



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN INFECTOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR
ZUBIRÁN"

"Relación entre Marcadores de Senescencia Celular, Activación Inmune y
Enfermedad Arterial Periférica con el Patrón de Recuperación Inmune en
Pacientes de la Clínica de VIH del INCMSZ"

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA:
JUAN JOSÉ ROMERO CARVAJAL

TUTOR PRINCIPAL:
DR. SANTIAGO PÉREZ PATRIGEON

ASESOR DE TESIS:
DR. CARLOS HINOJOSA BECERRIL

MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

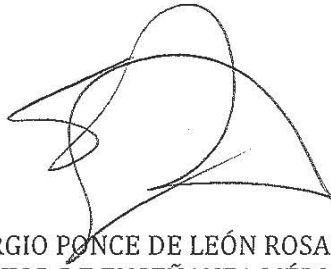


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES
DIRECTOR DE ENSEÑANZA MÉDICA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
SECCIÓN DE ENSEÑANZA
MÉXICO, D.F.



DR. GUILLERMO MIGUEL RUIZ-PALACIOS Y SANTOS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN INFECTOLOGÍA



DR. SANTIAGO PÉREZ PATRIGEON
TUTOR DE TESIS
MÉDICO ADSCRITO DEL SERVICIO DE INFECTOLOGÍA

DR. CARLOS HINOJOSA BECERRIL
ASESOR DE TESIS
MÉDICO ADSCRITO DEL SERVICIO DE CIRUGÍA VASCULAR

AGRADECIMIENTOS

Dr. Santiago Pérez Patrigeon
Departamento de Infectología
Grupo de Inmunopatogénesis Infecciosa
INCMNSZ

Dr. Carlos Hinojosa Becerril
Subdirección de Investigación Clínica
Departamento de Cirugía Vascular
INCMNSZ

Dr. Antonio Velásquez
Banco de Sangre
INCMNSZ

Dr. Miguel Rodríguez Castañón
Médico Pasante del Servicio Social
Departamento de Infectología
INCMNSZ

Dra. Ana Elsa Núñez Salgado
Médica Pasante del Servicio Social
Departamento de Cirugía Vascular
INCMNSZ

Q.A. Ayleen Cárdenas Ochoa
Laboratorio de Virología Clínica
Grupo de INmunopatogénesis Infecciosa
INCMNSZ

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
3. HIPÓTESIS.....	8
4. OBJETIVOS.....	8
5. METODOLOGÍA	
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	9
INTERVENCIÓN.....	9
CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA.....	9
CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	10
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	11
VARIABLES.....	12
ESTRATEGIA DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	12
6. RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO.....	16
7. COSTOS.....	18
8. ALGORITMO DE LA DEPURACIÓN DE LA BASE DE DATOS.....	18
CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
ANEXOS.....	23

1. INTRODUCCIÓN

Evidencia creciente ha demostrado el beneficio de iniciar TARAA más tempranamente, con recomendaciones actuales de inicio del tratamiento con número de LTCD4+ iguales o menores a 500 / uL. Está demostrada una reducción significativa de la morbi – mortalidad, principalmente concerniente a infecciones oportunistas, al mantener contajes de LTCD4+ mayores a 350 / uL.

Por otro lado, también se ha demostrado que los pacientes con VIH envejecen más rápido que la población general, y presentan enfermedades más temprano enfermedades relacionadas con la edad, pese a mantener niveles de LTCD4+ y cargas virales indetectables. En los actuales momentos, se desconoce si existe algún beneficio adicional en mantener mayores niveles de linfocitos T CD4+. En términos de prevención del envejecimiento prematuro y de comorbilidades relacionadas con la edad, ¿el mantener mayores números de LTCD4+ ayudaría a reducir los niveles de activación inmune y de senescencia celular, o niveles más altos de linfocitos no conllevan beneficio alguno? Considerando la creciente proporción de personas viviendo con VIH que logran controlar adecuadamente la infección gracias a la TARAA, y que se enfrentan con mayor frecuencia a la ocurrencia temprana de enfermedades crónicas no relacionadas con inmunodeficiencia, el presente proyecto es relevante, y aportaría evidencia que puede ayudar a entender la inmunopatogénesis de la infección por VIH, y cómo prevenir el conglomerado de problemas de salud que no se asocian con inmunodeficiencia.

El presente proyecto pretende correlacionar los marcadores inmunológicos de senescencia y activación inmune con un evento clínico estrechamente relacionado con la inflamación, como es la enfermedad arterial periférica, y analizar las diferencias entre pacientes con diferentes conteos de LTCD4+. Sería el primer estudio en analizar marcadores de activación inmune, senescencia celular y enfermedad arterial periférica en población latinoamericana viviendo con VIH.

