



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE CITOCINAS T_H1 Y T_H2
ASOCIADOS AL SÍNDROME DE RECONSTITUCIÓN
INMUNOLÓGICA EN PACIENTES VIH POSITIVOS CON
TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE ACTIVO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A**

NATALIA GUADALUPE HERNÁNDEZ ÁLVAREZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZUÑIGA RAMOS

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Polimorfismos en los genes de citocinas TH1 y TH2 asociados al Síndrome de reconstitución inmunológica en pacientes VIH positivos con tratamiento antirretroviral altamente activo"

realizado por Natalia Guadalupe Hernández Álvarez

con número de cuenta 09852922-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos

Propietario Dr. Gustavo Reyes Terán

Propietario Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

Suplente QFB. Joel Armando Vázquez Pérez

Suplente QFB. Criselda Mendoza Milla

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Estructura del VIH-1	2
Ciclo de replicación del VIH-1	5
Historia natural de la infección por VIH	7
Inmunopatogénesis de la infección por VIH	10
Tratamiento antirretroviral altamente activo (TAVAA)	11
Reconstitución inmunológica asociada al uso de TAVAA.....	13
Síndrome inflamatorio por reconstitución inmunológica (SIRI) asociado a TAVAA	14
Citocinas	18
Polimorfismos en genes de citocinas	20
ANTECEDENTES.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	26
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
Diseño del estudio	27
Población del estudio	27
Criterios de selección de la muestra	28
Procedimiento	29
Análisis estadístico	31

RESULTADOS	32
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	45
ANEXOS.....	54
Anexo 1: Técnicas utilizadas	54
Anexo 2: Interpretación de resultados de <i>cytokine genotyping tray</i>	65

INTRODUCCIÓN

Desde el aislamiento del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en 1983 y del VIH-2 en 1986, se describió la asociación de estos agentes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).^{1,2,3} El SIDA es la etapa final de la enfermedad por VIH y precede a la muerte del hospedero.⁴

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) cerca de 46 millones de personas están infectadas a la fecha con el VIH, de las cuales 2.1 – 2.9 millones son niños menores de 15 años. El 95% de estas personas viven en países subdesarrollados con bajos y medianos ingresos como Africa Sub-Sahariana, Asia meridional y sudoriental y Latinoamérica.⁵

El VIH es un retrovirus de la subfamilia *Lentiviridae*. En general, en las infecciones por lentivirus se observa un curso crónico de la enfermedad, con un largo período de latencia clínica y replicación viral persistente. Otras infecciones por lentivirus específicos de especie son: virus Visna en borregos, virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) en monos, virus de inmunodeficiencia felina (FIV) en gatos.

Tanto el VIH-1 como el VIH-2 se replican en células T CD4⁺ (cT CD4⁺) y causan una disminución gradual de los niveles circulantes de estas células.^{6,7}

ESTRUCTURA DEL VIH-1

Las partículas del VIH tienen forma esférica con un diámetro de aproximadamente 100nm. Estas partículas están formadas por una membrana lipídica que obtienen de la membrana celular. En la parte interna de ésta membrana se encuentra la matriz (compuesta por la proteína p17), encargada de proveer estructura al virus. Dentro de la matriz está la cápside (p24), un núcleo de forma cónica que contiene dos cadenas idénticas de RNA (ácido ribonucleico), la nucleocápside p7 y p6, y las enzimas del virus: integrasa (p32), proteasa (p11) y transcriptasa inversa (p66). En la superficie del virus se encuentran dos glicoproteínas: gp120, localizada en la superficie externa de la membrana y gp41, localizada de forma transmembranal.⁸ (Figura 1)

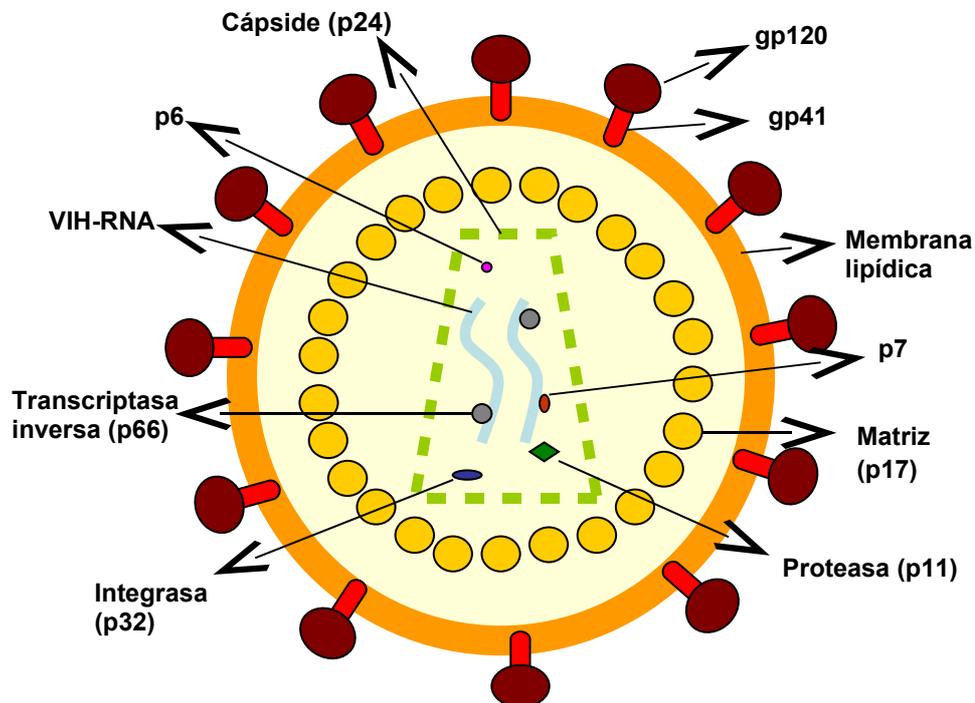


Figura 1. Estructura del VIH-1

El genoma viral tiene una longitud de 9.8 kilobases, con una estructura clásica de retrovirus: 5'LTR-gag-pol-env-LTR3'. Las secuencias largas repetitivas (LTR, *long terminal repeat*) se localizan en cada extremo y sirven, entre otras cosas, de enlace con el genoma celular. Los genes del VIH codifican para nueve proteínas clasificadas en tres clases: proteínas estructurales (Gag, Pol y Env), proteínas reguladoras (Tat y Rev) y proteínas accesorias (Vpu, Vpr, Nef y Vif).⁹ **Figura 2.**

Proteínas estructurales

El gen *gag* codifica para el precursor **Gag** o p55. Este precursor es cortado por la proteasa del virus en cuatro proteínas: proteína de la matriz, cápside, nucleocápside y p6.

El gen *pol* codifica a las proteínas enzimáticas del VIH, son formadas a partir del precursor **Gag-Pol** (p160). El polipéptido **Pol** se separa de **Gag** durante la maduración viral para formar las tres enzimas del virus: proteasa, encargada de cortar los polipéptidos durante la maduración viral; integrasa, con funciones de exonucleasa, endonucleasa y ligasa durante la integración del DNA viral al DNA celular; la transcriptasa inversa con actividad de DNA polimerasa dependiente de RNA y DNA, con una RNasa H que degrada la cadena original de RNA viral.^{10,11,12}

El gen *env* codifica al precursor **Env** conocido también como gp160. Este precursor es cortado por la proteasa en dos glicoproteínas: gp120 que se localiza en la superficie del virus y gp41 localizada en una región transmembranal. La gp120 y gp41 interactúan mediante enlaces no covalentes.¹³

Proteínas reguladoras

Tat es un transactivador transcripcional fundamental para la replicación del VIH. Es requerida en el inicio de la transcripción inversa y es el principal promotor de la fase de extensión de la transcripción del VIH.⁸

Rev induce la transición de la fase temprana a la tardía en la expresión de los genes del VIH. Facilita el transporte de RNA sin *splicing* del núcleo hacia el citoplasma. Rev es invariablemente requerido para la replicación viral.¹⁴

Proteínas accesorias

Nef disminuye la expresión de CD4 en la superficie de células infectadas, además favorece la endocitosis y degradación de esta molécula. Disminuye la expresión de moléculas HLA de clase I, bloquea la apoptosis y se asocia con perturbaciones en la activación de las células T.^{15,16}

Vpr actúa como un factor de transporte núcleo-citoplasma e interactúa con los componentes del complejo del poro nuclear, además de promover el arresto celular en la fase G2.¹⁷

Vpu disgrega los complejos intracelulares CD4-receptor viral, que interfieren con el ensamblaje del virión.¹⁸ Favorece la liberación de los viriones de células infectadas.

Vif es esencial para la replicación del VIH en linfocitos T de sangre periférica y en macrófagos. Algunos estudios indican que Vif está presente durante el ensamblaje del virión y que viriones mutantes en Vif presentan un inadecuado empaquetamiento de las proteínas del núcleo.¹⁹

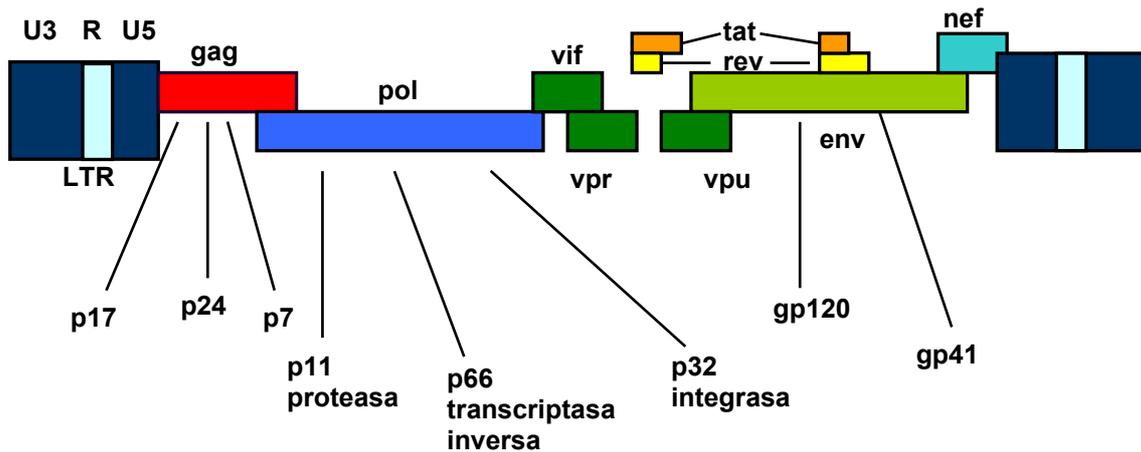


Figura 2. Genoma del VIH-1.

CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1

Los pasos básicos de la infección de una célula por el virus son: la unión del virus a su receptor y a los co-receptores presentes en la superficie de la célula, la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y la entrada de la nucleocápside al citoplasma de la célula huésped.²⁰

El receptor principal del VIH es la molécula CD4, presente en linfocitos T cooperadores y en células de otra estirpe como monocitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas y células de la microglia en el sistema nervioso central. La glicoproteína 120 (gp120), localizada en la membrana viral, es la mediadora de la entrada del virus a la célula.²¹ Además de la unión de la molécula CD4 con gp120 se requieren otras moléculas celulares como los receptores CXCR4 o CCR5 (receptores específicos de quimiocinas alfa y beta respectivamente) que se han denominado co-receptores del VIH, que al unirse a gp120 ocasionan un cambio conformacional que permite la expresión de gp41, esta última proteína viral interviene en la fusión de membranas y la entrada de la

cápside a la célula.²² En la mayoría de los casos, la cepa predominante al inicio de la infección utiliza el correceptor CCR5, en etapas posteriores de la infección se encuentran predominantemente virus que utilizan el correceptor CXCR4 que tienen la capacidad de formar sincicios. Ya en el citoplasma de la célula, el RNA del genoma viral es retrotranscrito a una copia de DNA de doble cadena (dsDNA) por la enzima viral transcriptasa inversa (RT), que junto con algunas proteínas virales forma el complejo de integración que se dirige al núcleo donde es integrado al DNA genómico celular por la acción de la integrasa viral. El provirus, funciona como un gen celular durante el tiempo de vida de la célula infectada.²³ Para la replicación del VIH y la inducción de sus genes se requieren factores de transcripción celular (producidos en forma constitutiva por la célula o inducidos por señales de activación como citocinas)²⁴, proteínas virales reguladoras, y accesorias. Los eventos transcripcionales y postranscripcionales son regulados por las proteínas virales transactivadoras Tat y Rev.²⁵ En la parte final del ciclo de replicación ocurre el ensamblaje de los viriones, el RNA y los productos de los genes *gag* y *pol* se integran en el centro del virus y se dirigen a la superficie de la célula, salen a través de la membrana celular adquiriendo la membrana lipídica y se agregan los productos del gen *env* para formar las proteínas de envoltura (gp120 y gp41). Durante la maduración del virión, la enzima proteasa corta específicamente cada poliproteína para formar las proteínas virales funcionales p24, p17, p7 y p6 (**Figura 3**). El VIH maduro, en la mayoría de los casos es capaz de infectar a otras células y comenzar nuevamente su ciclo de replicación.²⁴

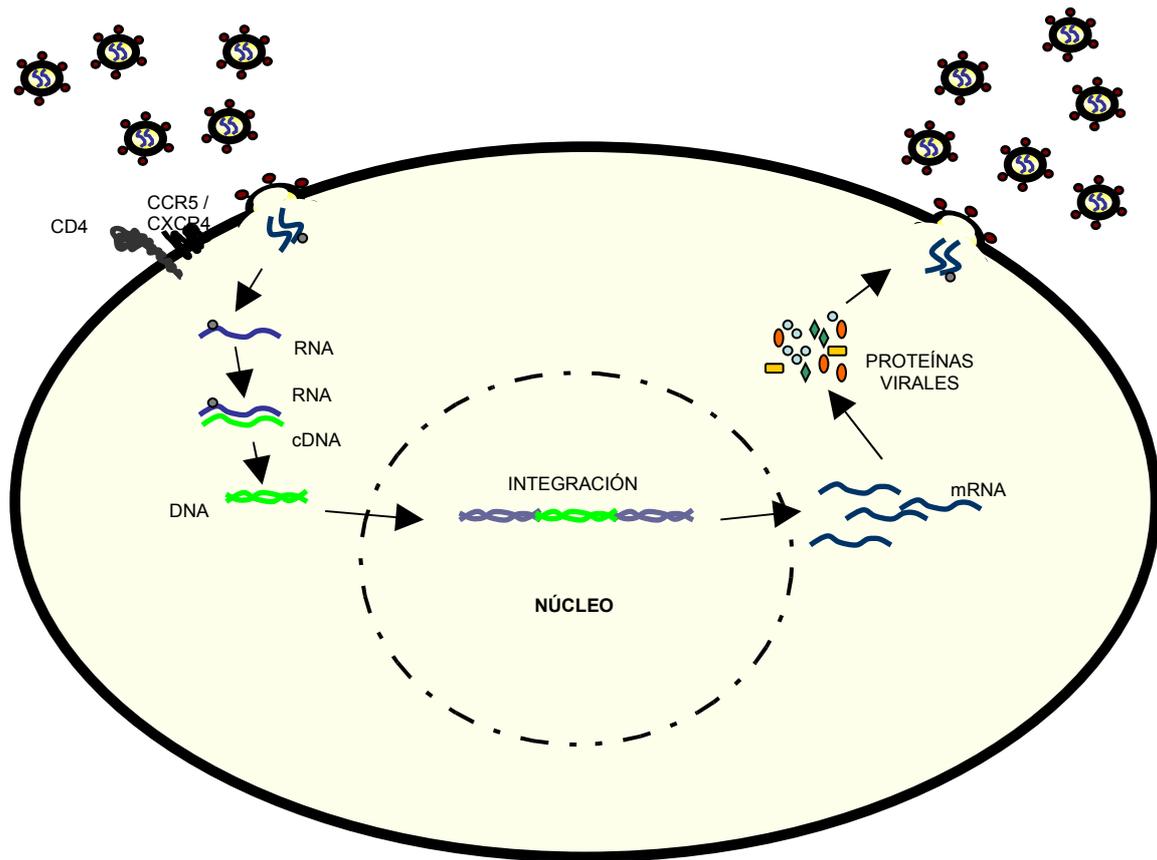


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH

HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH

La historia natural de la infección por VIH generalmente se divide en las siguientes etapas:

- 1) Etapa de infección primaria.
- 2) Etapa de infección crónica.
- 3) Etapa avanzada o SIDA.

La etapa de infección primaria está definida como el lapso de tiempo que transcurre desde la infección inicial por VIH hasta el desarrollo de una respuesta por anticuerpos detectable. Después de la exposición, en el 87% de los individuos se presenta un síndrome retroviral agudo, con síntomas característicos como fiebre, fatiga, linfadenopatía, dolor de cabeza y prurito.²⁶

En las primeras 2 a 4 semanas de la infección se alcanza el nivel máximo de viremia, que coincide con la mayor capacidad de diseminación del virus a diferentes sitios.²⁷ Sin embargo estos niveles de carga viral no se mantienen, lo que evidencia la presencia de una respuesta inmune capaz de tener bajo control, por lo menos por un tiempo, a la infección.

Durante esta etapa las células T CD8⁺ sufren una marcada expansión clonal y expresan altos niveles de marcadores de activación como CD38 y HLA-DR.²⁸

La función y el número de cT CD4⁺ disminuyen durante la infección primaria, ocasionalmente a niveles que permiten el desarrollo de infecciones oportunistas.²⁹

Semanas posteriores a la infección ocurre una extraordinaria contra-regulación de los niveles de replicación viral que disminuye los títulos de la viremia hasta llegar a lo que se conoce como el punto de equilibrio (*set point*) de la carga viral. Esto da como resultado un aumento de los niveles circulantes de cT CD4⁺, aunque nunca alcanzan su valor basal.³⁰

En la etapa crónica, la mayoría de los pacientes infectados cursan un período de varios años en el que no se observan síntomas característicos de la enfermedad. En esta etapa existe un equilibrio relativo entre la replicación viral y la respuesta inmune del hospedero, millones de cT CD4⁺ y de viriones son producidos y destruidos cada día.³¹

Durante este período la replicación viral es contenida en mayor o menor grado por la respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, el VIH ha desarrollado estrategias de evasión de la respuesta inmune, que invariablemente, en la mayoría de los individuos resultará en la destrucción del sistema inmune y la aparición de manifestaciones clínicas, hasta evolucionar a SIDA.

Para este momento las concentraciones de cT CD4⁺ circulantes son muy bajas (<200 células/μL de sangre) y la carga viral puede encontrarse por arriba de 750,000 copias de RNA del VIH. La destrucción del sistema inmunitario explica los hallazgos clínicos que se observan en esta etapa, como la aparición de enfermedades oportunistas.³² **Figura 4.**

Desde el punto de vista clínico, virológico e inmunológico, los individuos infectados pueden ser clasificados en dos grandes grupos: El primer grupo conformado por individuos que durante 10 años o más permanecen asintomáticos, logran un buen control de la replicación viral y mantienen altos niveles circulantes de cT CD4⁺ en ausencia de tratamiento antirretroviral, a este grupo pertenece el 5% (o menos) de la población infectada y se le denomina no progresores o progresores a largo plazo (*long term non-progressors*).³³ El segundo grupo lo constituyen cerca del 80-85% del total de infectados por VIH, son conocidos como progresores (*progressors*), se subdividen en progresores promedio (60 a 70% del total), con una media de supervivencia de 10.5 años, y por último los progresores rápidos (30%), con un curso de 5 años o menos entre la infección y la muerte.³⁴

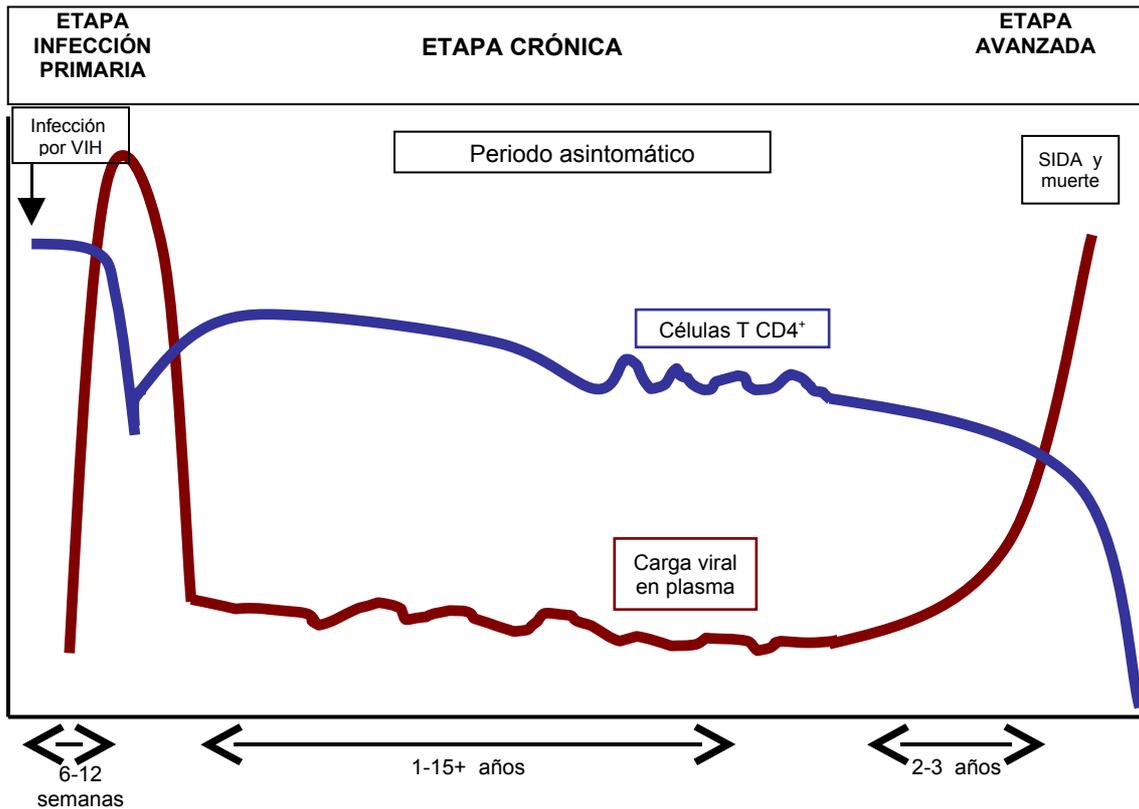


Figura 4. Diagrama esquemático del curso natural de la infección por VIH.

INMUNOPATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR VIH

En la infección por el VIH, el defecto inmunológico primario que se observa es la disminución en el número y la función de las cT CD4⁺. La disminución de cT CD4⁺ incluye tanto a células de memoria (CD45RO⁺) como células *naive* o vírgenes (CD45RA⁺, CD62L⁺). Esta alteración en el número y la función de cT CD4⁺ ocasiona, en la inmunidad innata, una alteración de la respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos como MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) y alteración en la producción de citocinas tipo 1 como interleucina 2 (IL-2), IL-12 e IFN- γ (Interferón-gamma). También ocasiona una disminución de la respuesta linfoproliferativa a mitógenos y antígenos.

Otra alteración que se ha descrito, es la activación crónica del sistema inmune por el aumento de cT CD4⁺ CD38⁺, cT HLA-DR⁺ y cT CD8⁺, así como el aumento de citocinas pro-inflamatorias en ganglios linfáticos, entre las que se encuentran IL-1, IL-6 y TNF- α que da como resultado un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y la retención de linfocitos en los ganglios linfáticos.³⁵ También se observan alteraciones en la presentación de antígenos (por macrófagos o células dendríticas), disminución en la expresión de moléculas MHC II (en células presentadoras de antígenos o cT CD4⁺), disminución en la expresión de moléculas accesorias como B7 y CD28, una deficiente activación del receptor de células T (TCR) por el antígeno, entre otras.³⁶

TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE ACTIVO (TAVAA)

El desarrollo de una terapia antirretroviral (anti-VIH) ha sido uno de los avances más importantes en la historia de la medicina, ha modificado de forma dramática la historia natural de la infección y las complicaciones asociadas que con frecuencia son enfermedades oportunistas, como consecuencia ha mejorado notablemente la calidad de vida de los pacientes infectados y de aquellos que han desarrollado SIDA.³⁷

En 1987 se describió el primer fármaco contra el VIH, un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido (NRTI) conocido como zidovudina o AZT. Este tratamiento contra el VIH causó gran expectación y optimismo, que decayó cuando se mostraron las limitaciones de la monoterapia a base de AZT entre las que resaltan la incapacidad de aumentar la sobrevida de los pacientes

y la toxicidad. A principios de los noventa se describieron nuevos fármacos NRTIs como zalcitabina, didanosina y estavudina, cuya utilización óptima se conoció hasta que se evaluaron en combinación con el AZT.

