

Pacients i mètodes

Tipus d'estudi

Es realitza un estudi prospectiu observacional en dues cohorts diferents de pacients pediàtrics controlats a les Consultes Externes de la Unitat Funcional d'Infecció per l'HIV del Servei de Pediatria de l'Hospital Sant Joan de Déu, centre mèdic universitari.

Selecció de pacients

Les dues cohorts de pacients estudiats es componen de:

Cohort 1. Pacients pediàtrics infectats per l'HIV

Es tracta d'un grup de pacients infectats per l'HIV, menors de 18 anys en el moment de ser inclosos en l'estudi i que reben, en la majoria de casos, tractaments antiretrovirals en règims tipus TARGA. Període d'estudi: des del mes d'abril de 2000 fins al mes de setembre de 2004. Els criteris d'exclusió per a aquesta cohort foren:

- Patologies susceptibles d'eleva el nivells plasmàtics d'LA, ja sigui per defectes genètics (errors congènits del metabolisme) o per un augment en les demandes energètiques de l'organisme (*i.e.* cardiopaties congènites, infeccions agudes greus...).
- Adherència deficient al tractament antiretroviral, definida com un compliment inferior al 80% de les dosis de fàrmacs antiretrovirals de forma mantinguda.

Aquests pacients es controlen de forma ambulatoria en intervals de 2-3 mesos. Les dades epidemiològiques i antecedents familiars i personals es recullen en la primera visita. En cada consulta, se'ls realitza una anamnesi exhaustiva, amb especial atenció a la presència de símptomes relacionats amb la infecció per l'HIV o altres processos intercurrents, a símptomes compatibles amb disfunció mitocondrial (malestar general, cansament, pèrdua de pes, nàusees o vòmits, dolor abdominal, dispnea o simptomatologia neurològica) i a l'adherència i tolerància al tractament antiretroviral. Es practica una exploració clínica, que inclou les mesures antropomètriques habituals

(pes, talla i perímetre cranial) i les adreçades a l'estudi de la síndrome de lipodistrofia (plecs bicipital, tricipital, sub-escapular i supra-espinós i perímetres bicipital i a l'alçada de malic, cintura i malucs) i es realitza una anàlisi sanguínia completa.

L'anàlisi de sang venosa inclou habitualment: hemograma i fórmula, recompte de subpoblacions limfocitàries en valors absoluts i percentuals per tècniques de citometria de fluxe (FACScalibur, Becton-Dickinson, EEUU), equilibri àcid-base, ionograma, funció renal, funció hepàtica, nivells plasmàtics d'LA i dels diferents subtipus d'immunoglobulines (IgG, IgM i IgA) i càrrega viral plasmàtica per a l'HIV. Si la sang extreta és suficient, es conserven també mostres a -70°C en forma de plasmateca i cel.luloteca.

Cohort 2. Pacients sans nascuts de mare infectada per l'HIV

Lactants no infectats per l'HIV però exposats al virus i a fàrmacs antiretrovirals durant l'embaràs, part i període neonatal en la majoria de casos, nascuts en el nostre Hospital o derivats des d'altres centres mèdics amb Servei de Maternitat de la zona. Període d'estudi: des del mes de gener de 2000 fins al mes de març de 2004. Els criteris d'exclusió per a aquesta cohort foren:

- Infecció confirmada per l'HIV, de transmissió vertical.
- Patologies susceptibles d'eleva els nivells plasmàtics d'LA, ja sigui per defectes genètics (errors congènits del metabolisme) o per un augment en les demandes energètiques de l'organisme (*i.e.* cardiopaties congènites, infeccions greus...).
- Nounat gran prematur o molt gran prematur: <32 setmanes d'edat gestacional al naixement.
- Nounat amb molt baix pes o molt molt baix pes: <1500 grams de pes al naixement.

El Protocol de seguiment de nens exposats a l'HIV i a fàrmacs antiretrovirals durant la gestació i període neonatal inclou visites i anàlisis sanguínies al naixement, als 15 dies, a les 6 setmanes, i als 3, 6, 12, 18 i 24 mesos de vida, i controls clínics anuals des d'aleshores. En el primer contacte, es recullen dades epidemiològiques, de la infecció materna per l'HIV, d'altres possibles co-infeccions, de l'ús de tòxics durant l'embaràs, del control gestacional i de les característiques del part; s'inicia també el tractament amb zidovudina al nounat (2 mg/kg de pes cada 6 hores, fins a les 6 setmanes de vida) i l'alletament exclusiu amb llet de fórmula. En cadascuna de les visites posteriors, es realitza una anamnesi completa i una exploració física, que inclou

mesures antropomètriques (pes, talla i perímetre cranial). Es para especial atenció a l'adherència i tolerància al règim de zidovudina neonatal i a possibles signes o símptomes clínics de disfunció mitocondrial (vòmits, irritabilitat, patró respiratori i desenvolupament neurològic). El Protocol també inclou una ecografia abdominal, una ecografia transfontanel·lar, una ecocardiografia i un estudi del fons d'ull.

