitchell PS, Wollan PC, Smith TF, Persing DH et al. Effect of Haemophilus influenzae type B immunization on HIV viremia in HIV-seropositive adults. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18(5):512-513.

(452) De Sousa dos SS, Lopes MH, Simonsen V, Caiaffa Filho HH. Haemophilus influenzae type b immunization in adults infected with the human immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20(5):493-496.

(453) Ammann AJ, Schiffman G, Abrams D, Volberding P, Ziegler J, Conant M. B-cell immunodeficiency in acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 1984; 251(11):1447-1449.

(454) Madhi SA, Petersen K, Khoosal M, Huebner RE, Mbelle N, Mothupi R et al. Reduced effectiveness of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in children with a high prevalence of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21(4):315-321.

(455) Madhi SA, Kuwanda L, Saarinen L, Cutland C, Mothupi R, Kayhty H et al. Immunogenicity and effectiveness of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in HIV infected and uninfected African children. *Vaccine* 2005; 23(48-49):5517-5525.

(456) Read JS, Frasch CE, Rich K, Fitzgerald GA, Clemens JD, Pitt J et al. The immunogenicity of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines in children born to human immunodeficiency virus-infected women. *Women and Infants Transmission Study Group. Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(5):391-397.

(457) 2001 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *HIV Clin Trials* 2001; 2(6):493-554.

(458) Kroon FP, van Dissel JT, Rijkers GT, Labadie J, van Furth R. Antibody response to Haemophilus influenzae type b vaccine in relation to the number of CD4+ T lymphocytes in adults infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1997; 25(3):600-606.

(459) Kroon FP, van Dissel JT, Ravensbergen E, Nibbering PH, van Furth R. Impaired antibody response after immunization of HIV-infected individuals with the polysaccharide vaccine against Salmonella typhi (Typhim-Vi). *Vaccine* 1999; 17(23-24):2941-2945.

(460) Wilson ME, von Reyn CF, Fineberg HV. Infections in HIV-infected travelers: risks and prevention. *Ann Intern Med* 1991; 114(7):582-592.

(461) Kengsakul K, Sathirapongsasuti K, Punyagupta S. Fatal myeloencephalitis following yellow fever vaccination in a case with HIV infection. *J Med Assoc Thai* 2002; 85(1):131-134.

- (462) Tattevin P, Depatureaux AG, Chapplain JM, Dupont M, Souala F, Arvieux C et al. Yellow fever vaccine is safe and effective in HIV-infected patients. *AIDS* 2004; 18(5):825-827.
- (463) De Martino M, Podda A, Galli L, Sinangil F, Mannelli F, Rossi ME et al. Acellular pertussis vaccine in children with perinatal human immunodeficiency virus-type 1 infection. *Vaccine* 1997; 15(11):1235-1238.
- (464) Jackson LA, Cherry JD, Wang SP, Grayston JT. Frequency of serological evidence of Bordetella infections and mixed infections with other respiratory pathogens in university students with cough illnesses. *Clin Infect Dis* 2000; 31(1):3-6.
- (465) Pichichero ME, Rennels MB, Edwards KM, Blatter MM, Marshall GS, Bologna M et al. Combined tetanus, diphtheria, and 5-component pertussis vaccine for use in adolescents and adults. *JAMA* 2005; 293(24):3003-3011.
- (466) Gleeson TD, Wallace MR, Tasker SA. Vaccination in patients with HIV infection. *Curr Infect Dis Rep* 2006; 8(2):151-161.
- (467) Barbi M, Biffi MR, Binda S, Clerici-Schoeller M, Ferraris G, Luraschi C et al. Immunization in children with HIV seropositivity at birth: antibody response to polio vaccine and tetanus toxoid. *AIDS* 1992; 6(12):1465-1469.
- (468) Mathisen GE, Allen AD. Inactivated polio vaccine hyperimmunization in adults with HIV disease: a placebo-controlled study. *AIDS* 1992; 6(7):737-738.
- (469) Tasker SA, Schnepf GA, Lim M, Caraviello HE, Armstrong A, Bavaro M et al. Unintended smallpox vaccination of HIV-1-infected individuals in the United States military. *Clin Infect Dis* 2004; 38(9):1320-1322.
- (470) Amorosa VK, Isaacs SN. Separate worlds set to collide: smallpox, vaccinia virus vaccination, and human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2003; 37(3):426-432.
- (471) Redfield RR, Wright DC, James WD, Jones TS, Brown C, Burke DS. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *N Engl J Med* 1987; 316(11):673-676.

- (472) Zamora I, Simon JM, Da Silva ME, Piqueras AI. Attenuated varicella virus vaccine in children with renal transplants. *Pediatr Nephrol* 1994; 8(2):190-192.
- (473) Hesseling AC, Schaaf HS, Hanekom WA, Beyers N, Cotton MF, Gie RP et al. Danish bacille Calmette-Guerin vaccine-induced disease in human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Infect Dis* 2003; 37(9):1226-1233.
- (474) Armbruster C, Junker W, Vetter N, Jaksch G. Disseminated bacille Calmette-Guerin infection in an AIDS patient 30 years after BCG vaccination. *J Infect Dis* 1990; 162(5):1216.
- (475) Havlir DV, Bassett R, Levitan D, Gilbert P, Tebas P, Collier AC et al. Prevalence and predictive value of intermittent viremia with combination hiv therapy. *JAMA* 2001; 286(2):171-179.
- (476) Raboud JM, Rae S, Woods R, Harris M, Montaner JS. Consecutive rebounds in plasma viral load are associated with virological failure at 52 weeks among HIV-infected patients. *AIDS* 2002; 16(12):1627-1632.
- (477) Mira JA, Macias J, Nogales C, Fernandez-Rivera J, Garcia-Garcia JA, Ramos A et al. Transient rebounds of low-level viraemia among HIV-infected patients under HAART are not associated with virological or immunological failure. *Antivir Ther* 2002; 7(4):251-256.
- (478) Sklar PA, Ward DJ, Baker RK, Wood KC, Gafoor Z, Alzola CF et al. Prevalence and clinical correlates of HIV viremia ('blips') in patients with previous suppression below the limits of quantification. *AIDS* 2002; 16(15):2035-2041.
- (479) Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B, Staszewski S, Perrin L, Miller V et al. Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16(14):1967-1969.
- (480) Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997; 337(11):734-739.
- (481) Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human

immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 1997; 337(11):725-733.

(482) Wong JK, Gunthard HF, Havlir DV, Zhang ZQ, Haase AT, Ignacio CC et al. Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(23):12574-12579.

(483) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(24):13193-13197.

(484) Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5(5):512-517.

(485) Kepler TB, Perelson AS. Drug concentration heterogeneity facilitates the evolution of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(20):11514-11519.

(486) Hermankova M, Ray SC, Ruff C, Powell-Davis M, Ingersoll R, D'Aquila RT et al. HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *JAMA* 2001; 286(2):196-207.

(487) Zhang H, Dornadula G, Beumont M, Livornese L, Jr., Van Uitert B, Henning K et al. Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1998; 339(25):1803-1809.

(488) Enting RH, Hoetelmans RM, Lange JM, Burger DM, Beijnen JH, Portegies P. Antiretroviral drugs and the central nervous system. *AIDS* 1998; 12(15):1941-1955.

(489) Zhu T, Wang N, Carr A, Nam DS, Moor-Jankowski R, Cooper DA et al. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol* 1996; 70(5):3098-3107.

(490) Bartlett JG, Lane HC, and the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. 6-10-2006.