Durante 1995 comenzaron los primeros estudios con inhibidores de proteasa (PIs), diseñados con base en los conocimientos de la estructura molecular del VIH y de su enzima proteasa. A principios de 1996 fueron aprobados los primeros tres inhibidores de proteasa: saquinavir, ritonavir e indinavir. En junio de 1996 el primer inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo a nucleósido (NNRTI: *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*) llamado nevirapina, fue aprobado y así una nueva familia de antirretrovirales: nevirapina, delavirdina y efavirenz. En ese mismo año se empezó a utilizar una combinación de tres fármacos, generalmente dos NRTIs y un IP, conocido como tratamiento antirretroviral altamente activo (TAVAA) debido a su capacidad de disminuir los valores de carga viral a niveles indetectables (<50 copias de RNA-VIH/ mL de plasma) en un período corto de tiempo y su efecto puede mantenerse durante 2 a 3 años en promedio.³⁸ El resultado clínico del uso apropiado del TAVAA en pacientes con SIDA es la disminución de la incidencia de enfermedades oportunistas, mejoría en la calidad de vida y por tanto, una mayor supervivencia.

El éxito del tratamiento antirretroviral se evalúa de acuerdo a tres aspectos:²⁶

- 1) Control virológico. Se refiere a la inhibición de la replicación viral y la incapacidad de detectar copias de RNA viral en plasma, por los métodos utilizados actualmente.
- 2) Control inmunológico. Puede ser definido como la reconstitución de las cT CD4⁺ circulantes.

3) Mejoría clínica. Se define como la resolución de los síntomas asociados al VIH y la prevención de enfermedades oportunistas.

RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA ASOCIADA AL USO DE TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE ACTIVO (TAVAA).

Desde el punto de vista inmunológico el TAVAA induce la recuperación parcial del sistema inmunológico del paciente. La supresión de la replicación viral debido al tratamiento permite la reaparición de células efectoras, que proveen protección contra patógenos oportunistas.³⁹ Una o dos semanas después de iniciar el tratamiento antirretroviral los niveles de RNA viral en plasma descienden rápidamente y se observa una disminución hasta del 90% de las copias del virus. La carga viral continúa bajando durante las siguientes 8 a 12 semanas después del inicio de TAVAA, hasta alcanzar niveles <200 copias/mL de plasma.^{40,41}

Con la disminución de la carga viral se observa un aumento rápido en el número de cT CD4⁺ de memoria (CD45RO⁺) en sangre periférica. Este fenómeno parece ser a consecuencia de una redistribución de linfocitos desde los nódulos linfoides hacia la circulación.⁴¹ De manera paralela se observa una disminución substancial en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión y la proporción de linfocitos apoptóticos.^{42,43} Aparentemente se observa una mejoría en la función de los linfocitos que se refleja en el eficiente desarrollo de la respuesta de hipersensibilidad tardía y respuesta linfoproliferativa.⁴⁴ Después de las primeras 12 semanas del uso de TAVAA las cT CD4⁺ en sangre periférica siguen aumentando aunque de una manera discreta. Las células de memoria se estabilizan o aumentan muy poco,

el incremento que se observa es ocasionado principalmente por el aumento en las cT CD4⁺ vírgenes (CD45RA⁺, CD62L⁺).⁴⁵ La proliferación de estas células, que no han sido activadas previamente por un antígeno, explica el mejoramiento numérico en la cuenta total de células T que se observa durante el TAVAA. La fuente principal de este incremento sustancial es el timo. Aunque la infección por VIH deteriora la función del timo, el TAVAA permite el aumento del timo y de la producción de linfocitos T vírgenes. Al mismo tiempo se observa un aumento en la diversidad del repertorio de receptores de células T junto con un cambio en la producción de citocinas de tipo 2 a tipo 1, con aumento en la producción de IL-2 e IFN- γ .^{46,47} El TAVAA también afecta a las cT CD8⁺, con un aumento de cT CD8⁺ de memoria en las primeras semanas de tratamiento.⁴¹ Con un tratamiento prolongado, estas células de memoria disminuyen y son reemplazadas gradualmente por cT CD8⁺ vírgenes.⁴⁸

SÍNDROME INFLAMATORIO POR RECONSTITUCIÓN INMUNOLÓGICA (SIRI) ASOCIADO A TAVAA.

Algunos pacientes con infección por VIH que inician tratamiento antirretroviral altamente activo (TAVAA), en particular aquellos que se encuentran en etapa avanzada o tardía de la enfermedad, es decir, aquellos pacientes que tienen concentraciones de cT CD4⁺ menores a 200 cel/ μ l, pueden llegar a desarrollar episodios de enfermedad infecciosa y/o inflamatoria en los primeros meses después del inicio del tratamiento, aún cuando marcadores como la carga viral y los niveles de cT CD4⁺ estén mejorando. Algunas manifestaciones poco usuales de enfermedades oportunistas comunes se observan posterior a la

restauración del sistema inmune como linfadenitis por el complejo *Mycobacterium avium intracellulare* (MAC), vitritis o retinitis por citomegalovirus (CMV), activación paradójica de la tuberculosis (MTB), criptococosis, neumonía por *Pneumocystis carinii* (*jeroveci*), hepatitis B o C, y enfermedad por virus varicella zoster (VZV) o virus herpes simplex (HSV) (**Tabla 1**). Estos procesos de reactivación inflamatoria y/o infecciosa, se conocen como síndrome de reconstitución inmune, síndrome inflamatorio por reconstitución inmunológica (SIRI) o enfermedad por reconstitución inmune porque ocurre una vez que el sistema inmune se ha reconstituido y que el organismo es capaz de montar una respuesta específica contra un patógeno.

Los primeros reportes de este síndrome se conocieron poco después de la introducción de la zidovudina (AZT). En Australia, algunos pacientes que recibían monoterapia con AZT, presentaron infecciones oportunistas atípicas.^{49,50} Poco después de la introducción de los inhibidores de proteasa, en 1995, los desórdenes de reconstitución inmunológica se hicieron más evidentes. Durante la conferencia de SIDA en 1997, Phillips y colaboradores presentaron casos de linfadenitis localizada por el complejo *Mycobacterium avium* después del inicio de TAVAA. A finales de ese mismo año, se describió el caso de un paciente con hepatitis grave después de TAVAA, los análisis serológicos revelaron que durante este episodio de hepatitis el paciente ya había resuelto la infección crónica por el virus de la hepatitis B. Dentro de los dos años posteriores se publicaron casos similares, describiendo el empeoramiento de infección pulmonar y extrapulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), linfadenitis localizada por MAC y enfermedades inflamatorias oculares por CMV, todos asociados a TAVAA.^{51,52,53}

En general se calcula que entre el 20-40% del total de sujetos con VIH que inician TAVAA desarrollan este proceso inflamatorio, y un 67% de los pacientes que lo presentan lo hacen en los primeros dos meses del inicio de TAVAA. Los pacientes que lo presentan tienen la capacidad de montar una respuesta inflamatoria contra una infección subclínica y/o antígenos presentes en el organismo antes de iniciar TAVAA. Actualmente existe consenso sobre ciertas características del SIRI, aunque los criterios diagnósticos todavía no están bien definidos.^{54,55} La sintomatología del SIRI es diversa y depende del agente etiológico implicado (MAC, MTB, PcP, VZV, HSV).⁵⁶

Se han identificado factores de riesgo en la susceptibilidad a SIRI:

- a) La presencia de una infección activa o subclínica por patógenos oportunistas o la presencia de antígenos de microorganismos no viables (criptococos o CMV) como posibles blancos a una respuesta inmune.⁵⁰
- b) Un conteo de cT CD4+ por debajo de 50 cel/ μ l⁵⁷
- 3) Factores genéticos.⁵⁸ Es posible que la aparición del SIRI este determinado por el efecto de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias generadas por la restauración de una respuesta inmunológica específica contra patógenos.

Tabla 1.

Enfermedades descritas asociadas al SIRI después de inicio de TAVAA
Micobacterias
- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
- Micobacterias no tuberculosas
Herpes virus
- Cytomegalovirus (manifestaciones atípicas en ojos y piel)
- Herpes simplex virus
- Varicela zoster virus
- Epstein-Barr virus
- Kaposi's sarcoma herpes virus (Enfermedad de Castleman y Sarcoma de Kaposi)
Hepatitis
- Hepatitis B
- Hepatitis C
Enfermedades por hongos y protozoarios
- Toxoplasmosis
- Criptococcosis
- Microsporidiosis
- Histoplasmosis
- <i>Pneumocystis carinii</i> (<i>jeroveci</i>)
- Leishmaniasis
Leucoencefalitis multifocal progresiva
Enfermedades cutáneas
- Verrugas, condilomas acuminados y verrugas orales
- Foliculitis eosinofílica
Infecciones gastrointestinales ocasionadas por bacterias ¿? o protozoarios
- Apendicitis
- Colecistitis
- Esplenitis
Síndrome Guillain-Barré
Enfermedades autoinmunes
- Lupus eritematoso generalizado
- Vasculitis
- Síndrome de Reiter
- Artritis reumatoide
- Polimiositis
- Enfermedad de Grave's
- Alopecia universales
Reacciones alérgicas/hiperalérgicas
- Contra tatuajes
Neoplasias
- Sarcoma de Kaposi
- Linfoproliferación atípica
Otras enfermedades
- Osteonecrosis aséptica
- Ginecomastia
- Sarcoidosis
- Aterosclerosis

Tomado de Stoll M, Schmidt RE. Curr Infect Dis Reports, 2003

CITOCINAS

Las citocinas son proteínas o glicoproteínas inmunomoduladoras que regulan la actividad de las células sobre las que actúan y son pleiotrópicas. Se unen a ellas mediante receptores específicos e inician cascadas de transducción de señales y vías de segundos mensajeros intracelulares.⁵⁹ Lo anterior promueve la activación de genes para procesos muy diversos: división mitótica, crecimiento y diferenciación, migración o apoptosis. Las citocinas son producidas por un gran número de tipos celulares, las más estudiadas son producidas por líneas celulares de monocitos y linfocitos. Actúan en una red compleja, altamente coordinada, en donde inducen o reprimen su propia síntesis, la de otras citocinas o la de receptores de citocinas.⁶⁰ Las citocinas producidas por las células T_H1 incluyen a IL-2, IFN- γ y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y TNF- β y constituyen el perfil de citocinas pro-inflamatorias. Las T_H2 incluyen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y son citocinas predominantemente anti-inflamatorias. Tanto las T_H1 como las T_H2 producen IL-3 y GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos).^{61,62,63} Recientemente se ha descrito un tercer subtipo, el T_H3 y está definido por el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β). En el humano los tres subtipos anteriores no están bien definidos, además se ha identificado un nuevo subtipo, el T_H0 como el productor de algunas citocinas típicas de tipo T_H1 y T_H2 , **Figura 5.**

El resultado clínico de algunas enfermedades infecciosas, autoinmunes o malignas está determinado por el balance en la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.^{64,65}