Els pacients són inclosos en l'estudi quan s'obtenen, en plasma, dues determinacions negatives per al material genètic de l'HIV, mitjançant tècniques de reacció en cadena de la polimerasa (càrrega viral RNA-HIV o detecció de provirus DNA-HIV). Això sol succeir abans del mes de vida i descarta, amb una sensibilitat i una especificitat properes al 100%, la transmissió vertical de l'HIV (*Dunn et al, 1995*). En tots els casos, però, això queda confirmat al repetir l'estudi en les mostres sanguínies successives (a les 6 setmanes i als 3, 6 i 12 mesos de vida) i comprovant la seroreversió als 18 mesos de vida, d'acord amb les recomanacions actuals (*Public Health Service Task Force, 2004*).

L'anàlisi de sang venosa inclou habitualment: hemograma i fórmula, recompte de subpoblacions limfocitàries en valors absoluts i percentuals per tècniques de citometria de fluxe (FACScalibur, Becton-Dickinson, EEUU), equilibri àcid-base, ionograma, funció hepàtica, nivells plasmàtics d'LA i dels diferents subtipus d'immunoglobulines (IgG, IgM i IgA) i les tècniques de biologia molecular per al diagnòstic de la infecció per l'HIV ja comentades. Igual que en la cohort de pacients pediàtrics infectats per l'HIV, si la sang extreta és suficient, es conserven també mostres a -70°C en forma de plasmateca i cel·luloteca.

En els casos de co-infeccions maternes susceptibles de transmetre's per via vertical, s'aprofiten les anàlisis sanguínies per a l'estudi d'aquestes patologies en el nen. En aquest sentit, adquireix especial importància la co-infecció materna pel VHC, d'alta prevalença en el nostre entorn entre la població adulta infectada per l'HIV per via parenteral.

Variables en estudi

En la **Cohort 1 (Pacients pediàtrics infectats per l'HIV)**:

- Qualitatives: sexe, via de transmissió de la infecció per l'HIV, co-infecció pel VHC o pel VHB, estadiatge clínic en el moment de la inclusió en l'estudi (*Centers for Disease Control and Prevention, 1994*), fàrmacs antiretrovirals rebuts, simptomatologia clínica compatible amb disfunció mitocondrial, i patologies intercurrents.
- Quantitatives: edat, edat d'inici del primer tractament antiretroviral, càrrega viral per a l'HIV (\log_{10} còpies/mL) i recompte percentual de limfòcits CD4 en el moment de la inclusió i a la conclusió de l'estudi, número total de determinacions plasmàtiques de LA (mmol/L) i els seus valors.

En cada episodi d'hiperLA es recullen l'edat del pacient, la durada en mesos de l'episodi, el règim de fàrmacs antiretrovirals que està rebent el pacient, el valor més alt de LA de l'episodi i les determinacions obtingudes de la mateixa mostra sanguínia d'alanina ($\mu\text{mol/L}$), pH, càrrega viral per a l'HIV (\log_{10} còpies/mL), recompte percentual de limfòcits CD4, alanina aminotransferasa (UI/L) i aspartat aminotransferasa (UI/L). En aquells pacients en què no es constata cap episodi d'hiperLA, es recullen les mateixes dades de l'extracció corresponent al valor més alt d'LA registrat.

En la **Cohort 2 (Pacients sans nascuts de mare infectada per l'HIV)**:

- Qualitatives: co-infecció materna pel VHC i/o pel VHB, ús de tòxics durant la gestació, tipus de part, score d'Apgar, sexe del nou-nat, fàrmacs antiretrovirals rebuts per la mare durant l'embaràs, ús intrapart de zidovudina, adherència i tolerància al tractament amb antiretrovirals en el període neonatal, infecció per l'HIV, VHC o VHB de transmissió vertical, i simptomatologia clínica compatible amb disfunció mitocondrial durant el seguiment clínic fins a l'any de vida.
- Quantitatives: edat de la mare durant la gestació, darrera càrrega viral per a l'HIV (\log_{10} còpies/mL) i darrer recompte absolut de limfòcits CD4 (cèl.lules/ mm^3) abans del part, edat gestacional i mesures antropomètriques del pacient al naixement (pes, talla i perímetre cranial), exposició parcial (durant la gestació, en setmanes) i total (durant la gestació i el període neonatal, en setmanes) als fàrmacs

antiretrovirals, individualment i per famílies de fàrmacs; determinacions d'LA (mmol/L), pH, alanina aminotransferasa (UI/L) i aspartat aminotransferasa (UI/L) i, si s'escau, alanina ($\mu\text{mol/L}$), a les 6 setmanes i als 3, als 6 i als 12 mesos de vida.