- (491) Raboud JM, Montaner JS, Conway B, Rae S, Reiss P, Vella S et al. Suppression of plasma viral load below 20 copies/ml is required to achieve a long-term response to therapy. *AIDS* 1998; 12(13):1619-1624.
- (492) Raboud JM, Rae S, Hogg RS, Yip B, Sherlock CH, Harrigan PR et al. Suppression of plasma virus load below the detection limit of a human immunodeficiency virus kit is associated with longer virologic response than suppression below the limit of quantitation. *J Infect Dis* 1999; 180(4):1347-1350.
- (493) de Mendoza C, Soriano V, Perez-Olmeda M, Rodes B, Casas E, Gonzalez-Lahoz J. Different outcomes in patients achieving complete or partial viral load suppression on antiretroviral therapy. *J Hum Virol* 1999; 2(6):344-349.
- (494) Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Guatelli JC, Riggs NL, Havlir DV et al. Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol* 1998; 72(3):2422-2428.
- (495) Powderly WG, Saag MS, Chapman S, Yu G, Quart B, Clendeninn NJ. Predictors of optimal virological response to potent antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(14):1873-1880.
- (496) Kempf DJ, Rode RA, Xu Y, Sun E, Heath-Chiozzi ME, Valdes J et al. The duration of viral suppression during protease inhibitor therapy for HIV-1 infection is predicted by plasma HIV-1 RNA at the nadir. *AIDS* 1998; 12(5):F9-14.
- (497) Havlir DV, Marschner IC, Hirsch MS, Collier AC, Tebas P, Bassett RL et al. Maintenance antiretroviral therapies in HIV infected patients with undetectable plasma HIV RNA after triple-drug therapy. AIDS Clinical Trials Group Study 343 Team. *N Engl J Med* 1998; 339(18):1261-1268.
- (498) Reijers MH, Weverling GJ, Jurriaans S, Wit FW, Weigel HM, Ten Kate RW et al. Maintenance therapy after quadruple induction therapy in HIV-1 infected individuals: Amsterdam Duration of Antiretroviral Medication (ADAM) study. *Lancet* 1998; 352(9123):185-190.
- (499) Pialoux G, Raffi F, Brun-Vezinet F, Meiffredy V, Flandre P, Gastaut JA et al. A randomized trial of three maintenance regimens given after three months of induction therapy with zidovudine, lamivudine, and indinavir in previously untreated HIV-1-infected patients.

Trilege (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 072) Study Team. *N Engl J Med* 1998; 339(18):1269-1276.

(500) Mocroft A, Gill MJ, Davidson W, Phillips AN. Predictors of a viral response and subsequent virological treatment failure in patients with HIV starting a protease inhibitor. *AIDS* 1998; 12(16):2161-2167.

(501) Paredes R, Mocroft A, Kirk O, Lazzarin A, Barton SE, van Lunzen J et al. Predictors of virological success and ensuing failure in HIV-positive patients starting highly active antiretroviral therapy in Europe: results from the EuroSIDA study. *Arch Intern Med* 2000; 160(8):1123-1132.

(502) Wit FW, van Leeuwen R, Weverling GJ, Jurriaans S, Nauta K, Steingrover R et al. Outcome and predictors of failure of highly active antiretroviral therapy: one-year follow-up of a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected persons. *J Infect Dis* 1999; 179(4):790-798.

(503) Grabar S, Pradier C, Le Corfec E, Lancar R, Allavena C, Bentata M et al. Factors associated with clinical and virological failure in patients receiving a triple therapy including a protease inhibitor. *AIDS* 2000; 14(2):141-149.

(504) Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, Squier C et al. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med* 2000; 133(1):21-30.

(505) O'Brien TR, McDermott DH, Ioannidis JP, Carrington M, Murphy PM, Havlir DV et al. Effect of chemokine receptor gene polymorphisms on the response to potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14(7):821-826.

(506) Gunthard HF, Frost SD, Leigh-Brown AJ, Ignacio CC, Kee K, Perelson AS et al. Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J Virol* 1999; 73(11):9404-9412.

(507) Martinez-Picado J, DePasquale MP, Kartsonis N, Hanna GJ, Wong J, Finzi D et al. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(20):10948-10953.

- (508) Hockett RD, Kilby JM, Derdeyn CA, Saag MS, Sillers M, Squires K et al. Constant mean viral copy number per infected cell in tissues regardless of high, low, or undetectable plasma HIV RNA. *J Exp Med* 1999; 189(10):1545-1554.
- (509) Dornadula G, Zhang H, VanUitert B, Stern J, Livornese L, Jr., Ingerman MJ et al. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA* 1999; 282(17):1627-1632.
- (510) Coffin J, Maldarelli F, Palmer S, Weigand A, Brun S, Kempf D et al. Long-term persistence of low-level HIV-1 in patients on suppressive antiretroviral therapy. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infections, Denver, CO, USA; Book of abstracts. 2006.
- (511) Sharkey ME, Teo I, Greenough T, Sharova N, Luzuriaga K, Sullivan JL et al. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000; 6(1):76-81.
- (512) Di Mascio M, Markowitz M, Louie M, Hogan C, Hurley A, Chung C et al. Viral blip dynamics during highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003; 77(22):12165-12172.
- (513) Hellinger J. HIV blip synching: get the timing right. *Clin Infect Dis* 2005; 41(9):1333-1334.
- (514) Cohen Stuart JW, Wensing AM, Kovacs C, Righart M, de Jong D, Kaye S et al. Transient relapses ("blips") of plasma HIV RNA levels during HAART are associated with drug resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 28(2):105-113.
- (515) Moore AL, Youle M, Lipman M, Cozzi-Lepri A, Lampe F, Madge S et al. Raised viral load in patients with viral suppression on highly active antiretroviral therapy: transient increase or treatment failure? *AIDS* 2002; 16(4):615-618.
- (516) Nettles RE, Kieffer TL, Simmons RP, Cofrancesco J, Jr., Moore RD, Gallant JE et al. Genotypic resistance in HIV-1-infected patients with persistently detectable low-level viremia while receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 39(7):1030-1037.

(517) Jackson JB, Piwowar-Manning E, Johnson-Lewis L, Bassett R, Demeter LM, Brambilla D. Comparison of versions 1.0 AND 1.5 of the UltraSensitive AMPLICOR HIV-1 MONITOR test for subjects with low viral load. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6):2774-2776.

(518) Brambilla D, Reichelderfer PS, Bremer JW, Shapiro DE, Hershov RC, Katzenstein DA et al. The contribution of assay variation and biological variation to the total variability of plasma HIV-1 RNA measurements. The Women Infant Transmission Study Clinics. *Virology Quality Assurance Program. AIDS* 1999; 13(16):2269-2279.

(519) Schockmel GA, Yerly S, Perrin L. Detection of low HIV-1 RNA levels in plasma. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14(2):179-183.

(520) Owens DK, Holodniy M, Garber AM, Scott J, Sonnad S, Moses L et al. Polymerase chain reaction for the diagnosis of HIV infection in adults. A meta-analysis with recommendations for clinical practice and study design. *Ann Intern Med* 1996; 124(9):803-815.

(521) Percus JK, Percus OE, Markowitz M, Ho DD, Di MM, Perelson AS. The distribution of viral blips observed in HIV-1 infected patients treated with combination antiretroviral therapy. *Bull Math Biol* 2003; 65(2):263-277.

(522) Stosor V, Palella FJ, Jr., Berzins B, Till M, Leake A, Chmiel JS et al. Transient viremia in HIV-infected patients and use of plasma preparation tubes. *Clin Infect Dis* 2005; 41(11):1671-1674.

(523) Giordano M, Kelleher T, Colonna RJ, Lazzarin A, Squires K. The effects of the Roche AMPLICOR HIV-1 MONITOR UltraSensitive Test versions 1.0 and 1.5 viral load assays and plasma collection tube type on determination of response to antiretroviral therapy and the inappropriateness of cross-study comparisons. *J Clin Virol* 2006; 35(4):420-425.

(524) Rainen L, Salimnia F, Fairfax M, et al. Sample handling parameters affecting performance of BD vacutainer PPT™ and plus K2EDTA tubes with the Roche AMPLICOR™ and COBAS AMPLICOR™ HIV-1 MONITOR1 test, v1.5 UltraSensitive and Standard specimen processing procedures. BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA. www.bd.com. Released 3 March 2005.

(525) Orendi JM, Bloem AC, Borleffs JC, Wijnholds FJ, de Vos NM, Nottet HS et al. Activation and cell cycle antigens in CD4+ and CD8+ T cells correlate with plasma human

immunodeficiency virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection. *J Infect Dis* 1998; 178(5):1279-1287.

(526) Goletti D, Weissman D, Jackson RW, Graham NM, Vlahov D, Klein RS et al. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol* 1996; 157(3):1271-1278.

(527) Kovacs JA, Baseler M, Dewar RJ, Vogel S, Davey RT, Jr., Falloon J et al. Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study. *N Engl J Med* 1995; 332(9):567-575.

(528) Karlsson AC, Younger SR, Martin JN, Grossman Z, Sinclair E, Hunt PW et al. Immunologic and virologic evolution during periods of intermittent and persistent low-level viremia. *AIDS* 2004; 18(7):981-989.

(529) Pantaleo G. How immune-based interventions can change HIV therapy. *Nat Med* 1997; 3(5):483-486.

(530) Havlir DV, Strain MC, Clerici M, Ignacio C, Trabattoni D, Ferrante P et al. Productive infection maintains a dynamic steady state of residual viremia in human immunodeficiency virus type 1-infected persons treated with suppressive antiretroviral therapy for five years. *J Virol* 2003; 77(20):11212-11219.