2. MARCO TEÓRICO

La introducción de la terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA) como tratamiento para el VIH ha reducido de forma dramática la morbilidad y mortalidad asociada con el VIH (1). A pesar de los evidentes incrementos en la esperanza de vida para las personas viviendo con VIH, las tasas de mortalidad siguen siendo mayores que las de la población general (2, 3). Si bien parte de la mortalidad excesiva es explicada por enfermedades relacionadas con inmunodeficiencia, en los años recientes es evidente el incremento de las comorbilidades no infecciosas como causa de mortalidad temprana. Las comorbilidades más estudiadas incluyen enfermedad cardiovascular, hipertensión, osteoporosis, insuficiencia renal y trastornos del metabolismo de los carbohidratos (4).

Durante el envejecimiento, una reducción en el número de células T sin exposición antigénica ocurre a la par con un aumento en los linfocitos T con diferenciación terminal (5). Este proceso finalmente determina una capacidad disminuida del sistema inmune para responder adecuadamente a nuevos estímulos antigénicos, y se define como inmunosenescencia. Las alteraciones inflamatorias son fundamentales, al desencadenar activación inmune persistente, y por lo tanto provocar la diferenciación de los linfocitos T no expuestos.

Varias alteraciones inmunológicas descritas en la infección por HIV son similares a las asociadas con el envejecimiento normal. La infección por VIH estimula constantemente al sistema inmune, por sí sola o por coinfecciones, a pesar del

control de la replicación viral con la TARAA (6). Adicionalmente, la depleción de linfocitos TCD4+ asociada con la infección por VIH ocurre de manera preferencial en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal. La disrupción de la barrera intestinal permite traslocación microbiana, y, por lo tanto, exposición de productos bacterianos al sistema inmune, contribuyendo a su activación, y, por lo tanto, a su envejecimiento (7, 8).

Entre los marcadores de senescencia inmune más estudiados se encuentran el marcador de membrana CD57 (9) y la pérdida del marcador CD28 (10, 11). Los linfocitos CD57+ se encuentran diferenciados hacia funciones efectoras y/o citotóxicas. CD28 es un marcador de membrana asociado con la proliferación celular, y su pérdida se asocia con inmunosenescencia. Altas proporciones de linfocitos T CD8+CD28- están asociadas con progresión más rápida a SIDA y con menor respuesta a la vacunación. Entre los marcadores que se asocian con activación inmune se encuentran CD38+ y HLADR+. Dichos marcadores se asocian con progresión más rápida a SIDA, en algunos estudios inclusive más fuertemente que los conteos de CD4 y carga viral (1, 12).

Existe evidencia creciente de que las vías de inflamación crónica, activación inmune e inmunosenescencia juegan un papel fundamental en la asociación de la infección por VIH con la enfermedad cardiovascular. La inflamación crónica es un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular universalmente aceptado en los pacientes sin VIH. Los marcadores de senescencia y activación inmune descritos previamente se encuentran asociados con la presencia de lesiones carotídeas subclínicas en los pacientes con VIH (13, 14).

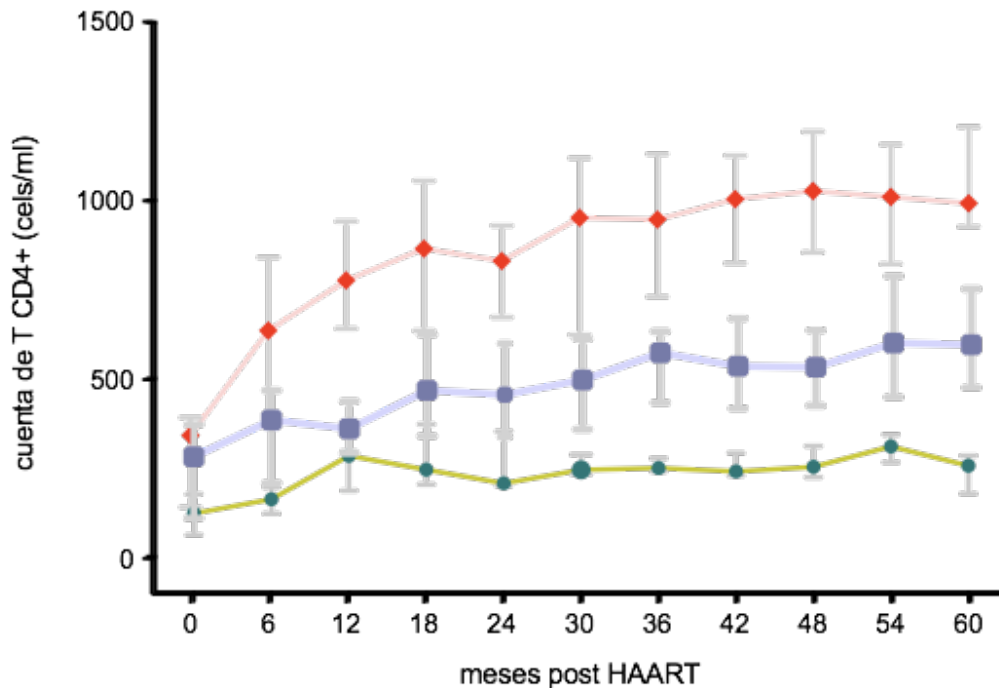
Posterior al inicio de TARAA, se produce una detención súbita de la producción viral. Este fenómeno desencadena un incremento inicial rápido y considerable de los LTCD4+ durante los primeros 3 meses, que corresponde a una redistribución de los LTCD4+ de memoria, junto con una reducción en los marcadores de inflamación, activación celular y muerte celular inducida por activación. Al evento inicial le sigue una disminución en la velocidad de recuperación, que corresponde a la generación de LTCD4+ vírgenes. La recuperación más lenta demuestra una normalización de los compartimentos de LTCD4+ vírgenes y de memoria, junto con una normalización de los parámetros de activación celular (15). En la mayoría de casos, el conteo de LTCD4+ alcanza una meseta, que rara vez sobrepasa las 800 células / uL (16, 17).