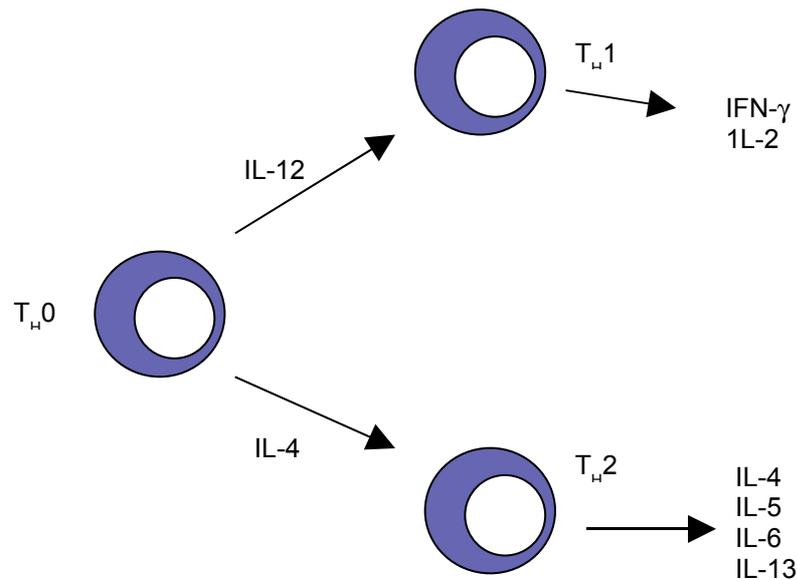


Figura 5. Representación esquemática de citocinas tipo T_H1 y T_H2

Algunas citocinas tienen un papel clave durante el proceso inflamatorio. Este proceso ocurre al momento de reconocer un organismo extraño como virus, bacterias o parásitos eucariotes, al ocasionarse un trauma o en ciertas enfermedades autoinmunes. Células como mastocitos, células dendríticas o macrófagos son las encargadas de detectar organismos extraños e iniciar comunicación con otras células al producir citocinas. Los macrófagos tienen una gran capacidad de reconocer lipopolisacáridos de bacterias y responden produciendo citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, que inducen una respuesta de fase aguda, es decir, una respuesta sistémica rápida que aumenta rápidamente concentraciones de proteínas séricas. También producen IL-8 cuya principal función es reclutar y activar neutrófilos. La IL-12, producida por macrófagos y células dendríticas, tiene como función regular la respuesta inmune adaptativa. El interferón (IFN- α/β) es producido por una gran variedad de células en respuesta a infecciones virales, esta citocina induce la síntesis de diferentes

proteínas que interfieren con la replicación viral degradando el RNA o inhibiendo la síntesis de proteínas.⁶⁶

Un proceso inflamatorio puede hacerse crónico al persistir el estímulo inmunológico durante un tiempo prolongado. Al permanecer el estímulo, continúa la estimulación de células como los linfocitos T, que producen citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ , lo que activa macrófagos, que al producir IL-12 o TNF- α reclutan más células, comenzando así el ciclo nuevamente.

POLIMORFISMOS EN GENES DE CITOCINAS

Existen mutaciones conservativas y no conservativas, las mutaciones no conservativas dentro de la región codificante de un gen pueden causar pérdida, supresión, o cambio en la función de la proteína expresada como resultado de un cambio en su estructura. En los genes de citocinas y de receptores de citocinas los exones son, generalmente, altamente conservados,^{67,68} aunque se han descrito algunas excepciones donde un cambio en esta región causa una variación en la secuencia de aminoácidos. Las mutaciones conservativas o silenciosas no afectan la secuencia de aminoácidos pero pueden influir en la expresión de la proteína: pueden alterar el *splicing* del RNA mensajero, su estabilidad y los niveles de transcripción de los genes. Los polimorfismos dentro de las secuencias reguladoras 5' y 3' o en intrones pueden tener un efecto significativo durante la transcripción, alterando la estructura de los sitios de unión de factores de transcripción dentro de los genes promotores o la estructura de secuencias reguladoras aumentadoras o supresoras dentro o fuera de los intrones. Algunos polimorfismos en estas secuencias reguladoras

pueden afectar sus niveles de expresión ya sea incrementándolos o disminuyéndolos. **Tabla 2.**

Tabla 2. Polimorfismos y alelos de genes de citocinas, localización y efecto en la expresión.⁶⁰

Gen	Polimorfismo y alelo (o haplotipo)	Expresión
IL-10	R 3	Disminuye
IL-10	R 3, G 7	Disminuye
IL-10	R 2, G 14	Aumenta
IL-10	-1082 G, -819 C, -592 C	Aumenta
IL-10	-1082 A, -819 C, -592 C	Disminuye
IL-10	-1082 A, -819 T, -592 A	Disminuye
IL-6	-174 G	Aumenta
IFN- γ	Intron 1 (CA) n repeat, alelo 2	Aumenta
TGF- β 1	nt915 (Arg25)	Aumenta
TNF- α	<i>a</i>	Sin efecto en la secreción de LT α (TNF β)
TNF- α	<i>a</i> 2	Disminuye
TNF- α	<i>c</i>	Sin efecto en la secreción de LT α (TNF β)
TNF- α	<i>d</i> 3	Aumenta
TNF- α	-1031	Aumenta
TNF- α	-862 (*-863)	Aumenta
TNF- α	-862 (*-863)	Sin efecto
TNF- α	-856 (*-857)	Aumenta
TNF- α	-856 (*-857)	Sin efecto
TNF- α	-574	Sin efecto
TNF- α	-238 A	Aumenta
TNF- α	-238 G \rightarrow A	Sin efecto
TNF- α	-308	Sin efecto
TNF- α	-308A (TNF2)	Aumenta
TNF- α	-376 G \rightarrow A	Sin efecto
TNF- α	+70 G \rightarrow A	Sin efecto
LT- α (TNF β)	Intron 1, <i>Nco</i> I RFLP	Sin efecto en la secreción de LT α (TNF β)
LT α (TNF β)	Intron 1, <i>Nco</i> I RFLP: TNFB*1 (Asn26)	Aumenta
LT α (TNF β)	Intron 1, <i>Nco</i> I RFLP: TNFB*2 (Thr26)	Disminuye
LT α (TNF β)+ TNF- α	Intron 1, <i>Nco</i> I RFLP: TNFB*2 (Thr26), TNFa2	Aumenta
LT α (TNF β)+ TNF- α	Intron 1, <i>Nco</i> I RFLP: TNFB*1 (Asn26), TNFa6	Disminuye

Muchos de los polimorfismos reportados en los genes de citocinas se encuentran dentro de regiones conocidas.⁶⁸

Los motivos por los que se estudian los polimorfismos genéticos en los genes de citocinas asociados a enfermedades en humanos son:

- Aumentar la comprensión de la etiología y patología de las enfermedades.
- Identificar los marcadores potenciales asociados a la susceptibilidad, severidad y resultado clínico.
- Identificar los marcadores en pacientes con capacidad de responder contra los que no, a pruebas terapéuticas.
- Identificar blancos para intervención terapéutica
- Identificar nuevas estrategias para prevenir la enfermedad o mejorar las medidas de prevención existentes, tales como vacunas.

Hasta el momento los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* y *ex vivo* han demostrado asociación entre algunos polimorfismos y ciertas enfermedades.

Tabla 3.

Citocina y Polimorfismo	Enfermedad
IL-10 (IL-10G)	Lupus eritematoso generalizado ⁶⁹
IL-6 -174 C → G	Artritis juvenil ⁷⁰
TNF-α -238	Hepatitis B ⁷¹
TNF-α -308	Artritis reumatoide (enfermedad nodular) ⁷²
TGFβ1 nt509 C → T	Asma (IgE elevada) ⁷³

Tabla 3. Algunos ejemplos de asociación con enfermedades

ANTECEDENTES

Hasta el momento se conoce poco acerca de los mecanismos que influyen en la patogénesis del síndrome de reconstitución inmunológica.^{54,55} Se han identificado algunos factores de riesgo en la susceptibilidad al SIRI, por ejemplo la presencia de infecciones no activas o antígenos no viables, concentraciones inferiores a 50cel/ μ l de cT CD4⁺ y algunos factores genéticos.

Este último punto, el factor genético en la susceptibilidad al SIRI, ha sido estudiado muy poco. En el 2001, Price P. y colaboradores estudiaron algunos determinantes genéticos e inmunológicos en una cohorte de pacientes australianos con SIRI y reportaron una mayor frecuencia del alelo HLA-B44 y el haplotipo HLA -A2, -B44, -DR4 en pacientes con SIRI asociado a retinitis por citomegalovirus y/o encefalomiелitis.⁵⁸

Stone SF y cols, en el 2002, realizaron un estudio donde compararon la biodisponibilidad de IL-6 en plasma en tres grupos de pacientes VIH⁺: pacientes con SIRI asociado a Herpesvirus (CMV, VZV y HSV), pacientes con SIRI asociado con *Mycobacterium avium*, virus hepatitis C o virus del papiloma humano (VPH), y pacientes sin síntomas de SIRI. Observaron que los pacientes con SIRI asociado a herpesvirus presentaban una mayor biodisponibilidad de IL-6 en comparación con los pacientes con SIRI asociado a otro agente.⁷⁴ En un estudio reciente se reportó que los niveles de IL-6 y de sIL-6R (receptor de IL-6 soluble) son mayores en pacientes con SIRI después del TAVAA.⁷⁵ En otro estudio se analizaron los siguientes polimorfismos: IL-1A(-889), IL-1B(+3953), IL-6(-174), TNF- α (-308) e IL-12B (-3'UTR) (promotor). Al analizar el polimorfismo de TNF- α encontraron que los pacientes con SIRI

asociado a micobacterias no presentaban el alelo A -308, de manera interesante este alelo esta asociado a alta producción de TNF- α por lo que al no presentar este alelo, los pacientes son bajos productores de la citocina, por lo que la respuesta a la infección por micobacteria podría ser ineficiente.⁷⁶

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Aunque el desarrollo del síndrome inflamatorio por reconstitución inmunológica está estrechamente relacionado con la reconstitución de la respuesta inmune específica contra patógenos después del inicio de tratamiento antirretroviral, existe controversia acerca del papel de algunas citocinas de tipo T_H1 como IL-2, IFN- γ , TNF- α , o T_H2 como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 en el desarrollo del SIRI. Del mismo modo, el papel genético en la susceptibilidad al SIRI está poco estudiado, se desconoce cual es la potencial relevancia de los polimorfismos asociados a diferentes niveles de expresión, en las secuencias reguladoras de los genes de estas citocinas. El objetivo central de este estudio fue analizar la distribución y la frecuencia de polimorfismos en las secuencias reguladoras de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 y TGF- β en pacientes con SIRI asociado a TAVAA. Este trabajo es el inicio de una línea de investigación que será útil para establecer la relevancia de los polimorfismos de citocinas, su tasa de expresión y la actividad funcional de estas citocinas en la patogénesis del SIRI en pacientes VIH positivos con tratamiento antirretroviral altamente activo.

HIPÓTESIS

Existen polimorfismos en las secuencias reguladoras de genes de algunas citocinas T_H1 (IFN- γ , TNF- α), T_H2 (IL-10) y reguladoras (TGF- β 1, IL-6) que podrían asociarse a una mayor susceptibilidad al síndrome de reconstitución inmunológica en pacientes VIH positivos con TAVAA.

OBJETIVOS

GENERAL

Explorar la posible asociación entre las frecuencias de polimorfismos de algunas citocinas y la susceptibilidad al SIRS, mediante el análisis de estas frecuencias en una cohorte de pacientes VIH⁺ que presentaron el síndrome y en un grupo control que no lo presentó.

ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia y distribución de los diferentes polimorfismos en los genes de TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1, IL-6 e IL-10 en pacientes con VIH que desarrollaron SIRS asociado a TAVAA y en pacientes con VIH que no lo desarrollaron.
2. Determinar si existe asociación genética entre los polimorfismos de los genes de estas citocinas y la susceptibilidad al SIRS.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio descriptivo, transversal, de casos y controles.

POBLACIÓN DEL ESTUDIO

En este estudio se incluyeron 56 pacientes con infección por VIH documentada por evidencia de laboratorio y que firmaron carta de consentimiento informado para análisis de DNA. Los pacientes se reclutaron del Servicio de Infectología para el Paciente Inmunocomprometido (SIPI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), y se dividieron previamente en dos grupos con las siguientes características:

Casos (Grupo 1):

Se incluyeron 26 sujetos que desarrollaron SIRI asociado al TAVAA. El diagnóstico fue llevado a cabo por el grupo clínico del Servicio de Infectología del INER conformado por médicos especializados en el control y seguimiento de pacientes con VIH. El SIRI fue definido como cualquier condición inflamatoria y/o infecciosa presentada en pacientes que reciben tratamiento antirretroviral, siempre y cuando las concentraciones de cT CD4⁺ aumentaron y sus niveles de carga viral disminuyeron.