(531) Ramratnam B, Ribeiro R, He T, Chung C, Simon V, Vanderhoeven J et al. Intensification of antiretroviral therapy accelerates the decay of the HIV-1 latent reservoir and decreases, but does not eliminate, ongoing virus replication. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 35(1):33-37.

(532) Easterbrook PJ, Ives N, Waters A, Mullen J, O'Shea S, Peters B et al. The natural history and clinical significance of intermittent viraemia in patients with initial viral suppression to < 400 copies/ml. *AIDS* 2002; 16(11):1521-1527.

(533) Miller LG, Golin CE, Liu H, Hays RD, Hua J, Wenger NS et al. No evidence of an association between transient HIV viremia ("Blips") and lower adherence to the antiretroviral medication regimen. *J Infect Dis* 2004; 189(8):1487-1496.

(534) Sungkanuparph S, Overton ET, Seyfried W, Groger RK, Fraser VJ, Powderly WG. Intermittent episodes of detectable HIV viremia in patients receiving nonnucleoside reverse-

transcriptase inhibitor-based or protease inhibitor-based highly active antiretroviral therapy regimens are equivalent in incidence and prognosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41(9):1326-1332.

(535) Di Mascio M, Markowitz M, Louie M, Hurley A, Hogan C, Simon V et al. Dynamics of intermittent viremia during highly active antiretroviral therapy in patients who initiate therapy during chronic versus acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2004; 78(19):10566-10573.

(536) Ostrowski SR, Katzenstein TL, Thim PT, Pedersen BK, Gerstoft J, Ullum H. Low-level viremia and proviral DNA impede immune reconstitution in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2005; 191(3):348-357.

(537) Martinez V, Marcelin AG, Morini JP, Deleuze J, Krivine A, Gorin I et al. HIV-1 intermittent viraemia in patients treated by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimen. *AIDS* 2005; 19(10):1065-1069.

(538) Ortiz GM, Hu J, Goldwitz JA, Chandwani R, Larsson M, Bhardwaj N et al. Residual viral replication during antiretroviral therapy boosts human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses in subjects treated early after infection. *J Virol* 2002; 76(1):411-415.

(539) Haubrich R, Best B, Witt M., et al. Determinants of the need for therapeutic drug monitoring: rates and predictors from CCTG 578. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, MA, USA. 4-2-2005.

(540) Low-Beer S, Yip B, O'Shaughnessy MV, Hogg RS, Montaner JS. Adherence to triple therapy and viral load response. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23(4):360-361.

(541) Bangsberg DR, Hecht FM, Charlebois ED, Zolopa AR, Holodniy M, Sheiner L et al. Adherence to protease inhibitors, HIV-1 viral load, and development of drug resistance in an indigent population. *AIDS* 2000; 14(4):357-366.

(542) Gifford AL, Bormann JE, Shively MJ, Wright BC, Richman DD, Bozzette SA. Predictors of self-reported adherence and plasma HIV concentrations in patients on multidrug antiretroviral regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23(5):386-395.

(543) Altice FL, Friedland GH. The era of adherence to HIV therapy. *Ann Intern Med* 1998; 129(6):503-505.

- (544) Liu H, Golin CE, Miller LG, Hays RD, Beck CK, Sanandaji S et al. A comparison study of multiple measures of adherence to HIV protease inhibitors. *Ann Intern Med* 2001; 134(10):968-977.
- (545) Jones LE, Perelson AS. Opportunistic infection as a cause of transient viremia in chronically infected HIV patients under treatment with HAART. *Bull Math Biol* 2005; 67(6):1227-1251.
- (546) Holodniy M, Mole L, Winters M, Merigan TC. Diurnal and short-term stability of HIV virus load as measured by gene amplification. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7(4):363-368.
- (547) Deeks SG, Coleman RL, White R, Pahl C, Schambelan M, Chernoff DN et al. Variance of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA levels measured by branched DNA within and between days. *J Infect Dis* 1997; 176(2):514-517.
- (548) Waters L, Stebbing J, Jones R, Mandalia S, Bower M, Stefanovic M et al. The effect of statins on HIV rebound and blips. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39(5):637-638.
- (549) MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Tebas P, Higgins TJ, Baine Y et al. Plasmid vaccination of stable HIV-positive subjects on antiviral treatment results in enhanced CD8 T-cell immunity and increased control of viral "blips". *Vaccine* 2005; 23(17-18):2066-2073.
- (550) Pappasavvas E, Kostman JR, Thiel B, Pistilli M, Mackiewicz A, Foulkes A et al. HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses in chronically HIV-1 infected blippers on antiretroviral therapy in relation to viral replication following treatment interruption. *J Clin Immunol* 2006; 26(1):40-54.
- (551) Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F et al. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000; 6(1):82-85.
- (552) Di Mascio M, Ribeiro RM, Markowitz M, Ho DD, Perelson AS. Modeling the long-term control of viremia in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy. *Math Biosci* 2004; 188:47-62.

- (553) Di Mascio M, Percus JK, Percus OE, Markowitz M, Ho DD, Perelson AS. Duration of an intermittent episode of viremia. *Bull Math Biol* 2005; 67(4):885-900.
- (554) Macias J, Palomares JC, Mira JA, Torres MJ, Garcia-Garcia JA, Rodriquez JM et al. Transient rebounds of HIV plasma viremia are associated with the emergence of drug resistance mutations in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Infect* 2005; 51(3):195-200.
- (555) Alatrakchi N, Duvivier C, Costagliola D, Samri A, Marcelin A, Kamkamidze G et al. Persistent low viral load on antiretroviral therapy is associated with T cell-mediated control of HIV replication. *AIDS* 2005; 19(1):25-33.
- (556) Grossman Z, Feinberg MB, Paul WE. Multiple modes of cellular activation and virus transmission in HIV infection: a role for chronically and latently infected cells in sustaining viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(11):6314-6319.
- (557) Grossman Z, Polis M, Feinberg MB, Grossman Z, Levi I, Jankelevich S et al. Ongoing HIV dissemination during HAART. *Nat Med* 1999; 5(10):1099-1104.
- (558) Bisset LR, Cone RW, Huber W, Battegay M, Vernazza PL, Weber R et al. Highly active antiretroviral therapy during early HIV infection reverses T-cell activation and maturation abnormalities. *Swiss HIV Cohort Study. AIDS* 1998; 12(16):2115-2123.
- (559) Mammano F, Petit C, Clavel F. Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *J Virol* 1998; 72(9):7632-7637.
- (560) Goudsmit J, de Ronde A, de Rooij E, de Boer R. Broad spectrum of in vivo fitness of human immunodeficiency virus type 1 subpopulations differing at reverse transcriptase codons 41 and 215. *J Virol* 1997; 71(6):4479-4484.
- (561) Montaner JS, Reiss P, Cooper D, Vella S, Harris M, Conway B et al. A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients: the INCAS Trial. Italy, The Netherlands, Canada and Australia Study. *JAMA* 1998; 279(12):930-937.

- (562) Gartland M. AVANTI 3: a randomized, double-blind trial to compare the efficacy and safety of lamivudine plus zidovudine versus lamivudine plus zidovudine plus nelfinavir in HIV-1-infected antiretroviral-naive patients. *Antivir Ther* 2001; 6(2):127-134.
- (563) Aleman S, Soderbarg K, Visco-Comandini U, Sitbon G, Sonnerborg A. Drug resistance at low viraemia in HIV-1-infected patients with antiretroviral combination therapy. *AIDS* 2002; 16(7):1039-1044.
- (564) Piketty C, Weiss L, Thomas F, Mohamed AS, Belec L, Kazatchkine MD. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen. *J Infect Dis* 2001; 183(9):1328-1335.
- (565) Ledergerber B, Lundgren JD, Walker AS, Sabin C, Justice A, Reiss P et al. Predictors of trend in CD4-positive T-cell count and mortality among HIV-1-infected individuals with virological failure to all three antiretroviral-drug classes. *Lancet* 2004; 364(9428):51-62.
- (566) Raffanti SP, Fusco JS, Sherrill BH, Hansen NI, Justice AC, D'Aquila R et al. Effect of persistent moderate viremia on disease progression during HIV therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 37(1):1147-1154.
- (567) Barbour JD, Wrin T, Grant RM, Martin JN, Segal MR, Petropoulos CJ et al. Evolution of phenotypic drug susceptibility and viral replication capacity during long-term virologic failure of protease inhibitor therapy in human immunodeficiency virus-infected adults. *J Virol* 2002; 76(21):11104-11112.
- (568) Vandamme AM, Houyez F, Banhegyi D, Clotet B, De Schrijver G, De Smet KA et al. Laboratory guidelines for the practical use of HIV drug resistance tests in patient follow-up. *Antivir Ther* 2001; 6(1):21-39.
- (569) Parkin NT, Deeks SG, Wrin MT, Yap J, Grant RM, Lee KH et al. Loss of antiretroviral drug susceptibility at low viral load during early virological failure in treatment-experienced patients. *AIDS* 2000; 14(18):2877-2887.
- (570) Spits H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(10):760-772.