En diversas cohortes se han analizado los niveles de LTCD4+ que alcanzan los pacientes con VIH posterior a 48 meses de supresión virológica efectiva con TARAA, demostrando una gran variabilidad, relacionada principalmente con la cuenta de CD4+ más baja previa al tratamiento (18, 19, 20). Ciertos pacientes (en promedio 16%) no alcanzan niveles adecuados de LTCD4+ pese a lograr una supresión virológica duradera (17). Entre los factores relacionados con esta recuperación inmune deficiente se encuentran defectos en la maduración y diferenciación, mayores niveles de activación inmune (que condicionan apoptosis) y defectos en la función efectora de los LTCD8+ (21, 22, 23)

En el otro extremo del espectro de recuperación inmune, se encuentran pacientes que logran alcanzar cifras de LTCD4+ mayores a 1000 células / uL

(pacientes hiper – respondedores). Éste evento excepcional ha sido poco estudiado, siendo inexistentes hasta el momento estudios que intenten analizar los mecanismos de la respuesta inmune. No existen tampoco estudios que hayan intentado definir si existe algún beneficio en lograr cifras de LTCD4+ muy elevadas.

En un análisis previo, se identificaron a los pacientes de la Clínica de VIH con al menos una consulta de seguimiento entre el primero de octubre del 2009 y el 31 de diciembre del 2010. Se identificaron 19 pacientes que lograron cifras de LTCD4+ mayores a 1000 células / uL a los 48 meses de seguimiento ó antes. Comparativamente, se identificaron 494 pacientes en el mismo periodo de tiempo, de los cuales 144 no alcanzaron cifras mayores a 350 LTCD4+ los 48 meses de seguimiento (respuesta discordante), y 350 pacientes con comportamiento habitual (concordantes), que lograron contajes de LTCD4+ entre 350 y 1000 células por uL (figura 1). Se refuerza el concepto de que la hiper – recuperación inmune es un evento raro y poco estudiado.



(Imagen reproducida con permiso de Jonathan Cázares Lara y Santiago Pérez Patrigeon. Departamento de Infectología, Inmunopatogénesis Infecciosa, INCMNSZ)

Menores conteos de LTCD4 se asocian con mayor expresión del marcador CD57, y, por lo tanto, con inmunosenescencia, y con mayores niveles de HLADR+ (activación inmune). Es claro que menores números de LTCD4+ se asocian con mayor inflamación e inmunosenescencia (25), y por lo tanto, con una mayor incidencia de comorbilidades relacionadas con la edad, todo esto pese a lograr cargas virales indetectables con TARA. Por otro lado, se desconoce si la presencia de una recuperación inmune excepcional posterior al inicio terapia antirretroviral se asocia con menores niveles de activación inmune y/o de senescencia celular, y, por lo tanto, con menor ocurrencia de comorbilidades relacionadas con la edad. En otras palabras, se sabe que los pacientes con VIH

que recuperan adecuadamente sus números de LTCD4+ posterior al inicio de TARA son inmunológica y clínicamente más viejos que la población general, pero no se sabe si los pacientes que recuperan de forma excepcional sus niveles de LTCD4+ presentan menores niveles de senescencia e inflamación, que puedan compararse con los de la población no infectada.