Controles (Grupo 2):

Se incluyeron 30 sujetos que al iniciar TAVAA no desarrollaron SIRI. Este grupo control fue pareado con los casos según edad, etapa de la enfermedad, concentraciones de cT CD4⁺ y carga viral.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión de casos

1. Pacientes con infección por VIH-1 documentada (ELISA y/o western blot positivo).
2. Con tratamiento antirretroviral altamente activo, que haya incrementado sus niveles de CD4⁺ y disminuido su carga viral.
3. Síntomas consistentes con una condición inflamatoria que aparecieron después del inicio del TAVAA.

Criterios de exclusión de casos.

0. Pacientes tratados con activadores del sistema inmune.
1. Pacientes tratados con esteroides, inmunosupresores o reguladores de la respuesta inmune.

Criterios de inclusión de controles

1. Infección por VIH-1 documentada (ELISA y/o Western blot).
2. Con tratamiento antirretroviral altamente activo, que haya incrementado sus niveles de CD4⁺ y disminuido su carga viral.
3. Sin síntomas de reacciones inflamatorias después de haber iniciado el TAVAA.

Criterios de exclusión de controles.

1. Pacientes tratados con activadores del sistema inmune.
2. Pacientes tratados con esteroides, inmunosupresores o reguladores de la respuesta inmune.

PROCEDIMIENTO

Para conocer la posible asociación de los polimorfismos en secuencias reguladoras de genes de citocinas T_H1 y T_H2 con el síndrome inflamatorio por reconstitución inmunológica (SIRI), se realizó un estudio transversal de casos y controles. Todos los individuos incluidos en el estudio firmaron una carta de consentimiento donde se informó con detalle la finalidad del estudio, así como los riesgos de una venopunción. Se tomaron 6 ml de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA, para extraer el material genético (DNA) del individuo.

Extracción de DNA

Este procedimiento se realizó mediante la metodología *salting out* a partir de sangre total anticoagulada con EDTA. Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) se aislaron mediante la lisis de los glóbulos rojos con una solución hipotónica. Una vez obtenidas, se digirieron con una solución detergente, que contiene SDS y proteinasa K. Después se eliminaron los restos de proteínas con una solución sobresaturada en sales. La precipitación del DNA se realizó con etanol al 100% y al 70% frío. Finalmente el DNA obtenido se rehidrató con agua bidestilada y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Tipificación de polimorfismos

A partir del DNA extraído se realizó la tipificación de los polimorfismos en **IFN- γ** (posición +874 A y +874 T del intrón 1 del gen estructural), en **IL-6** (-174C y -174 G), **TGF- β 1** (Codones 10 T, 10 C, 25 C y 25 G del gen estructural de TGF- β 1), **IL-10** (posiciones del promotor -1082, -819 y -592) y **TNF- α** (-308 A y -308 G); mediante la metodología PCR-SSP (*polymerase chain reaction-sequence*

specific primer) con el kit comercial *Cytokine Genotyping Tray* (One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

La metodología se basa en la especificidad de los oligonucleótidos para la amplificación de una secuencia blanco del genoma con la enzima *Taq* DNA polimerasa recombinante. Los oligonucleótidos que amplifican una secuencia están diseñados de tal forma que cada par de ellos tiene la capacidad de reconocer específicamente un alelo o un grupo de alelos. También se incluyen oligonucleótidos que amplifican una secuencia control, el gen β -globina que no es polimórfico. Después del proceso de PCR, los fragmentos de DNA amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados con bromuro de etidio, expuestos a luz UV. La interpretación de los resultados se basó en la presencia o ausencia de fragmentos específicos de DNA amplificado. (Anexo 2)

La determinación de **carga viral** en plasma se efectuó por el método COBAS Amplicor HIV-1 Monitor® V. 1.5 (RT-PCR Roche Diagnostics), con límites de detección de 400 a 750,000 copias/mL por el método estándar, y de 50 a 100,000 copias/mL por el método ultrasensible.

Los niveles de **CD4⁺** en sangre se cuantificaron por citometría de flujo con el equipo FACSCalibur® (Beckton Dickinson) y un reactivo de inmunofluorescencia directa de tres colores: TriTEST CD4/CD8/CD3® (Beckton Dickinson)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias génicas y genotípicas de los polimorfismos en secuencias reguladoras de genes de citocinas T_H1 y T_H2 se calcularon por conteo directo. Las diferencias entre frecuencias de los grupos se analizaron por medio de tablas de contingencia de 2x2 y la prueba de Chi-cuadrada. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de p menores a 0.05. Estos cálculos se realizaron con el programa estadístico EPINFO v. 5.0. La fuerza de la asociación fue estimada mediante el cálculo de la razón de momios con un intervalo de confianza de 95 %.

RESULTADOS

Se estudiaron 56 individuos (N=56) que cumplieron los criterios de inclusión para casos y controles. En el grupo 1 se clasificaron 26 individuos (con SIRI; n=26), 23 hombres (88.46%) y 3 mujeres (11.54%). En el grupo 2 (sin SIRI; n=30) se incluyeron 25 hombres (83.3%) y 5 mujeres (16.6%). El intervalo de edad del grupo 1 fue de 24 a 51 años, en el grupo 2 fue de 23 a 51 años, la edad entre grupos no mostró diferencias estadísticas ($p=0.95$).

Las concentraciones de cT CD4⁺ de los pacientes, al inicio de tratamiento, fueron por debajo de 200 células/ μ l de sangre en ambos grupos, por lo que se muestra que todos los pacientes incluidos en este estudio se encontraban en una etapa avanzada de la infección al iniciar el TAVAA. La media de las concentraciones de cT CD4⁺ al inicio de TAVAA en el grupo 1 fue de 58 cel/ μ l y en el grupo 2 de 78 cel/ μ l, no se encontraron diferencias significativas en este marcador ($p=0.11$). Al momento de iniciar TAVAA en ambos grupos se observó un incremento en los niveles circulantes de cT CD4⁺, en el grupo 1 la media fue de 174 cel/ μ l y en el grupo 2 fue de 208 cel/ μ l, (no significativa, $p=0.42$).

Los niveles de carga viral antes de iniciar tratamiento fueron similares en ambos grupos ($p=0.72$). Al iniciar TAVAA los niveles de carga viral en ambos grupos disminuyeron. En el grupo de pacientes que presentó SIRI se observó una disminución menor, al comparar ambos grupos se encontró una diferencia significativa ($p<0.05$) **Tabla 4**.

Tabla 4. Características demográficas, inmunológicas y virológicas de los dos grupos de estudio: pacientes con SIRI asociado a TAVAA y pacientes VIH-positivos sin SIRI asociado a TAVAA.

Grupos	Edad		Sexo		Tiempo pos-TAVAA (semanas)	CD4 Pre-TAVAA (Cel/mm ³)	CD4 SIRI (Cel/mm ³)	C. V Pre-TAVAA (RNA Copias/MI)	C.V SIRI* (RNA Copias/mL)
	Rango	Mediana	M	F	Rango	Media	Media	Media	Media
SIRI	24-51 ~ x=34	31	23	3	4 - 36 ~ x=16	58.09	174.41	452,651	13,718
VIH-Control	23-51 ~ x=34	33	25	5	-	78.75	208.50	404,811	35.18

*p<0.05

Con base en observaciones clínicas, el grupo de pacientes que desarrollaron SIRI fue dividido en dos grandes subgrupos, por un lado pacientes que presentaron el síndrome asociado a infección por micobacterias (MAC y MTB) y, en pacientes que lo presentaron en asociación con la familia Herpesviridae (varicela zoster, CMV y SK). Como puede observarse en la **tabla 5**, que muestra las características clínicas y demográficas de estos subgrupos, los agentes infecciosos con los que se asoció con más frecuencia el SIRI fueron MAC (n=7 de 26, 27%) y virus varicela zoster (n=10 de 26, 38%). En promedio, el tiempo más prolongado de manifestación de SIRI, después de iniciar TAVAA, fue de 15 semanas en el subgrupo de pacientes con SIRI asociado a MAC. Por el contrario, el menor tiempo de manifestación fue de 6 semanas en pacientes con SIRI asociado a citomegalovirus. En los pacientes con SIRI asociado a MTB y virus varicela zoster el tiempo de aparición de SIRI fue de 9 y 13.3 semanas respectivamente.

Aunque antes de iniciar tratamiento los pacientes de ambos subgrupos presentaron concentraciones de cT CD4⁺ muy bajas, el subgrupo que presentó las más bajas concentraciones fue él que desarrolló SIRI asociado a MTB, con

un promedio de 28 cel/ μ l. En todos los casos de SIRI hubo un incremento significativo de las concentraciones de cT CD4⁺ después del inicio del tratamiento antirretroviral, aumento mayor al 150% en promedio.

Por otro lado, en ambos subgrupos los niveles de carga viral disminuyeron después del inicio del TAVAA, se observó una disminución de 3 log₁₀ en promedio.

Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes con SIRI asociado a TAVAA.

Manifestaciones Clínicas	Edad	Sexo		Tiempo de pos-TAVAA (semanas)		CD4 Pre-TAVAA (Cel/mm ³)	CD4 en SIRI (Cel/mm ³)	C.V. Pre-TAVAA (RNA Copias/mL)	C.V SIRI (RNA Copias/mL)
	Rango	M	F	x	Rango	Media	Media	Media	Media
Micobacterias									
MAC	27-45	7	0	15	4-36	48.3	119.4	210,766	487.14
MTB	29-42	3	1	9	4-20	28	209.6	NR	78,333
Herpesviridae									
Varicela Zoster	28-51	8	2	13	4-28	73	192.7	446,200	239.66
Citomegalovirus	28-39	2	1	6	4-8	77.5	219	694,000	481
SK	25-49	2	0	8	4-12	59	374	816,000	305

Se calcularon y compararon las frecuencias génicas y genotípicas de los polimorfismos en genes de citocinas en el grupo de pacientes con SIRI comparados con los que no desarrollaron el SIRI. Las citocinas pro-inflamatorias analizadas (IL-6, IFN- γ y TNF- α) no mostraron diferencias entre grupos, tampoco se encontraron diferencias en las frecuencias de los polimorfismos de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- β 1). **Tabla 6**

Tabla 6. Análisis de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en secuencias reguladoras de citocinas entre el grupo 1 y el 2

	SIRI (n=26pac/52 cromosomas)		VIH-control (n=30 pac/60 cromosomas)	
	n	f.g	n	f.g
IL-10 (-1082, -819, -592)				
Genotipos				
GCC/GCC (alto)	1	0.038	2	0.066
GCC/ACC (intermedia)	6	0.230	4	0.133
GCC/ATA (intermedia)	5	0.192	7	0.233
ACC/ACC (bajo)	3	0.115	3	0.100
ACC/ATA (bajo)	8	0.307	11	0.366
ATA/ATA (bajo)	3	0.115	3	0.100
IL-6 (-174)				
Alelos				
G (alto)	42	0.807	52	0.866
C (bajo)	10	0.192	8	0.133
Genotipos				
G/G (alto)	16	0.615	22	0.733
G/C (alto)	10	0.384	8	0.266
C/C (bajo)	0	0	0	0
TNF-α (-308)				
Alelos				
G (bajo)	50	0.961	56	0.933
A (alto)	2	0.038	4	0.066
Genotipos				
G/G (bajo)	24	0.923	26	0.866
G/A (alto)	2	0.077	4	0.133
A/A (alto)	0	0	0	0
IFN-γ (+874)				
Alelos				
A (bajo)	40	0.769	51	0.85
T (alto)	12	0.23	9	0.15
Genotipos				
A/A (bajo)	16	0.615	22	0.733
T/A (Intermedio)	8	0.307	7	0.233
T/T (alto)	2	0.077	1	0.033
TGF-β1 (codón 10 y 25)				
Genotipos				
T/T, G/G (alto)	7	0.269	5	0.166
T/C, G/G (alto)	14	0.538	15	0.5
T/C, G/C (intermedio)	0	0	3	0.1
C/C, G/G (intermedio)	5	0.192	7	0.233
T/T, G/C (intermedio)	0	0	0	0

f.g: frecuencia génica; **n:** número de casos

Aunque no se encontraron diferencias en el análisis de los polimorfismos de genes de citocinas entre los pacientes que presentaron SIRI y los que no, se observaron algunas tendencias interesantes al comparar los subgrupos determinados por el tipo de patógenos asociados a SIRI: 1) **Herpesvirus** en donde se incluyeron virus varicela zoster, citomegalovirus (CMV) y sarcoma de Kaposi (SK), y 2) **Micobacterias** incluyendo al complejo *Mycobacterium avium intracellulare* (MAC) y a *Mycobacterium tuberculosis*.