- (571) Sempowski G, Thomasch J, Gooding M, Hale L, Edwards L, Ciafaloni E et al. Effect of thymectomy on human peripheral blood T cell pools in myasthenia gravis. *J Immunol* 2001; 166(4):2808-2817.
- (572) Teixeira L, Valdez H, McCune JM, Koup RA, Badley AD, Hellerstein MK et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS* 2001; 15(14):1749-1756.
- (573) Viard JP, Mocroft A, Chiesi A, Kirk O, Roge B, Panos G et al. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *J Infect Dis* 2001; 183(8):1290-1294.
- (574) Bertho JM, Demarquay C, Moulian N, Van Der MA, Berrih-Aknin S, Gourmelon P. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell Immunol* 1997; 179(1):30-40.
- (575) Clerici M, Saresella M, Trabattoni D, Ferrante P, Vanzulli A, Vigano A. Thymic volume predicts long-term immune reconstitution in HIV-infected children treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16(16):2219-2221.
- (576) Delgado J, Leal M, Ruiz-Mateos E, Martinez-Moya M, Rubio A, Merchante E et al. Evidence of thymic function in heavily antiretroviral-treated human immunodeficiency virus type 1-infected adults with long-term virologic treatment failure. *J Infect Dis* 2002; 186(3):410-414.
- (577) Franco JM, Rubio A, Martinez-Moya M, Leal M, Merchante E, Sanchez-Quijano A et al. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood* 2002; 99(10):3702-3706.
- (578) McCune JM, Loftus R, Schmidt DK, Carroll P, Webster D, Swor-Yim LB et al. High prevalence of thymic tissue in adults with human immunodeficiency virus-1 infection. *J Clin Invest* 1998; 101(11):2301-2308.
- (579) Smith KY, Valdez H, Landay A, Spritzler J, Kessler HA, Connick E et al. Thymic size and lymphocyte restoration in patients with human immunodeficiency virus infection after 48 weeks of zidovudine, lamivudine, and ritonavir therapy. *J Infect Dis* 2000; 181(1):141-147.

(580) Vigano A, Vella S, Saresella M, Vanzulli A, Bricalli D, Di FS et al. Early immune reconstitution after potent antiretroviral therapy in HIV-infected children correlates with the increase in thymus volume. *AIDS* 2000; 14(3):251-261.

(581) Lempicki RA, Kovacs JA, Baseler MW, Adelsberger JW, Dewar RL, Natarajan V et al. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25):13778-13783.

(582) Lewin SR, Ribeiro RM, Kaufmann GR, Smith D, Zaunders J, Law M et al. Dynamics of T cells and TCR excision circles differ after treatment of acute and chronic HIV infection. *J Immunol* 2002; 169(8):4657-4666.

(583) de la Rosa R, Leal M, Rubio A, Martinez-Moya M, Delgado J, Ruiz-Mateos E et al. Baseline thymic volume is a predictor for CD4 T cell repopulation in adult HIV-infected patients under highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2002; 7(3):159-163.

(584) Andrew D, Aspinall R. Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production. *Exp Gerontol* 2002; 37(2-3):455-463.

(585) Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:529-560.

(586) Clark DR, de Boer RJ, Wolthers KC, Miedema F. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Adv Immunol* 1999; 73:301-327.

(587) Choyke PL, Zeman RK, Gootenberg JE, Greenberg JN, Hoffer F, Frank JA. Thymic atrophy and regrowth in response to chemotherapy: CT evaluation. *AJR Am J Roentgenol* 1987; 149(2):269-272.

(588) Kolte L, Strandberg C, Dreves AM, Ersboll AK, Jeppesen DL, Ryder LP et al. Thymic involvement in immune recovery during antiretroviral treatment of HIV infection in adults; comparison of CT and sonographic findings. *Scand J Infect Dis* 2002; 34(9):668-672.

(589) Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing

receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol* 1993; 150(3):1105-1121.

(590) Mclean AR, Michie CA. In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(9):3707-3711.

(591) Bell EB, Sparshott SM. Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cells in vivo. *Nature* 1990; 348(6297):163-166.

(592) Wills MR, Carmichael AJ, Weekes MP, Mynard K, Okecha G, Hicks R et al. Human virus-specific CD8⁺ CTL clones revert from CD45RO^{high} to CD45RA^{high} in vivo: CD45RA^{high}CD8⁺ T cells comprise both naive and memory cells. *J Immunol* 1999; 162(12):7080-7087.

(593) Romanyukha AA, Yashin AI. Age related changes in population of peripheral T cells: towards a model of immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 2003; 124(4):433-443.

(594) Heitger A, Neu N, Kern H, Panzer-Grumayer ER, Greinix H, Nachbaur D et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA⁺) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90(2):850-857.

(595) Arellano MV, Ordonez A, Ruiz-Mateos E, Leal-Noval SR, Molina-Pinelo S, Hernandez A et al. Thymic function-related markers within the thymus and peripheral blood: Are they comparable? *J Clin Immunol* 2006; 26(1):96-100.

(596) Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol* 1996; 16(2):609-618.

(597) Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med* 2001; 79(11):631-640.

(598) Markert ML, Boeck A, Hale LP, Kloster AL, McLaughlin TM, Batchvarova MN et al. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *N Engl J Med* 1999; 341(16):1180-1189.

- (599) Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA et al. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med* 2000; 6(9):1036-1042.
- (600) Hatzakis A, Touloumi G, Karanicolos R, Karafoulidou A, Mandalaki T, Anastassopoulou C et al. Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease. *Lancet* 2000; 355(9204):599-604.
- (601) Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002; 195(6):789-794.
- (602) Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N et al. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity* 2004; 21(6):757-768.
- (603) Douek D. Thymic output and HIV infection: on the right TREC. *Immunity* 2004; 21(6):744-745.
- (604) Hazra R, Mackall C. Thymic function in HIV infection. *Curr HIV /AIDS Rep* 2005; 2(1):24-28.
- (605) Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C et al. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med* 1998; 4(2):215-221.
- (606) Hardy G, Worrell S, Hayes P, Barnett CM, Glass D, Pido-Lopez J et al. Evidence of thymic reconstitution after highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *HIV Med* 2004; 5(2):67-73.
- (607) Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:265-304.
- (608) Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA et al. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol* 2001; 167(11):6663-6668.

- (609) Sempowski GD, Hicks CB, Eron JJ, Bartlett JA, Hale LP, Ferrari G et al. Naive T cells are maintained in the periphery during the first 3 months of acute HIV-1 infection: implications for analysis of thymus function. *J Clin Immunol* 2005; 25(5):462-472.
- (610) Arron ST, Ribeiro RM, Gettie A, Bohm R, Blanchard J, Yu J et al. Impact of thymectomy on the peripheral T cell pool in rhesus macaques before and after infection with simian immunodeficiency virus. *Eur J Immunol* 2005; 35(1):46-55.
- (611) Reyes RA, Canfield DR, Esser U, Adamson LA, Brown CR, Cheng-Mayer C et al. Induction of simian AIDS in infant rhesus macaques infected with. *J Virol* 2004; 78(4):2121-2130.
- (612) Schmitt N, Chene L, Boutolleau D, Nugeyre MT, Guillemard E, Versmisse P et al. Positive regulation of CXCR4 expression and signaling by interleukin-7 in CD4+ mature thymocytes correlates with their capacity to favor human immunodeficiency X4 virus replication. *J Virol* 2003; 77(10):5784-5793.
- (613) Lee JC, Boechat MI, Belzer M, Church JA, De Ville J, Nielsen K et al. Thymic volume, T-cell populations, and parameters of thymopoiesis in adolescent and adult survivors of HIV infection acquired in infancy. *AIDS* 2006; 20(5):667-674.
- (614) Manfredi R. HIV infection and advanced age emerging epidemiological, clinical, and management issues. *Ageing Res Rev* 2004; 3(1):31-54.
- (615) Graham DB, Bell MP, Huntoon CJ, Weaver JG, Hawley N, Badley AD et al. Increased thymic output in HIV-negative patients after antiretroviral therapy. *AIDS* 2005; 19(14):1467-1472.
- (616) Fernandez S, Nolan RC, Price P, Krueger R, Wood C, Cameron D et al. Thymic function in severely immunodeficient HIV type 1-infected patients receiving stable and effective antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22(2):163-170.
- (617) Mussini C, Pinti M, Borghi V, Nasi M, Amorico G, Monterastelli E et al. Features of 'CD4-exploders', HIV-positive patients with an optimal immune reconstitution after potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16(12):1609-1616.