Tècniques de biologia molecular

Detecció de DNA proviral de l'HIV en cèl.lules mononuclears de sang perifèrica per amplificació mitjançant tècnica de PCR d'una seqüència genètica d'una regió altament conservada de l'HIV (Amplicor VIH, Roche Molecular Systems, Suïssa). Se n'obté un resultat positiu o negatiu. En l'actualitat, aquesta tècnica ha quedat descatalogada.

Detecció de l'RNA de l'HIV (càrrega viral): es determina per transcripció inversa de l'RNA viral a DNA complementari i posterior amplificació d'una seqüència del gen *gag* per PCR (Cobas Amplicor VIH Monitor versió 1.5, Roche Molecular Systems, Suïssa). Se n'obté el número de còpies d'RNA viral per mil.lilitre de plasma, amb un límit que es situa en <200 o <20 còpies/mL, i que pot expressar-se en valors absoluts (còpies/mL) o en escala logarítmica (\log_{10} còpies/mL).

Detecció de l'RNA del VHC per transcripció inversa de l'RNA a DNA complementari i posterior amplificació per PCR del genoma viral (Amplicor VHC, Roche Molecular Systems, Suïssa). Se n'obté un resultat positiu o negatiu.

Determinació dels nivells plasmàtics d'àcid làctic i alanina

Els nivells plasmàtics d'LA s'obtenen d'una mostra de sang deproteïnitada amb àcid perclòric (concentració de 0.6 mol/L, relació 1:2), a través d'espectrometria (Cobas Mira Plus, Roche, Suïssa) i d'acord amb el procediment comunicat prèviament (*Artuch et al, 1995*). La tècnica es basa en la següent reacció de producte final, catalitzada per la lactat deshidrogenasa:



Reactius necessaris:

- Nicotinamida-adenina-dinucleòtid (NAD⁺) a una concentració de 24 mmol/L (Boehringer Mannheim, cat. no. 127981).
- L-glutamat neutral a una concentració de 0.77 mol/L (Merck, cat. no. 291.0100).
- Alanina aminotransferasa amb una activitat específica de 140 U/mg (EC 2.6.1.29, Boehringer Mannheim, cat. no. 105589), diluïda en sulfat d'amoni (3.2 mol/L a un pH de 6).
- Tampó de bicarbonat ajustat a un pH 10.
- Lactat deshidrogenasa amb una activitat específica de 1100 U/mg (EC 1.1.1.27, Boehringer Mannheim, cat. no. 127876), diluïda en sulfat d'amoni (3.2 mol/L).

A l'afegir l'L-glutamat i l'alanina aminotransferasa a la mostra del pacient, aquests en *capturen* el piruvat i afavoreixen que l'equilibri es desplaci de l'LA al piruvat a l'introduir la lactat deshidrogenasa diluïda al 50% amb aigua bidestil·lada. La reacció es completa en 3 minuts; l'NADH que es genera es mesura per canvis en l'absorbància a 340 nm i és una medició indirecta de la concentració d'LA de la mostra, que s'expressa en mmol/L.

Les xifres de referència del Laboratori de l'Hospital Sant Joan de Déu per als nivells plasmàtics normals d'LA en funció de l'edat són les següents:

- Fins a l'any de vida: 0.77-2.44 mmol/L.
- Dels 12 mesos als 5 anys de vida: 0.66-1.88 mmol/L.
- Dels 5 anys de vida en endavant: 0.55-1.77 mmol/L.