El genotipo homocigoto G/G asociado a una producción alta de **IL-6** se encontró en una menor frecuencia en pacientes con SIRI asociado a micobacterias (45%) en comparación con los pacientes con SIRI asociado a herpesvirus (75%) y el grupo sin SIRI o grupo VIH⁺ control (73%). El genotipo heterocigoto T/A asociado a una producción intermedia de **IFN- γ** se observó con mayor frecuencia en pacientes con SIRI asociado a herpesvirus (41%) en comparación con pacientes con SIRI asociado a micobacterias (18%) y pacientes sin SIRI (23%), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. **Tabla 7**

En contraste, los genotipos asociados a una producción intermedia de **IL-10** (GCC/ACC y GCC/ATA) fueron significativamente más frecuentes en pacientes que presentaron SIRI asociado a herpesvirus que en pacientes con SIRI asociada a micobacterias (66% contra 18%; RM=0.11, IC=0.01-1.03, $\chi^2=5.49$, $p=0.019$), al comparar el grupo de pacientes con SIRI asociado a herpes y el grupo control, se observó una mayor frecuencia en el primero (66% contra 36%), esta diferencia no fue estadísticamente significativa sin embargo, se observa una tendencia ($p=0.07$). De manera interesante, los genotipos asociados a una baja producción de **IL-10** (ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA) son más frecuentes en

pacientes con SIRI asociado a micobacterias que en pacientes con SIRI asociado a herpes (81% contra 33%; RM=9.00, IC=0.97-107.6, $\chi^2=5.49$, p=0.019), al comparar esta frecuencia con el grupo control, encontramos una frecuencia mayor (81% vs 56%).

Al comparar las frecuencias en los genotipos de **TGF- β 1** entre subgrupos, no se observaron diferencias significativas. **Tabla 8.**

Tabla 7. Frecuencias génicas y genotípicas de los polimorfismos en secuencias reguladoras de citocinas pro-inflamatorias entre el grupo de pacientes con SIRI por micobacterias (N=11) y SIRI por herpes virus (N=12).

	SIRI-MIC (n=11 pac/22 cromosomas)		SIRI-HERPES (n=12 pac/24 cromosomas)		HIV-control (n=30 pac/ 60 cromosomas)	
	n	f.g	n	f.g	n	f.g
IL-6 (-174)						
Alelos						
G (alto)	16	0.727	21	0.875	52	0.866
C (bajo)	6	0.272	3	0.125	8	0.133
Genotipos						
G/G (alto)	5	0.454	9	0.750	22	0.733
G/C (alto)	6	0.545	3	0.250	8	0.266
C/C (bajo)	0	0	0	0	0	0
IFN-γ (+874)						
Alelos						
A (bajo)	18	0.818	19	0.791	51	0.850
T (alto)	4	0.181	5	0.208	9	0.150
Genotipos						
A/A (bajo)	8	0.727	7	0.583	22	0.733
T/A (intermedio)	2	0.181	5	0.416	7	0.233
T/T (alto)	1	0.090	0	0	1	0.033
TNF-α (-308)						
Alelos						
G (bajo)	21	0.954	23	0.958	56	0.933
A (alto)	1	0.045	1	0.041	4	0.066
Genotipos						
G/G (bajo)	10	0.909	11	0.916	26	0.866
G/A (alto)	1	0.090	1	0.083	4	0.133
A/A (alto)	0	0	0	0	0	0

- **Micobacterias:** *Mycobacterium avium intracellulare* (n=7) y *Mycobacterium tuberculosis* (n=4).

- **Herpesviridae:** Herpes zoster virus (n=8), Citomegalovirus (n=2) y Sarcoma de Kaposi (n=2).

Tabla 8. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos en secuencias reguladoras de citocinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β 1) entre el grupo de pacientes con SIRI asociado a micobacterias y el grupo de pacientes con SIRI por herpes.

	SIRI-MIC (n=11 pac/22 cromosomas)		SIRI-HERPES (n=12 pac/24 cromosomas)		HIV-control (n=30 pac/60 cromosomas)	
	n	f.g	N	f.g	n	f.g
TGF-β1 (codón 10 y 25)						
Genotipos						
T/T, G/G (alto)	3	0.272	3	0.250	5	0.166
T/C, G/G (alto)	5	0.454	8	0.666	15	0.500
T/C, G/C (intermedia)	0	0	0	0	3	0.100
C/C, G/G (intermedia)	3	0.272	1	0.083	7	0.233
T/T, G/C (intermedia)	0	0	0	0	0	0
IL-10 (-1082, -819, -592)						
Genotipos						
GCC/GCC (alto)	0	0	0	0	2	0.066
GCC/ACC (intermedia)*	2	0.181	3	0.250	4	0.133
GCC/ATA (intermedia)*	0	0	5	0.416	7	0.233
ACC/ACC (bajo)&	1	0.090	1	0.083	3	0.100
ACC/ATA (bajo)&	6	0.545	2	0.166	11	0.366
ATA/ATA (bajo)&	2	0.181	1	0.083	3	0.100

* Suma de los genotipos de producción intermedia IL-10. $p=0.019$,
 $RM=0.11$, $IC95\%=0.01-1.03$, $\chi^2=5.49$.

& Suma de los genotipos de baja producción IL-10. $p=0.019$,
 $RM=9.00$, $IC95\%=0.97-107.60$, $\chi^2=5.49$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio se describen las frecuencias génicas y genotípicas de polimorfismos en secuencias reguladoras de genes de citocinas pro-inflamatorias: IFN- γ (+874), TNF- α (-308) e IL-6 (-174); y anti-inflamatorias: IL-10 (-1082, -819,-592) y TGF- β 1 (codón 10 y 25) en pacientes con infección por VIH que desarrollaron SIRS asociado a TAVAA. El objetivo central de este estudio fue determinar la distribución de los polimorfismos de los genes de estas citocinas en pacientes con SIRS y evaluar su potencial relevancia como factores asociados a la susceptibilidad al SIRS. Los pacientes incluidos en este estudio fueron reclutados por el equipo clínico del Servicio de Infectología del INER. Los pacientes se clasificaron en dos grupos: el primero compuesto por individuos VIH positivos que presentaron SIRS después de iniciar el TAVAA y el segundo grupo formado por individuos con infección por VIH que después del inicio de TAVAA no presentaron SIRS. Los grupos fueron pareados de acuerdo a características demográficas (edad y sexo), y características clínicas (la etapa de la enfermedad determinada por las concentraciones de células T CD4⁺ y niveles de carga viral). En los dos grupos, las concentraciones de cT CD4⁺ al momento de iniciar tratamiento fueron menores a 200 células/ μ l de sangre, en el grupo de pacientes que presentaron SIRS la media fue de 58 cel/ μ l mientras que en el grupo de pacientes sin SIRS la media fue de 78 cel/ μ l, al aplicar estadística no se encontró una diferencia significativa entre estos grupos. En estudios previos se ha sugerido que pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad presentan mayor susceptibilidad para desarrollar SIRS^{57,78}, debido a que concentraciones bajas de cT CD4⁺ incrementan la

probabilidad de tener infecciones subclínicas o persistentes de patógenos oportunistas, y al restituirse el sistema inmune, sobre todo la respuesta específica contra patógenos, este puede reaccionar de forma exacerbada produciendo inflamación.

Las concentraciones de cT CD4⁺ durante el TAVAA incrementaron en ambos grupos, en el grupo de pacientes con SIRI la media fue de 174 cel/ μ l mientras que en el grupo sin SIRI la media fue de 208 cel/ μ l, aunque se observa un mayor incremento en el grupo que no presentó el SIRI esta diferencia no mostró ser estadísticamente significativa.

Al analizar los valores de carga viral al inicio del tratamiento no se encontraron diferencias estadísticas. Ambos grupos presentaron 400,000 copias/mL en promedio, es decir, aproximadamente 5.6 log₁₀. Durante el tratamiento las concentraciones de carga viral en ambos grupos disminuyó, aunque se observó una mayor disminución en los pacientes que no presentaron el SIRI (4 log₁₀) en comparación de los que si presentaron SIRI (1.5 log₁₀), al aplicar estadística se encontró una diferencia significativa en este marcador entre grupos. Esta diferencia entre grupos sugiere que los pacientes que presentan SIRI no poseen una buena respuesta inmune específica contra el virus aún con el inicio de tratamiento, esta posibilidad se podría verificar con un estudio prospectivo.

En el análisis comparativo entre la población total de pacientes con SIRI (n=26) y la de controles (n=30), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de polimorfismos en IL-10 (-1082, -819, -592), IL-6 (-174), TNF- α (-308) y TGF- β 1 (codón 10 y 25).

Sin embargo algunos autores han sugerido que los mecanismos inmunológicos involucrados en la patogénesis del SIRI son diferentes en las enfermedades

por micobacterias y por herpesvirus^{55,57}. Con base en esto, los pacientes se clasificaron de acuerdo al microorganismo causante del SIRI: aquellos que presentaron SIRI asociado a micobacterias (MAC y MTB) e individuos que presentaron SIRI asociado a Herpesvirus (varicela zoster virus, citomegalovirus y Sarcoma de Kaposi). En este contexto, se encontró que la frecuencia de los genotipos GCC/ATA y GCC/ACC, asociados a una producción denominada intermedia de IL-10, se encuentran con menor frecuencia en pacientes con SIRI por micobacterias en relación a pacientes con SIRI por herpes virus (f.g=0.18 contra 0.66) o el grupo VIH-control (f.g=0.18 contra 0.36). De manera interesante, los genotipos ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA asociados a una baja producción de IL-10, son más frecuentes en el grupo de SIRI por micobacterias, 81% en relación con el grupo de SIRI por herpes, 33% (p=0.01) o el grupo control (56%). Este es el primer estudio donde se describe una potencial relevancia en la asociación de un polimorfismo que esta asociado a una baja producción de IL-10, con la aparición de SIRI. Sin embargo, con estos datos sería aventurado decir que los pacientes con SIRI por micobacterias se caracterizan por una inhibición deficiente en la respuesta inflamatoria contra micobacterias, por lo que éstos datos deben confirmarse en un estudio más grande y de corte prospectivo y/o funcional. Se sabe que la IL-10 es una citocina determinante en la inhibición de la activación de macrófagos y células T productoras de citocinas pro-inflamatorias por lo que sería determinante estudiar el efecto funcional de sus polimorfismos en la tasa de producción de IL-10.

Por otro lado, la IL-6 es una citocina producida principalmente por monocitos y macrófagos que activa cT CD4⁺ e induce respuesta de fase aguda. Stone et al,

reportó que los pacientes con VIH que desarrollan enfermedad por reconstitución inmunológica infecciosa o inflamatoria después del inicio de TAVAA generalmente producen mayor cantidad de IL-6 en relación con sujetos que no desarrollan la enfermedad. Dentro de este contexto, se describe que los sujetos que desarrollan la enfermedad por reconstitución inmunológica asociada a herpes virus producen mayor cantidad de IL-6 que otros subgrupos de pacientes como los pacientes con MAC, HCV o HPV.⁷⁴ En nuestros resultados encontramos que el genotipo homocigoto G/G -174, asociado a una alta producción de IL-6, se encontró con una frecuencia de 45% en el grupo de SIRI por micobacterias contra un 75% en el grupo de SIRI por herpes, sin embargo al analizar la frecuencia en nuestro grupo de pacientes que no presentó el síndrome encontramos una frecuencia de 73%, ninguna de estas diferencias entre frecuencias fue estadísticamente significativa. Si se aumenta el número de muestra y se encuentra una diferencia importante entre estos grupos se podría sugerir que los individuos que presentan SIRI asociado a micobacterias presentan con menor frecuencia genotipos homocigotos asociados a una alta producción de IL-6.