- (618) Klein F, Feldhahn N, Lee S, Wang H, Ciuffi F, von Elstermann M et al. T lymphoid differentiation in human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(11):6747-6752.
- (619) Collins C, Norris S, McEntee G, Traynor O, Bruno L, von Boehmer H et al. RAG1, RAG2 and pre-T cell receptor alpha chain expression by adult human hepatic T cells: evidence for extrathymic T cell maturation. *Eur J Immunol* 1996; 26(12):3114-3118.
- (620) Bas A, Hammarstrom SG, Hammarstrom ML. Extrathymic TCR gene rearrangement in human small intestine: identification of new splice forms of recombination activating gene-1 mRNA with selective tissue expression. *J Immunol* 2003; 171(7):3359-3371.
- (621) Guy-Grand D, Azogui O, Celli S, Darche S, Nussenzweig MC, Kourilsky P et al. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med* 2003; 197(3):333-341.
- (622) Kalayjian RC, Spritzler J, Pu M, Landay A, Pollard RB, Stocker V et al. Distinct mechanisms of T cell reconstitution can be identified by estimating thymic volume in adult HIV-1 disease. *J Infect Dis* 2005; 192(9):1577-1587.
- (623) Ruiz-Mateos E, Rubio A, Vallejo A, De la RR, Sanchez-Quijano A, Lissen E et al. Thymic volume is associated independently with the magnitude of short- and long-term repopulation of CD4+ T cells in HIV-infected adults after highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin Exp Immunol* 2004; 136(3):501-506.
- (624) Deeks SG, Wrin T, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 2001; 344(7):472-480.
- (625) Stoddart CA, Liegler TJ, Mammano F, Linquist-Stepps VD, Hayden MS, Deeks SG et al. Impaired replication of protease inhibitor-resistant HIV-1 in human thymus. *Nat Med* 2001; 7(6):712-718.
- (626) Vallejo A, Valladares A, De Felipe B, Vivancos J, Gutierrez S, Soriano-Sarabia N et al. High thymic volume is associated with viral replication and immunologic impairment only early after HAART interruption in chronic HIV infection. *Viral Immunol* 2005; 18(4):740-746.

- (627) Molina-Pinelo S, Vivancos J, De Felipe B, Soriano-Sarabia N, Valladares A, De la RR et al. Thymic volume predicts CD4 T-cell decline in HIV-infected adults under prolonged treatment interruption. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42(2):203-206.
- (628) Sereti I, Anthony KB, Martinez-Wilson H, Lempicki R, Adelsberger J, Metcalf JA et al. IL-2-induced CD4+ T-cell expansion in HIV-infected patients is associated with long-term decreases in T-cell proliferation. *Blood* 2004; 104(3):775-780.
- (629) Natarajan V, Lempicki RA, Sereti I, Badralmaa Y, Adelsberger JW, Metcalf JA et al. Increased peripheral expansion of naive CD4+ T cells in vivo after IL-2 treatment of patients with HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(16):10712-10717.
- (630) Lu AC, Jones EC, Chow C, Miller KD, Herpin B, Rock-Kress D et al. Increases in CD4+ T lymphocytes occur without increases in thymic size in HIV-infected subjects receiving interleukin-2 therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34(3):299-303.
- (631) Carcelain G, Saint-Mezard P, Altes HK, Tubiana R, Grenot P, Rabian C et al. IL-2 therapy and thymic production of naive CD4 T cells in HIV-infected patients with severe CD4 lymphopenia. *AIDS* 2003; 17(6):841-850.
- (632) Marchetti G, Meroni L, Varchetta S, Terzieva V, Bandera A, Manganaro D et al. Low-dose prolonged intermittent interleukin-2 adjuvant therapy: results of a randomized trial among human immunodeficiency virus-positive patients with advanced immune impairment. *J Infect Dis* 2002; 186(5):606-616.
- (633) Vigano A, Saresella M, Trabattoni D, Giacomet V, di Natale B, Merlo M et al. Growth hormone in T-lymphocyte thymic and postthymic development: a study in HIV-infected children. *J Pediatr* 2004; 145(4):542-548.
- (634) Pires A, Pido-Lopez J, Moyle G, Gazzard B, Gotch F, Imami N. Enhanced T-cell maturation, differentiation and function in HIV-1-infected individuals after growth hormone and highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2004; 9(1):67-75.
- (635) Freitas AA, Rocha B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:83-111.

- (636) Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J et al. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* 2001; 97(10):2983-2990.
- (637) Kroncke R, Loppnow H, Flad HD, Gerdes J. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur J Immunol* 1996; 26(10):2541-2544.
- (638) Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(7):3810-3815.
- (639) Komschlies KL, Gregorio TA, Gruys ME, Back TC, Faltynek CR, Wiltrout RH. Administration of recombinant human IL-7 to mice alters the composition of B-lineage cells and T cell subsets, enhances T cell function, and induces regression of established metastases. *J Immunol* 1994; 152(12):5776-5784.
- (640) Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 97(5):1491-1497.
- (641) Okamoto Y, Douek DC, McFarland RD, Koup RA. Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function. *Blood* 2002; 99(8):2851-2858.
- (642) Benjamin D, Sharma V, Knobloch TJ, Armitage RJ, Dayton MA, Goodwin RG. B cell IL-7. Human B cell lines constitutively secrete IL-7 and express IL-7 receptors. *J Immunol* 1994; 152(10):4749-4757.
- (643) Fernandez E, Vicente A, Zapata A, Brera B, Lozano JJ, Martinez C et al. Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. *Blood* 1994; 83(11):3245-3254.
- (644) Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H et al. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 1995; 95(6):2945-2953.
- (645) Ryan DH, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN. Cytokine regulation of early human lymphopoiesis. *J Immunol* 1994; 152(11):5250-5258.

- (646) Freedden-Jeffrey U, Solvason N, Howard M, Murray R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 1997; 7(1):147-154.
- (647) Huang J, Durum SK, Muegge K. Cutting edge: histone acetylation and recombination at the TCR gamma locus follows IL-7 induction. *J Immunol* 2001; 167(11):6073-6077.
- (648) Muegge K, Vila MP, Durum SK. Interleukin-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene. *Science* 1993; 261(5117):93-95.
- (649) Morrissey PJ, McKenna H, Widmer MB, Braddy S, Voice R, Charrier K et al. Steel factor (c-kit ligand) stimulates the in vitro growth of immature CD3-/CD4-/CD8- thymocytes: synergy with IL-7. *Cell Immunol* 1994; 157(1):118-131.
- (650) Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Guinter TI, Yamashita Y et al. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 2000; 13(1):59-71.
- (651) Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V, Burjanadze M, Kinet S, Taylor N. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 2003; 171(1):61-68.
- (652) Vella A, Teague TK, Ihle J, Kappler J, Marrack P. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* 1997; 186(2):325-330.
- (653) Boise LH, Minn AJ, June CH, Lindsten T, Thompson CB. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(12):5491-5495.
- (654) Li J, Huston G, Swain SL. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* 2003; 198(12):1807-1815.
- (655) Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 2003; 198(12):1797-1806.

- (656) Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 2003; 4(7):680-686.
- (657) Surh CD, Boyman O, Purton JF, Sprent J. Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev* 2006; 211:154-163.
- (658) Viret C, Wong FS, Janeway CA, Jr. Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* 1999; 10(5):559-568.
- (659) Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 2000; 1(5):426-432.
- (660) Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, Benoist C et al. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 2002; 195(12):1515-1522.
- (661) Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 2005; 174(11):6571-6576.
- (662) Hassan J, Reen DJ. Human recent thymic emigrants--identification, expansion, and survival characteristics. *J Immunol* 2001; 167(4):1970-1976.
- (663) Dardalhon V, Jaleco S, Kinet S, Herpers B, Steinberg M, Ferrand C et al. IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16):9277-9282.
- (664) Soares MV, Borthwick NJ, Maini MK, Janossy G, Salmon M, Akbar AN. IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA+ T cells enables preservation of a naive repertoire. *J Immunol* 1998; 161(11):5909-5917.
- (665) Managlia EZ, Landay A, Al Harthi L. Interleukin-7 signalling is sufficient to phenotypically and functionally prime human CD4 naive T cells. *Immunology* 2005; 114(3):322-335.