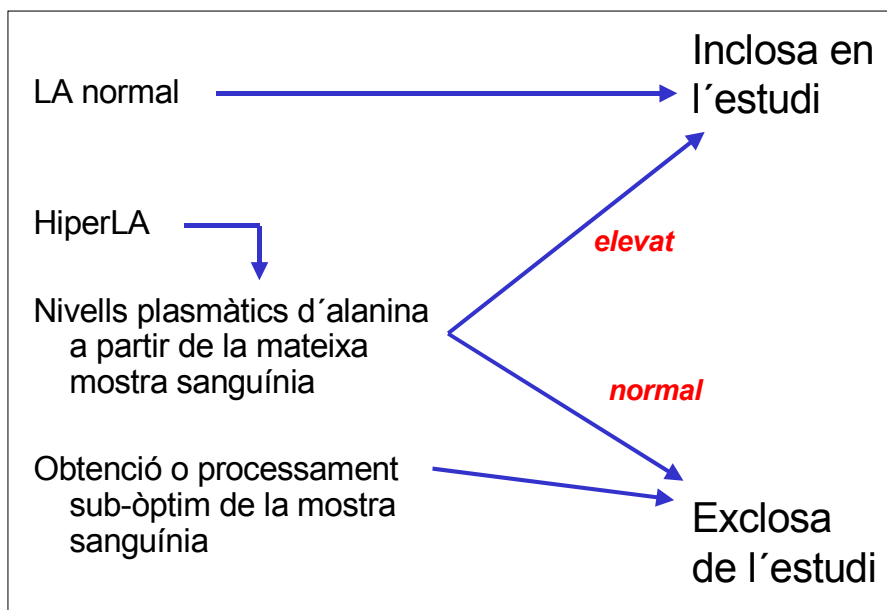
Les condicions d'extracció i processament de les mostres sanguínies en el nostre estudi foren les següents: en el moment de l'extracció sanguínia, els pacients estaven en dejú (>3 hores en els menors d'un any i >6 hores en els majors d'un any) i se'ls demanava un repòs físic previ mínim de 10 minuts. Quan era possible, s'evitaven els torniquets i es requeria que l'obtenció de sang en la venopunció fos ràpida i senzilla. Una quantitat entre 0.5 i 1 mL de sang sencera es deproteïnitzen de forma immediata i es col·locaven en gel; el processament de la mostra es realitzava en els 60 minuts posteriors a l'extracció.

Quan els nivells plasmàtics d'LA obtinguts es trobaven per sobre dels valors de referència, es realitzava un aminograma en el plasma restant de la mateixa mostra i es determinava l'alaninèmia plasmàtica. Les concentracions d'alanina plasmàtica (rang

de valors normals, mitjana \pm desviació estàndard: $312 \pm 78 \mu\text{mol/L}$) es mesuren per cromatografia de bescanvi iònic (Biochrom 20, Pharmacia, Biotech, Cambridge, Regne Unit) amb detecció espectromètrica de ninhidrina, d'acord amb el procediment comunicat prèviament (Moyano *et al*, 1998).

Donada la baixa especificitat de les determinacions plasmàtiques d'LA, és bàsic obtenir i processar les mostres sanguínies en condicions òptimes. Totes les determinacions plasmàtiques d'LA que incompleixen aquestes condicions òptimes quedaven excloses de l'estudi. De la mateixa manera, quan un valor elevat d'LA no s'acompanyava d'un valor elevat d'alaninèmia, el primer es considerava degut a l'estrès puntual de l'extracció sanguínia i quedava també exclòs de l'estudi.

Figura 3. Algoritme de validació i inclusió en l'estudi de les determinacions plasmàtiques d'àcid làctic.



En la **Cohort 1**, els valors d'LA obtinguts s'han comparat amb els valors de referència del nostre Laboratori. En la **Cohort 2**, s'han comparat amb els obtinguts de mostres sanguínies sobrants de pacients sans referits al nostre Laboratori per a anàlisis pre-quirúrgiques, d'edat i sexe equiparables als nens de l'estudi.

Anàlisi estadística

Les dades quantitatives es presenten resumides amb la mitjana aritmètica i la mediana, com a mesures de tendència central, i amb la desviació estàndard i el rang, com a mesures de dispersió. Per a les variables qualitatives s'estimen proporcions amb intervals de confiança del 95%.

En ambdues **Cohorts**, els pacients es defineixen, inicialment, com hiperLA o no hiperLA. Per a l'anàlisi univariada dels factors de risc de desenvolupar hiperLA, s'utilitzen el test de la *khi* al quadrat o el test exacte de Fisher per a les variables qualitatives i el test de la *t* de Student o el test d'ANOVA per a les variables quantitatives. En ambdós casos es comproven les condicions o criteris d'aplicació (normalitat de les variables, igualtat de variàncies i/o aplicació del test de Kolmogorov-Smirnov). Si aquests criteris no es compleixen, s'utilitzen les proves no paramètriques escaients. Per a estimar la freqüència d'hiperLA, s'ha calculat la densitat d'incidència. Finalment, per a identificar els factors predictius d'hiperLA, s'estima l'*odds ratio* i el seu interval de confiança al 95% en l'anàlisi bivariada i també en l'anàlisi multivariada, mitjançant tècniques de regressió logística.

Les dades obtingudes s'han registrat en una base de dades creada en Microsoft Office 2000 Excel i se'ls ha aplicat l'anàlisi estadística amb el programa SPSS versió 11.0. La significació estadística s'ha establert amb valors de $p \leq 0,05$.