Hasta el momento hay mucha controversia acerca de cuales son los factores genéticos que podrían tener relevancia en la susceptibilidad al SIRI en pacientes bajo tratamiento antirretroviral altamente activo. Se calcula que los factores genéticos podrían explicar solo una tercera parte de los casos en algunas enfermedades de tipo inflamatorio e infeccioso.⁵⁷ Se han estudiado otros genes como el HLA-B44 y el haplotipo HLA-A2,B44,DR4 que es relativamente común en pacientes con SIRI asociado a retinitis por CMV y/o

encefalomielitis asociado presumiblemente a la infección por HSV.⁷³ En estudios recientes donde se analizaron polimorfismos en los genes de citocinas como IL-6 y TNF α , se concluyó que el polimorfismo C (-174) de la IL-6 es menos común en pacientes que presentaron SIRS asociado a micobacterias (36%) que en aquellos que presentaron SIRS por herpes (71%) e incluso en aquellos pacientes que no presentaron SIRS durante TAVAA (64%).⁷⁷

Se sabe también que debido a la reconstitución del sistema inmunológico de un paciente con VIH después del comienzo de TAVAA, la capacidad de montar una respuesta inflamatoria contra algunos antígenos presentes previamente en el organismo se restaura. Sin embargo esta restauración es relativa, por lo que se piensa que la desregulación en la producción de citocinas o en la activación de algunas células efectoras podría tener un papel importante en este proceso inflamatorio. El aumento de las cT de memoria en las primeras semanas del TAVAA también podrían contribuir a la aparición del SIRS por su activación en respuesta a antígenos presentes previamente en el organismo. Este trabajo tiene limitantes importantes como el número de marcadores estudiados y el tamaño de muestra que es relativamente pequeño para determinar el efecto genético en la susceptibilidad a SIRS. Lo anterior sugiere que sería importante ampliar el tamaño de la muestra para verificar si las tendencias encontradas se hacen evidentes y confirman nuestras diferencias. Otro punto importante es analizar desde el punto de vista funcional los patrones de expresión de estas citocinas e incluso de otras, para evaluar con una mayor precisión los mecanismos de activación o estimulación de procesos fisiológicos que interfieran en el síndrome inflamatorio por reconstitución inmunológica.

En conclusión, podemos decir que no se encontraron polimorfismos en las secuencias reguladoras de citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias como TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-10 o TGF- β asociados al desarrollo del SIRI en pacientes VIH⁺ con TAVAA.

Los pacientes que desarrollaron SIRI asociado a micobacterias parecen presentar frecuencias de polimorfismos diferentes a aquellos que desarrollaron SIRI asociado a herpesvirus.

Los pacientes con SIRI asociados a micobacterias tienen con menor frecuencia genotipos asociados a una producción intermedia de IL-10, en comparación con el grupo de SIRI asociado a Herpes e incluso pudiera ser en comparación al grupo que no presentó el síndrome inflamatorio.

Los pacientes con SIRI asociado a micobacterias (MAC y *M. tuberculosis*) tienen con mayor frecuencia genotipos que se asocian con baja producción de IL-10 en las posiciones -1082, -819, -592 (ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA).

Es necesario ampliar el tamaño de la muestra para confirmar algunas tendencias, así como realizar estudios funcionales.

REFERENCIAS

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* 1983; 220: 868-71.
2. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, et al. Isolation of human T cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 865-7.
3. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira O. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343.
4. Liu SL, Schacker T, Musey L, et al. Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: HIV type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol* 1997; 71: 4284-95.
5. WHO. Annual AIDS epidemic update reports, 2003.
6. Korber, B. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288:1789-1796.
7. Korber, B. et al. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br. Med. Bull* 2001; 58:19-42.
8. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat med* 2002; 8 (7): 673-680.
9. Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, et al. HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature* 1988; 333: 504.

10. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, et al. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 1992; 256: 1783-1790.
11. Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 1990; 249: 1555-1558.
12. Ashorn P, McQuade TJ, Thaisrivongs S, et al. An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7472-7476.
13. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998; 393: 648-59.
14. Malim MH, Hauber J, Le SY, et al. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989; 338 (6212): 254-7.
15. Garcia JV, Miller AD. Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol* 1992; 143: 52-55.
16. Pandori MW, Fitch NJ, Craig HM, et al. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol* 1996; 70: 4283-4290
17. Braaten D, Franke EK, Luban J. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol* 1995; 69: 6859-6864.

18. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 1992;66 (12): 7193-7200.
19. Høglund S, Ohagen A, Lawrence K, et al. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 1994; 201 (2): 349-355.
20. Levy JA. Infection by human immunodeficiency virus - CD4 is not enough. *N Engl J Med* 1996; 335:1528-30.
21. White JM. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu Rev Physiol* 1990; 52: 675-97
22. Moore JP, Binley J. Envelope's letters boxed into shape. *Nature* 1998; 393: 630-1.
23. Greene WC. The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *N Engl J Med* 1991; 324: 308-17
24. Cullen BR, Green WC. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* 1989; 58: 423-6.
25. Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998; 280: 1880-3
26. C. Bradley Hare. Clinical overview of HIV disease in *HIV Insite*.
27. Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 487-512.
28. Roos MT, de Leeuw NA, Claessen FA, et al. Viro-immunological studies in acute HIV-1 infection. *AIDS*. 1994 Nov; 8(11): 1533-8.
29. Pedersen C, Dickmeiss E, Gaub J, Ryder LP, Platz P, Lindhardt BO, Lundgren JD. T-cell subset alterations and lymphocyte responsiveness to mitogens and antigen during severe primary infection with HIV: a case

- series of seven consecutive HIV seroconverters. *AIDS*. 1990 Jun;4(6): 523-6.
30. Pantaleo G, Fauci AS. Tracking HIV during disease progression. *Curr Op Immunol* 1994; 6: 600-4.
 31. 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 Jan; 373(6510): 123-6.
 32. Longini IM, Clark WS, Gardner LI, Brundage JF. The dynamics of CD4⁺ T-lymphocyte decline in HIV-infected individuals: a Markov modeling approach. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1991 4(11):1141-7
 33. Buchbinder S VE, Kaslow R. HIV disease progression and associated genetic markers. In: Program and Abstracts of the 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 1-5, 1998, Chicago.
 34. Pantaleo G., Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 825-54.
 35. Mitsuyasu. Immune Reconstitution Strategies in HIV Infection. Improving the management of HIV Disease 1999; 7(5).IAS-USA
 36. Cooney EL, Clinical indicators of immune restoration following highly active antiretroviral therapy. *Clin Infec Dis* 2002; 34:224-33.
 37. Brodt HR, Kamps BS, Gute P, et al. Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *AIDS* 1997; 11:1731-1738.
 38. Hoffmann C., Kamps BS. HIV Medicine 2003. Flying Publisher. Hamburg/Kiel and Paris/Cagliari, January 2003

39. Bower M, Fox P, Fife K, Gill J, Nelson M, Gazzard B. Highly active antiretroviral therapy (HAART) prolongs time to treatment failure in Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1999; 13: 2105-11.
40. Pakker NG, Roos MTL, van Leuwen R, de Jong MD, Koot M, Reiss P, Lange JMA, Miedema F, Danner SA, Schellekens PTA. Patterns of T-cell repopulation, virus load reduction, and restoration of T-cell function in HIV-infected persons during therapy with different antiretroviral agents. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16: 318-26.
41. Notermans DW, Pakker NG, Haan D, Foudraine NA, Kaufmann RH, Meenhorst PL, Goudsmit J, Roos MTL, Schellekens PTA, Miedema F, Danner SA. Immune reconstitution after 2 years of successful potent anti-retroviral therapy in previously untreated human immunodeficiency virus type 1- infected adults. *J Infect Dis* 1999; 180: 1050-6.
42. Andersson J, Fehniger T, Patterson B, et al. Early reduction of immune activation in lymphoid tissue following highly active HIV therapy. *AIDS* 1998; 12: 123-9.
43. Bucy R, Hockett R, Derdeyn C, et al. Initial increase in blood CD4+ lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 1999; 103: 1391-8.
44. Connick E, Lederman M, Kotzin B, et al. Immune reconstitution in the first year of potent antiretroviral therapy and its relationship to virologic response. *J Infect Dis* 2000; 181: 358-63
45. Powderly WG, Landay A, Lederman MM. Recovery of the immune system with antiretroviral therapy. The end of opportunism?. *JAMA* 1998; 280: 72-7.

46. Imami N, Antonopoulos C, Hardy GA, Gazzard B, Gotch FM. Assessment of type-1 and type-2 cytokines in HIV-infected individuals: Impact of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retrovir* 1999; 15: 1499-1508.
47. Kelleher AD, Sewell WA, Cooper DA. Effect of protease therapy on cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 147-52.
48. Gray CM, Schapiro JM, Winters MA, Merigan TC. Changes in CD4+ and CD8+ T cell subsets in response to highly active antiretroviral therapy in HIV type 1-infected patients with prior protease inhibitor experience. *AIDS Res Hum Retrovir* 1998; 14: 561-9.
49. French M, Mallal S, Dawkins R. Zidovudine-induced restoration of cell-mediated immunity to mycobacteria in immunodeficient HIV-infected patients. *AIDS* 1992; 6: 1293-7.
50. Mallal S, James I, French M, Detection of subclinical *Mycobacterium avium intracellulare* complex infection in immunodeficient HIV-infected patients treated with zidovudine. *AIDS* 1994; 8: 1263-9.
51. John M, French M. Exacerbation of the inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* after antiretroviral therapy. *Med J Aus* 1998; 169: 473-4.
52. Race E, Adelson-Mitty J, Kriegel G, et al. Focal mycobacterial lymphadenitis following initiation of protease-inhibitor therapy in patients with advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998; 351: 252-55.

53. Karavellas M, Lowder C, MacDonald J, et al. immune recovery vitreitis associated with inactive cytomegalovirus retinitis: a new syndrome. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 169-75.
54. Shelburne S, et al. Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome: Emergence of a Unique Syndrome During Highly Active Antiretroviral Therapy. *Medicine* 2002; 81(3):213-227.
55. Stoll M. and Schmidt R.E. Immune Restoration Inflammatory Syndromes: The Dark Side of Successful Antiretroviral Treatment. *Update on AIDS* 2003; 5:266-276.
56. Cheng VC, Yuen KY, Chan WM, Wong SS, Ma ES, Chan RM. Immunorestitution disease involving the innate and adaptative response. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 882-92.
57. French MA, Lenzo N, John M, Mallal SA, McKinnon EJ, James IR, et al. Immune restoration disease after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2000; 1: 107-15
58. Price P, Keane NM, Stone SF, Cheong KY, French MA. MHC haplotypes affect the expression of opportunistic infections in HIV patients. *Human Immunol* 2001, 62: 157-164.
59. Onishi M, Nosaka T, Kitamura T. Cytokine receptors: structures and signal transduction. *Int Rev of Immunol* 1998; 16: 617- 34.
60. Bidwell J et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on line databases. *Genes and Immunity* 1999; 1:3-19.

61. Abbas AK, Williams ME, Burstein HJ, Chang TL, Bossu P, Lichtman AH. Activation and functions of CD4+ T-cell Subsets. *Immunol Rev* 1991; 123: 5-22.
62. Lederer JA, Liou JS, Todd MD, Glimcher LH, Lichtman AH. Regulation of cytokine gene expression in T helper cell subsets. *J Immunol* 1994; 152: 77-86.
63. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146.
64. Shearer GM, Clerici M. Cytokine profiles in HIV type 1 disease and protection. *AIDS Res and Human Retroviruses* 1998; 14(2): S149-52.
65. Miossec P, van den Berg W. Th1/Th2 cytokine balance in Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1997; 40: 2105-15.
66. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679-691.
67. Bidwell JL, Wood NAP, Morse HR, Olomolaiye OO, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments. *Eur J Immunogenet* 1998; 25: 83-266.
68. Bidwell JL, Wood NAP, Morse HR, Olomolaiye OO, Keen LJ, Laundry GJ. Human Cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement 1. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 135-223.
69. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Fiels M, Gallagher G. Association between polymorphisms at the IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1997; 49: 266-71.
70. Fishman D, Faulds G, Jeffery R et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6

- levels, and an association with systemic onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-76.
71. Höhler T, Kruger A, Gerken G et al. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 579-82.
72. Vinasco J, Beraun Y, Nieto A et al. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; 49: 74-78
73. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1998; 158: 1958-62.
74. Stone SF, Price P, Brochier J, French MA. Plasma bioavailable interleukin-6 is elevated in human immunodeficiency virus-infected patients who experience herpesvirus-associated immune restoration disease after start of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2001; 184(8) :1073-7.
75. Stone FS, Price P, Keane NM, Murria RJ, French MA. Levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor are increased in HIV patients with a history of immune restoration disease after HAART. *HIV med* 2002; 3(1): 21-7.
76. Price P, Morahan G, Huang D, Stone E, Cheong KY, Castley A, Rodgers M, McIntyre KY, Abraham LJ, French MA. Polymorphisms in cytokine genes define subpopulations of HIV-1 patients who experienced immune restoration diseases. *AIDS* 2002; 16: 2043-2047.
77. French M, Price P, Stone S. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS* 2004, 18: 1615-1627.