- (666) Grzegorzewski KJ, Komschlies KL, Jacobsen SE, Ruscetti FW, Keller JR, Wiltout RH. Mobilization of long-term reconstituting hematopoietic stem cells in mice by recombinant human interleukin 7. *J Exp Med* 1995; 181(1):369-374.
- (667) Schober SL, Kuo CT, Schluns KS, Lefrancois L, Leiden JM, Jameson SC. Expression of the transcription factor lung Kruppel-like factor is regulated by cytokines and correlates with survival of memory T cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999; 163(7):3662-3667.
- (668) Vivien L, Benoist C, Mathis D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* 2001; 13(6):763-768.
- (669) Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(15):8732-8737.
- (670) Seddon B, Zamoyska R. TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells. *J Immunol* 2002; 169(7):3752-3759.
- (671) Hassan J, Reen DJ. IL-7 promotes the survival and maturation but not differentiation of human post-thymic CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1998; 28(10):3057-3065.
- (672) Rathmell JC, Farkash EA, Gao W, Thompson CB. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* 2001; 167(12):6869-6876.
- (673) Morrissey PJ, Goodwin RG, Nordan RP, Anderson D, Grabstein KH, Cosman D et al. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *J Exp Med* 1989; 169(3):707-716.
- (674) Varas A, Vicente A, Sacedon R, Zapata AG. Interleukin-7 influences the development of thymic dendritic cells. *Blood* 1998; 92(1):93-100.
- (675) Ruiz-Mateos E, de la RR, Franco JM, Martinez-Moya M, Rubio A, Soriano N et al. Endogenous IL-7 is associated with increased thymic volume in adult HIV-infected patients under highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; 17(7):947-954.

- (676) Correa R, Resino S, Munoz-Fernandez MA. Increased interleukin-7 plasma levels are associated with recovery of CD4+ T cells in HIV-infected children. *J Clin Immunol* 2003; 23(5):401-406.
- (677) Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994; 180(5):1955-1960.
- (678) Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet* 1998; 20(4):394-397.
- (679) Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23(8):783-788.
- (680) Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 2001; 7(1):73-79.
- (681) Hakim FT, Gress RE. Reconstitution of the lymphocyte compartment after lymphocyte depletion: a key issue in clinical immunology. *Eur J Immunol* 2005; 35(11):3099-3102.
- (682) Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S et al. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 1990; 60(6):941-951.
- (683) Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993; 262(5141):1877-1880.
- (684) Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(3):200-208.
- (685) Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K, Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10(1):41-60.

- (686) Endrizzi BT, Jameson SC. Differential role for IL-7 in inducing lung Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 2) expression by naive versus activated T cells. *Int Immunol* 2003; 15(11):1341-1348.
- (687) Lin JX, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 1995; 2(4):331-339.
- (688) Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu ZJ et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 1994; 266(5187):1045-1047.
- (689) Cosenza L, Gorgun G, Urbano A, Foss F. Interleukin-7 receptor expression and activation in nonhaematopoietic neoplastic cell lines. *Cell Signal* 2002; 14(4):317-325.
- (690) Wilks AF, Harpur AG. Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases. *Bioessays* 1994; 16(5):313-320.
- (691) Alpdogan O, van den Brink MR. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol* 2005; 26(1):56-64.
- (692) Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003; 4(12):1191-1198.
- (693) Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, Markert ML, Williams LW, Harville TO et al. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr* 1997; 130(3):378-387.
- (694) Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, Riedy MC, Roberts JL, Aman MJ et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 1995; 270(5237):797-800.
- (695) Roifman CM, Zhang J, Chitayat D, Sharfe N. A partial deficiency of interleukin-7R alpha is sufficient to abrogate T-cell development and cause severe combined immunodeficiency. *Blood* 2000; 96(8):2803-2807.

- (696) Xue HH, Kovanen PE, Pise-Masison CA, Berg M, Radovich MF, Brady JN et al. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21):13759-13764.
- (697) Park JH, Yu Q, Erman B, Appelbaum JS, Montoya-Durango D, Grimes HL et al. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 2004; 21(2):289-302.
- (698) Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, Fan S, Visconti R, Frucht DM et al. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J Immunol* 2002; 168(5):2212-2218.
- (699) Sasson SC, Zaunders JJ, Zanetti G, King EM, Merlin KM, Smith DE et al. Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and Increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2006; 193(4):505-514.
- (700) Llano A, Barretina J, Gutierrez A, Blanco J, Cabrera C, Clotet B et al. Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J Virol* 2001; 75(21):10319-10325.
- (701) Mastroianni CM, Forcina G, D'Ettore G, Lichtner M, Mengoni F, D'Agostino C et al. Circulating levels of interleukin-7 in antiretroviral-naive and highly active antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2001; 2(2):108-112.
- (702) Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol* 2001; 22(10):564-571.
- (703) Beq S, Fontanet A, Theze J, Colle JH. IL-7 and Flt-3L plasma levels are increased during highly active antiretroviral therapy-associated IL-2 therapy. *AIDS* 2004; 18(15):2089-2091.
- (704) Beq S, Rannou MT, Fontanet A, Delfraissy JF, Theze J, Colle JH. HIV infection: pre-highly active antiretroviral therapy IL-7 plasma levels correlate with long-term CD4 cell count increase after treatment. *AIDS* 2004; 18(3):563-565.

- (705) Boulassel MR, Smith GH, Gilmore N, Klein M, Murphy T, MacLeod J et al. Interleukin-7 levels may predict virological response in advanced HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir-based therapy. *HIV Med* 2003; 4(4):315-320.
- (706) Resino S, Perez A, Leon JA, Gurbindo MD, Munoz-Fernandez MA. Interleukin-7 levels before highly active antiretroviral therapy may predict CD4+ T-cell recovery and virological failure in HIV-infected children. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(4):798-800.
- (707) Resino S, Galan I, Correa R, Pajuelo L, Bellon JM, Munoz-Fernandez MA. Homeostatic role of IL-7 in HIV-1 infected children on HAART: association with immunological and virological parameters. *Acta Paediatr* 2005; 94(2):170-177.
- (708) Darcissac EC, Vidal V, De LT, X, Mouton Y, Bahr GM. Variations in serum IL-7 and 90K/Mac-2 binding protein (Mac-2 BP) levels analysed in cohorts of HIV-1 patients and correlated with clinical changes following antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2001; 126(2):287-294.
- (709) Chiappini E, Galli L, Azzari C, De Martino M. Interleukin-7 and immunologic failure despite treatment with highly active antiretroviral therapy in children perinatally infected with HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 33(5):601-604.
- (710) Fry TJ, Moniuszko M, Creekmore S, Donohue SJ, Douek DC, Giardina S et al. IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood* 2003; 101(6):2294-2299.
- (711) Nugeyre MT, Monceaux V, Beq S, Cumont MC, Ho Tsong FR, Chene L et al. IL-7 stimulates T cell renewal without increasing viral replication in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Immunol* 2003; 171(8):4447-4453.
- (712) Muthukumar A, Zhou D, Paiardini M, Barry AP, Cole KS, McClure HM et al. Timely triggering of homeostatic mechanisms involved in the regulation of T-cell levels in SIVsm-infected sooty mangabeys. *Blood* 2005; 106(12):3839-3845.
- (713) Song H, Nakayama EE, Shioda T. Effects of human interleukin 7 on HIV-1 replication in monocyte-derived human macrophages. *AIDS* 2006; 20(6):937-939.

- (714) Smithgall MD, Wong JG, Critchett KE, Haffar OK. IL-7 up-regulates HIV-1 replication in naturally infected peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1996; 156(6):2324-2330.
- (715) Chene L, Nugeyre MT, Guillemard E, Moulian N, Barre-Sinoussi F, Israel N. Thymocyte-thymic epithelial cell interaction leads to high-level replication of human immunodeficiency virus exclusively in mature CD4(+) CD8(-) CD3(+) thymocytes: a critical role for tumor necrosis factor and interleukin-7. *J Virol* 1999; 73(9):7533-7542.
- (716) Scripture-Adams DD, Brooks DG, Korin YD, Zack JA. Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype. *J Virol* 2002; 76(24):13077-13082.
- (717) Brooks DG, Hamer DH, Arlen PA, Gao L, Bristol G, Kitchen CM et al. Molecular characterization, reactivation, and depletion of latent HIV. *Immunity* 2003; 19(3):413-423.
- (718) Wang FX, Xu Y, Sullivan J, Souder E, Argyris EG, Acheampong EA et al. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J Clin Invest* 2005; 115(1):128-137.
- (719) Managlia EZ, Landay A, Al Harthi L. Interleukin-7 induces HIV replication in primary naive T cells through a nuclear factor of activated T cell (NFAT)-dependent pathway. *Virology* 2006; 350(2):443-452.
- (720) Moran PA, Diegel ML, Sias JC, Ledbetter JA, Zarling JM. Regulation of HIV production by blood mononuclear cells from HIV-infected donors: I. Lack of correlation between HIV-1 production and T cell activation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9(5):455-464.
- (721) Steffens CM, Managlia EZ, Landay A, Al Harthi L. Interleukin-7-treated naive T cells can be productively infected by T-cell-adapted and primary isolates of human immunodeficiency virus 1. *Blood* 2002; 99(9):3310-3318.
- (722) Llano A, Barretina J, Gutierrez A, Clotet B, Este JA. Interleukin-7-dependent production of RANTES that correlates with human immunodeficiency virus disease progression. *J Virol* 2003; 77(7):4389-4395.