ANEXO 1

TÉCNICAS UTILIZADAS

1. EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO SALTING OUT.

Miller *et al.* Nucleic Acids Research 16: 1215, 1998 según lo modificado por L.A. Baxter-Lowe y K.W. Lee. Contribución de Carolyn Hurley.

Objetivo

Aislar y purificar DNA genómico a partir de sangre total, para utilizarlo en procedimientos de biología molecular y estudios inmunogenéticos.

Reactivos

- Solución de lisis de glóbulos rojos.
 - dH₂O estéril 1.0 L
 - NH₄Cl 7.5 g
 - Tris 1.0 g

Disolver el NH₄Cl y el Tris en agua estéril. Ajustar el pH a 7.2. **Mantener en refrigeración.** Vida media aproximada: 6 meses.

- Buffer de lisis de células nucleadas
 - 10 mM Tris pH 8.2
 - 400mM NaCl
 - 2 mM EDTA
 - pH 8.2 con HCl

Para 100 mls: 10 ml 1M Tris a pH 8.0, 0.8 ml 5M NaCl, 0.4 ml 0.5 M EDTA a pH 8.0, 90 ml dH₂O. El pH debe ajustarse a 8.2 con HCl o NaOH.

- SDS al 10% ----- PRECAUCIÓN este reactivo es extremadamente dañino si se inhala.
- Proteinasa K (2 mg/ml) en dH₂O. Almacenar congelada.
- NaCl 5.3 M
- Etanol al 100% y al 75% frío

Material y equipos

- Pipetas serológicas desechables
- Micropipetas y puntas 200 μ l y 1000 μ l
- Tubos de polipropileno o poliestireno de 15 mL
- Tubos eppendorf de 1.5 mL o 2 mL.
- Vórtex
- Centrífuga
- Micro centrífuga
- Baño maría (65°C)
- Campana de flujo laminar

Precauciones y advertencias

1. Algunas sustancias como Tris, EDTA, HCl son consideradas peligrosas por lo que se recomienda utilizarlos con precaución. Evitar el contacto con ojos o piel, en caso de accidente lavar el área afectada con grandes cantidades de agua y comunicarlo al coordinador del área o al responsable.

2. El SDS es extremadamente dañino si se inhala por lo que se recomienda prepararlo en una campana de extracción.

3. La sangre y todos los fluidos corporales humanos son considerados como potencialmente infecciosos por lo tanto es necesario leer el manual de bioseguridad del laboratorio, antes de comenzar el procedimiento.

4. Es importante mantener congelada a -20°C la proteinasa k, hasta su utilización. Después de esto congelar rápidamente.

Procedimiento

1. Agregar 4mL de buffer de lisis de glóbulos rojos frío (0 a -5°C) a 4mL de sangre total o paquete leucocitario. Mezclar por inversión.
2. Centrifugar 10 min. a 2000 r.p.m y desechar el sobrenadante. Secar el borde del tubo con una toalla de papel.
3. Adicionar 2mL de buffer de lisis de glóbulos rojos. Mezclar por inversión para resuspender el pellet.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 2500 r.p.m. Desechar el sobrenadante. Repetir pasos 3 y 4 hasta que el pellet sea de color blanco o rosa claro.
5. Agregar 350 μl de buffer de lisis de células nucleadas y 50 μl de SDS al 10%.
6. Agregar 100 μl de proteinasa K (2mg/ml) y mezclar con puntas, no vortexear.
7. Incubar a 65°C durante toda la noche.
8. Agregar 175 μl de NaCl 5.3 M y centrifugar a máxima velocidad durante 15 minutos.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
10. Agregar 1 mL de etanol frío al 100%. Mezclar de 6 a 10 veces por inversión para precipitar el DNA.
11. Centrifugar durante 10 minutos a máxima velocidad.

12. Retirar el sobrenadante con mucho cuidado de no llevarse el pellet.
Lavar el pellet con 1 mL de etanol al 75% frío. Deshacer el pellet con golpecitos.
13. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
14. Retirar el etanol y dejar los tubos con la tapa abierta para que el etanol sobrante se evapore.
15. Agregar 100 μ l de agua estéril. Congelar a -20°C .

2. TIPIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE CITOCINAS

Cytokine Genotyping Tray (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA)

Objetivo

Genotipificar los siguientes factores de citocinas:

- Factor transformante de crecimiento - β 1 (TGF- β 1)
- Factor de necrosis tumoral - α (TNF- α)
- Interleucina - 6 (IL-6)
- Interleucina - 10 (IL-10)
- Interferón - γ (IFN- γ)

Estos factores han sido seleccionados con base en los intereses actuales de investigación y su posible función en el trasplante de órganos.

Introducción

Las citocinas son cruciales en la comunicación celular y, por lo tanto, elementos claves en la activación y supresión de la respuesta inmune. Estudios recientes han relacionado los genotipos de TNF- α , TGF- β 1, IL-6 e IL-10 con los niveles de expresión de estas citocinas. Además, el genotipo de estas citocinas puede ser relevante en la respuesta inmunológica del paciente hacia un órgano transplantado.

Fundamento

La metodología por PCR-SSP se basa en una completa especificidad de los oligonucleótidos para la amplificación de una secuencia blanco del genoma, con la utilización de la enzima *Taq* polimerasa. Los oligonucleótidos que amplifican una secuencia, están diseñados de tal forma que cada par de ellos

reconocen específicamente un alelo o un grupo de alelos y cada producto amplificado tiene un peso molecular determinado.

Después del proceso de reacción en cadena de la polimerasa, los fragmentos de ADN amplificados son separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados con bromuro de etidio y expuestos a luz UV. La interpretación de los resultados se basa en la presencia o ausencia de fragmentos específicos de ADN amplificado.

La amplificación puede afectarse por varios factores: errores en el pipeteo, calidad pobre del ADN o presencia de inhibidores, entre otros. Por lo anterior se incluyen oligonucleótidos que amplifican una secuencia control. Esta secuencia control es una región altamente conservada del gen de la β -globina, que se encuentra presente en todas las muestras de ADN y es utilizada para verificar la integridad de la PCR.

Reactivos

El Kit de genotipificación de citocinas provee oligonucleótidos con secuencias específicas para la amplificación de alelos seleccionados de TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ , IL-6 y IL-10, y del gen β -globina. Se conoce que estos alelos están asociados con los niveles de expresión de estos factores.

Advertencias y precauciones

1. Recomendado para investigación, no recomendado para procedimientos de diagnóstico.
2. El bromuro de etidio utilizado en esta técnica es potencialmente cancerígeno. Siempre utilizar guantes cuando se manipule el gel.

3. La sangre y todos sus componentes deben ser tratados como potencialmente infecciosos.
4. Precaución: utilizar protección ocular contra la luz ultravioleta, no ver la luz UV directamente cuando se analice o fotografíe el gel.
5. Las pipetas utilizadas para procedimientos de post-PCR no deben ser utilizadas para procedimientos Pre-PCR.

Requerimientos de los equipos

1. Programación del Termociclador Perkin Elmer 9600 o 9700.

El siguiente programa está diseñado para el termociclador Perkin Elmer 9600 o 9700. Si posee un modelo o marca diferente de termociclador necesita adaptar este programa a su equipo.

One Lambda PCR Program

No. de ciclos	Pasos	Temp. (°C)	T. (seg.)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Final	1	4	∞

Recolección y preparación de muestras

El ADN debe ser purificado a partir de leucocitos humanos por cualquier método conocido.

1. Las muestras de ADN que van a ser utilizadas en el análisis por PCR-SSP deben estar resuspendidas en agua estéril o en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0-9.0 a una concentración de 25-200ng/ml con una pureza entre 1.65-1.80.
2. Las muestras no deben ser resuspendidas en soluciones que contengan agentes como EDTA.
3. Las muestras de ADN deben ser usadas inmediatamente después de su aislamiento o almacenadas a -20°C por periodos largos de tiempo (1 año) sin efectos adversos.
4. Las muestras de ADN deben ser transportadas a 4°C para preservar su integridad.

Material y equipos

- 4 placas de 96 pozos
- 24 tubos de D-mix (con 180 µl cada uno)
- 6 etiquetas para placas.
- Pipetas mecánicas.
- Puntas desechables.
- Vortex
- Microcentrífuga
- Termociclador para PCR con formato de 96 pozos
- Placa caliente o microondas para las soluciones calientes de agarosa.
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador de luz UV
- Sistema de documentación de imagen o fotográfico
- Taq polimerasa recombinante.

Preparación de la muestra:

Purificar el ADN genómico a partir de leucocitos por el método a elección. La concentración final debe ser de 25-200 ng/ μ l (100ng/ μ l), con una espectro de absorción entre 260-280. Una vez purificado, debe almacenarse a -20°C o utilizada.

Preparación de reactivos y equipos:

Programar el termociclador conforme al programa de One Lambda PCR.

Tener disponible la Taq polimerasa (almacenada a -20°C)

Preparar el gel para electroforesis (2.5% de agarosa)

Instrucciones de pipeteo de la Taq polimerasa:

Pipetear suavemente, usando pipetas calibradas.

La punta de la pipeta debe pasar la superficie del líquido. **No debe sumergirse la punta de la pipeta en el líquido.**

Cuidadosamente quitar el exceso de líquido en la punta, en el borde del vial.

Nota: la Taq polimerasa es sumamente viscosa por lo que se debe tener especial cuidado al hacer alícuotas.

Procedimiento

1. Colocar a temperatura ambiente (20-25°C): las muestras de ADN; el volumen (tubo) de D-mix y la placa.

Nota: cortar la placa según lo necesario para número de muestras a procesar, inmediatamente guardar los que no se vayan a utilizar a su temperatura correspondiente.

Mezclar con el vortex las muestras de ADN, mezclar bien.

Colocar el primer set de la placa en el Rack (PCR Tray Microtube Storage Rack) y remover la etiqueta.

2. Remover la Taq polimerasa de los -20°C , y mantenerla en hielo hasta su utilización.

3. Agregar $1\ \mu\text{l}$ de diluyente de ADN al pozo de control negativo.

4. Agregar $1\ \mu\text{l}$ de Taq polimerasa (5 unidades/ μl) al tubo de D-mix ($180\ \mu\text{l}$).

5. Cerrar el tubo y vortexear durante 5 segundos. Cuidar que el líquido no se quede en las paredes.

6. Colocar $9\ \mu\text{l}$ de D-mix al control negativo.

7. Agregar $19\ \mu\text{l}$ de la muestra de ADN al tubo de D-mix.

8. Cerrar el tubo y vortexear durante 5 segundos.

9. Alicuotar $10\ \mu\text{l}$ de la mezcla a cada pozo, **excepto al control negativo**.

10. Cubrir los pozos con la etiqueta. Verificar que todos los tubos estén completamente cubiertos por ésta para evitar la evaporación durante la PCR.

11. Colocar la placa en el termociclador y cerrarlo.

12. Programar el termociclador, si esta disponible, especificar el volumen de la reacción $10\ \mu\text{l}$.

13. Comenzar el programa de PCR. El programa tarda aproximadamente 1 hora 16 minutos. El último paso puede mantenerse a 4°C hasta que el equipo se parado.

14. Remover la placa del termociclador, remover cuidadosamente la etiqueta, sin generar salpicaduras, o almacenar las muestras a -20°C para hacer después la electroforesis

15. Transferir cada reacción de PCR ($10\ \mu\text{l}$) al gel de agarosa.

16. Realizar electroforesis a 140-150 voltios.

17 Fotografar el gel con el transiluminador UV.

18. Interpretar los resultados de la tipificación usando la hoja de trabajo anexa del kit.