(723) Muthukumar A, Wozniakowski A, Gauduin MC, Paiardini M, McClure HM, Johnson RP et al. Elevated interleukin-7 levels not sufficient to maintain T-cell homeostasis during simian immunodeficiency virus-induced disease progression. *Blood* 2004; 103(3):973-979.

(724) Nunnari G, Xu Y, Acheampong EA, Fang J, Daniel R, Zhang C et al. Exogenous IL-7 induces Fas-mediated human neuronal apoptosis: potential effects during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Neurovirol* 2005; 11(4):319-328.

(725) Kopka J, Mecikovsky D, Aulicino PC, Mangano AM, Rocco CA, Bologna R et al. High IL-7 plasma levels may induce and predict the emergence of HIV-1 virulent strains in pediatric infection. *J Clin Virol* 2005; 33(3):237-242.

(726) Carini C, Essex M. Interleukin 2-independent interleukin 7 activity enhances cytotoxic immune response of HIV-1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(2):121-130.

(727) Bui T, Dykers T, Hu SL, Faltynek CR, Ho RJ. Effect of MTP-PE liposomes and interleukin-7 on induction of antibody and cell-mediated immune responses to a recombinant HIV-envelope protein. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7(8):799-806.

(728) Vingerhoets J, Bisalinkumi E, Penne G, Colebunders R, Bosmans E, Kestens L et al. Altered receptor expression and decreased sensitivity of T-cells to the stimulatory cytokines IL-2, IL-7 and IL-12 in HIV infection. *Immunol Lett* 1998; 61(1):53-61.

(729) Boutboul F, Puthier D, Appay V, Pelle O, Ait-Mohand H, Combadiere B et al. Modulation of interleukin-7 receptor expression characterizes differentiation of CD8 T cells specific for HIV, EBV and CMV. *AIDS* 2005; 19(17):1981-1986.

(730) MacPherson PA, Fex C, Sanchez-Dardon J, Hawley-Foss N, Angel JB. Interleukin-7 receptor expression on CD8(+) T cells is reduced in HIV infection and partially restored with effective antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 28(5):454-457.

(731) Colle JH, Moreau JL, Fontanet A, Lambotte O, Joussemet M, Delfraissy JF et al. CD127 expression and regulation are altered in the memory CD8 T cells of HIV-infected patients--reversal by highly active anti-retroviral therapy (HAART). *Clin Exp Immunol* 2006; 143(3):398-403.

(732) Colle JH, Moreau JL, Fontanet A, Lambotte O, Joussemet M, Jacod S et al. Regulatory dysfunction of the interleukin-7 receptor in CD4 and CD8 lymphocytes from HIV-infected patients--effects of antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42(3):277-285.

(733) Rethi B, Fluor C, Atlas A, Krzyzowska M, Mowafi F, Grutzmeier S et al. Loss of IL-7Ralpha is associated with CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. *AIDS* 2005; 19(18):2077-2086.

(734) Koesters SA, Alimonti JB, Wachihi C, Matu L, Anzala O, Kimani J et al. IL-7Ralpha expression on CD4+ T lymphocytes decreases with HIV disease progression and inversely correlates with immune activation. *Eur J Immunol* 2006; 36(2):336-344.

(735) Foxwell BM, Taylor-Fishwick DA, Simon JL, Page TH, Londei M. Activation induced changes in expression and structure of the IL-7 receptor on human T cells. *Int Immunol* 1992; 4(2):277-282.

(736) Giorgi JV, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 52(1):10-18.

(737) Chun TW, Engel D, Mizell SB, Ehler LA, Fauci AS. Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J Exp Med* 1998; 188(1):83-91.

(738) Nunnari G, Pomerantz RJ. IL-7 as a potential therapy for HIV-1-infected individuals. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5(11):1421-1426.

(739) Prins JM, Jurriaans S, van Praag RM, Blaak H, van Rij R, Schellekens PT et al. Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(17):2405-2410.

(740) Fraser C, Ferguson NM, Ghani AC, Prins JM, Lange JM, Goudsmit J et al. Reduction of the HIV-1-infected T-cell reservoir by immune activation treatment is dose-dependent and restricted by the potency of antiretroviral drugs. *AIDS* 2000; 14(6):659-669.

(741) Lafeuillade A, Poggi C, Chadapaud S, Hittinger G, Chouraqui M, Pisapia M et al. Pilot study of a combination of highly active antiretroviral therapy and cytokines to induce HIV-1 remission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26(1):44-55.

- (742) Storek J, Gillespy T, III, Lu H, Joseph A, Dawson MA, Gough M et al. Interleukin-7 improves CD4 T-cell reconstitution after autologous CD34 cell transplantation in monkeys. *Blood* 2003; 101(10):4209-4218.
- (743) Morrissey PJ, Conlon P, Charrier K, Braddy S, Alpert A, Williams D et al. Administration of IL-7 to normal mice stimulates B-lymphopoiesis and peripheral lymphadenopathy. *J Immunol* 1991; 147(2):561-568.
- (744) Sempowski GD, Gooding ME, Liao HX, Le PT, Haynes BF. T cell receptor excision circle assessment of thymopoiesis in aging mice. *Mol Immunol* 2002; 38(11):841-848.
- (745) Alpdogan O, Schmaltz C, Muriglian SJ, Kappel BJ, Perales MA, Rotolo JA et al. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* 2001; 98(7):2256-2265.
- (746) Moniuszko M, Fry T, Tsai WP, Morre M, Assouline B, Cortez P et al. Recombinant interleukin-7 induces proliferation of naive macaque CD4+ and CD8+ T cells in vivo. *J Virol* 2004; 78(18):9740-9749.
- (747) Pett SL, Emery S. Immunomodulators as adjunctive therapy for HIV-1 infection. *J Clin Virol* 2001; 22(3):289-295.
- (748) Beq S, Nugeyre MT, Ho Tsong FR, Gautier D, Legrand R, Schmitt N et al. IL-7 induces immunological improvement in SIV-infected rhesus macaques under antiviral therapy. *J Immunol* 2006; 176(2):914-922.
- (749) Audige A, Schlaepfer E, Joller H, Speck RF. Uncoupled anti-HIV and immune-enhancing effects when combining IFN-alpha and IL-7. *J Immunol* 2005; 175(6):3724-3736.
- (750) Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:625-656.
- (751) Miro JM, Buirra E, Mallolas J, Gallart T, Moreno A, Zamora L et al. [CD4+ lymphocytes and opportunistic infections and neoplasms in patients with human immunodeficiency virus infection]. *Med Clin (Barc)* 1994; 102(15):566-570.

(752) Garcia F, Romeu J, Grau I, Sambeat MA, Dalmau D, Knobel H et al. A randomized study comparing triple versus double antiretroviral therapy or no treatment in HIV-1-infected patients in very early stage disease: the Spanish Earth-1 study. *AIDS* 1999; 13(17):2377-2388.

(753) Binley JM, Schiller DS, Ortiz GM, Hurley A, Nixon DF, Markowitz MM et al. The relationship between T cell proliferative responses and plasma viremia during treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with combination antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2000; 181(4):1249-1263.

(754) Kimura T, Yoshimura K, Nishihara K, Maeda Y, Matsumi S, Koito A et al. Reconstitution of spontaneous neutralizing antibody response against autologous human immunodeficiency virus during highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2002; 185(1):53-60.

(755) Haslett PA, Nixon DF, Shen Z, Larsson M, Cox WI, Manandhar R et al. Strong human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4+ T cell responses in a cohort of chronically infected patients are associated with interruptions in anti-HIV chemotherapy. *J Infect Dis* 2000; 181(4):1264-1272.

(756) Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272(5265):1167-1170.

(757) Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997; 126(12):946-954.

(758) Garcia F, Vidal C, Gatell JM, Miro JM, Cruceta A, Pumarola T. Changes in HIV-1 RNA viral load following tuberculin skin test. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18(4):398-399.

(759) McElhaney JE, Pinkoski MJ, Meneilly GS. Changes in CD45 isoform expression after influenza vaccination. *Mech Ageing Dev* 1993; 69(1-2):79-91.

(760) Libois A, Lopez A, Garcia F, Castro P, Maleno MJ, Garcia A et al. Dynamics of T Cells Subsets and Lymphoproliferative Responses During Structured Treatment Interruption Cycles

and After Definitive Interruption of HAART in Early Chronic HIV Type-1-Infected Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22(7):657-666.

(761) Feeney M, Draenert R, Roosevelt K, Tang Y, Pfafferoth K, Verrill C et al. Children but not adults mount a secondary immune response to a variant HIV-1 epitope following CTL escape. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Moscone West. San Francisco, CA, USA. Book of abstracts. 8-4-2004.

(762) Arnedo-Valero M, Garcia F, Gil C, Guila T, Fumero E, Castro P et al. Risk of selecting de novo drug-resistance mutations during structured treatment interruptions in patients with chronic HIV infection. *Clin Infect Dis* 2005; 41(6):883-890.

(763) Metzger WJ, Butler JE, Swanson P, Reinders E, Richerson HB. Amplification of the enzyme-linked immunosorbent assay for measuring allergen-specific IgE and IgG antibody. *Clin Allergy* 1981; 11(6):523-531.

(764) Siber GR, Priehs C, Madore DV. Standardization of antibody assays for measuring the response to pneumococcal infection and immunization. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8(1 Suppl):S84-S91.

(765) Rodrigo MJ, Miravittles M, Cruz MJ, de Gracia J, Vendrell M, Pascual C et al. Characterization of specific immunoglobulin G (IgG) and its subclasses (IgG1 and IgG2) against the 23-valent pneumococcal vaccine in a healthy adult population: proposal for response criteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4(2):168-172.

(766) Musher DM, Luchi MJ, Watson DA, Hamilton R, Baughn RE. Pneumococcal polysaccharide vaccine in young adults and older bronchitics: determination of IgG responses by ELISA and the effect of adsorption of serum with non-type-specific cell wall polysaccharide. *J Infect Dis* 1990; 161(4):728-735.

(767) Stark K, Schonfeld C, Barg J, Molz B, Vornwald A, Bienzle U. Seroprevalence and determinants of diphtheria, tetanus and poliomyelitis antibodies among adults in Berlin, Germany. *Vaccine* 1999; 17(7-8):844-850.

(768) Currier JR, Kuta EG, Turk E, Earhart LB, Loomis-Price L, Janetzki S et al. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 2002; 260(1-2):157-172.

- (769) Jenness W, Kestens L, Nixon DF, Shacklett BL. Enhanced ELISPOT detection of antigen-specific T cell responses from cryopreserved specimens with addition of both IL-7 and IL-15--the Amplispot assay. *J Immunol Methods* 2002; 270(1):99-108.
- (770) De Rosa SC, Lu FX, Yu J, Perfetto SP, Falloon J, Moser S et al. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol* 2004; 173(9):5372-5380.
- (771) Amendola A, Boschini A, Colzani D, Anselmi G, Oltolina A, Zucconi R et al. Influenza vaccination of HIV-1-positive and HIV-1-negative former intravenous drug users. *J Med Virol* 2001; 65(4):644-648.
- (772) Eaton SM, Burns EM, Kusser K, Randall TD, Haynes L. Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses. *J Exp Med* 2004; 200(12):1613-1622.
- (773) Carlos MJ, Castilla J, Lopez M, Arranz R, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. Impact of chronic hepatitis C on HIV-1 disease progression. *HIV Clin Trials* 2004; 5(3):125-131.
- (774) Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 2000; 356(9244):1800-1805.
- (775) Piroth L, Grappin M, Cuzin L, Mouton Y, Bouchard O, Raffi F et al. Hepatitis C virus coinfection is a negative prognostic factor for clinical evolution in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Viral Hepat* 2000; 7(4):302-308.
- (776) Napolitano LA, Burt TD, Bacchetti P, Barron Y, French AL, Kovacs A et al. Increased circulating interleukin-7 levels in HIV-1-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40(5):581-584.
- (777) Sprauer MA, Markowitz LE, Nicholson JK, Holman RC, Deforest A, Dales LG et al. Response of human immunodeficiency virus-infected adults to measles-rubella vaccination. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6(9):1013-1016.
- (778) Edsall G, Elliott MW, Peebles TC, Eldred MC. Excessive use of tetanus toxoid boosters. *JAMA* 1967; 202(1):111-113.

(779) Simultaneous administration of varicella vaccine and other recommended childhood vaccines--United States, 1995-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001; 50(47):1058-1061.

(780) Haubrich RH, Little SJ, Currier JS, Forthal DN, Kemper CA, Beall GN et al. The value of patient-reported adherence to antiretroviral therapy in predicting virologic and immunologic response. California Collaborative Treatment Group. *AIDS* 1999; 13(9):1099-1107.

(781) Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(3):187-195.

(782) Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, Bacheller D, Pappasavvas E, Jerandi G et al. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2002; 168(9):4796-4801.

(783) Azzoni L, Pappasavvas E, Chehimi J, Kostman JR, Mounzer K, Ondercin J et al. Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J Immunol* 2002; 168(11):5764-5770.

(784) Pantaleo G, Soudeyins H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S et al. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(18):9848-9853.

(785) Alpdogan O, Muriglian SJ, Eng JM, Willis LM, Greenberg AS, Kappel BJ et al. IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2003; 112(7):1095-1107.

(786) Titanji K, De Milito A, Cagigi A, Thorstensson R, Grutzmeier S, Atlas A et al. Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serological memory during HIV-1 infection. *Blood* 2006.

(787) Walmsley S, Bernstein B, King M, Arribas J, Beall G, Ruane P et al. Lopinavir-ritonavir versus nelfinavir for the initial treatment of HIV infection. *N Engl J Med* 2002; 346(26):2039-2046.

- (788) Smith CJ, Phillips AN, Hill T, Fisher M, Gazzard B, Porter K et al. The rate of viral rebound after attainment of an HIV load <50 copies/mL according to specific antiretroviral drugs in use: results from a multicenter cohort study. *J Infect Dis* 2005; 192(8):1387-1397.
- (789) Robbins GK, De G, V, Shafer RW, Smeaton LM, Snyder SW, Pettinelli C et al. Comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2003; 349(24):2293-2303.
- (790) Rodriguez-French A, Boghossian J, Gray GE, Nadler JP, Quinones AR, Sepulveda GE et al. The NEAT study: a 48-week open-label study to compare the antiviral efficacy and safety of GW433908 versus nelfinavir in antiretroviral therapy-naive HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 35(1):22-32.
- (791) Pappasavvas E, Ortiz GM, Gross R, Sun J, Moore EC, Heymann JJ et al. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 and CD8 T cell responses in chronically infected persons after temporary treatment interruption. *J Infect Dis* 2000; 182(3):766-775.
- (792) Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L et al. Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS* 1996; 10(8):F17-F22.
- (793) Plana M, Garcia F, Gallart T, Tortajada C, Soriano A, Palou E et al. Immunological benefits of antiretroviral therapy in very early stages of asymptomatic chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2000; 14(13):1921-1933.
- (794) Caruso A, Licenziati S, Canaris AD, Cantalamessa A, Fiorentini S, Ausenda S et al. Contribution of CD4+, CD8+CD28+, and CD8+. *J Clin Invest* 1998; 101(1):137-144.
- (795) Sun R, Ku J, Jayakar H, Kuo JC, Brambilla D, Herman S et al. Ultrasensitive reverse transcription-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10):2964-2969.
- (796) Hazenberg MD, Borghans JA, de Boer RJ, Miedema F. Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol* 2003; 4(2):97-99.

(797) Harris JM, Hazenberg MD, Poulin JF, Higuera-Alhino D, Schmidt D, Gotway M et al. Multiparameter evaluation of human thymic function: interpretations and caveats. *Clin Immunol* 2005; 115(2):138-146.

(798) Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Muthukumar A, Dunham R, Gordon S et al. Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8+ T cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2005; 174(5):2900-2909.

(799) De Milito A, Nilsson A, Titanji K, Thorstensson R, Reizenstein E, Narita M et al. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* 2004; 103(6):2180-2186.

(800) Janoff EN, O'Brien J, Thompson P, Ehret J, Meiklejohn G, Duvall G et al. *Streptococcus pneumoniae* colonization, bacteremia, and immune response among persons with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993; 167(1):49-56.

(801) French N, Moore M, Haikala R, Kayhty H, Gilks CF. A case-control study to investigate serological correlates of clinical failure of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in HIV-1-infected Ugandan adults. *J Infect Dis* 2004; 190(4):707-712.

ANEXOS