3. HIPÓTESIS

Los pacientes hiper-recuperadores presentan una menor expresión de marcadores de inmunosenescencia y activación inmune, así como de enfermedad periférica, en comparación con pacientes concordantes, discordantes, con infección VIH sin TARA y sin infección de VIH.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar el inmunofenotipo de senescencia y activación inmune, de los pacientes hiper-recuperadores, concordantes, discordantes, con infección de VIH sin TARA y sin infección de VIH. Identificar la presencia de patrones asociados al desarrollo de enfermedad arterial periférica.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Evaluar la asociación entre la enfermedad arterial periférica y la presencia de marcadores de activación inmune y de senescencia celular
2. Describir las características demográficas de los pacientes hiper-recuperadores con relación al resto de pacientes de la Clínica de VIH

3. Describir las características de la terapia antirretroviral de alta actividad en los grupos de estudio
4. Actualizar la base de datos de la clínica de VIH del INNSZ, con el fin de captar pacientes con respuestas inmunológicas particulares que puedan ser estudiadas en el futuro

5. METODOLOGÍA

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio transversal analítico

INTERVENCIÓN

En muestras de sangre fresca total extraídas a los pacientes (volumen: 36 mL) se agregaron los anticuerpos fluorescentes contra los receptores celulares a estudiar (CD57 / CD28 y CD38/HLADR). Posteriormente se realizó la lisis de los eritrocitos y fijación mediante una solución de fijación – lisis. Las células teñidas se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se analizaron mediante el software de análisis citométrico Flowjo (<http://www.flowjo.com>)

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Se realizó un proceso de depuración de la base de datos de pacientes activos en el Instituto, con al menos una consulta en el período Enero/2013 a Enero/2014, logrando identificar 1567 pacientes. Se identificaron 29 pacientes hiper – recuperadores, de acuerdo a la definición especificada en los criterios de selección, representando el 6% de pacientes que reciben TARAA.

Dada la baja frecuencia del mencionado patrón de recuperación inmune, no existen datos en la literatura sobre la frecuencia de enfermedad arterial periférica en este grupo específico de pacientes . En estudios previos (14), se determinó un promedio de grosor miointimal carotideo de 0,434 mm + 0,025 mm en pacientes con VIH, versus 0,424 mm + 0,018 mm en pacientes no infectados. Considerando un poder del 80% y un porcentaje de error del 5%, se calculó un tamaño de muestra de 58 pacientes.

Hasta el momento, se tienen pareados los pacientes hiper – recuperadores (29 pacientes), de acuerdo a los criterios descritos abajo, con 59 pacientes concordantes y 59 pacientes discordantes, con un total de 157 pacientes.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

La base de datos está constituida por todos los pacientes de la Clínica de VIH del INCMNSZ con al menos una consulta de seguimiento durante el periodo comprendido entre 01/Octubre/2009 y 15/Marzo/2014 (1567 pacientes en total). De la mencionada base se seleccionarán los siguientes grupos de estudio para su análisis:

- Pacientes hiper – recuperadores: Aquellos pacientes que hayan logrado conteos de LTCD4+ iguales o mayores a 1000 células / uL a los 48 meses o menos posteriores al inicio de TARAA
- Pacientes concordantes: Aquellos pacientes que hayan logrado conteos de LTCD4+ entre 350 y 999 células / uL a los 48 meses o menos posteriores al inicio de TARAA

- Pacientes discordantes: Aquellos pacientes que hayan logrado conteos de LTCD4+ menores a 350 células / uL a los 48 meses posteriores al inicio de TARAA
- Pacientes sin tratamiento antirretroviral: Pacientes que no hayan iniciado TARAA
- Controles sanos: Pacientes sin infección por VIH y sin los criterios e exclusión descritos abajo

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Presencia de enfermedades oportunistas activas al momento del estudio
- Presencia de infecciones activas de cualquier etiología al momento del estudio
- Comorbilidades inflamatorias crónicas en tratamiento al momento del estudio, refiriéndose específicamente a lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoidea, espondiloartropatías seronegativas, vasculitis, artrosis, esclerosis sistémica y síndrome de Sjögren, definidos de acuerdo a los Criterios de Clasificación para las Enfermedades Reumáticas del Colegio Americano de Reumatología (http://www.rheumatology.org/Practice/Clinical/Classification/Classification_Criteria_for_Rheumatic_Diseases/)
- Pacientes con uso crónico de corticosteroides
- Pacientes que hayan requerido cambio de esquema antirretroviral por falla virológica
- Con excepción del grupo de pacientes sin historia de TARAA, evidencia de cargas virales detectables durante el periodo seleccionado para el estudio

VARIABLES

VARIABLES PRINCIPALES

- Proporción de linfocitos T CD4+ y CD8+ con marcadores de senescencia celular (CD57+CD28-) en los tres grupos de estudio.
- Proporción de linfocitos T CD4+ y CD8+ con marcadores de activación inmune (CD38+ HLADR+) en los tres grupos de estudio.
- Proporción de pacientes con enfermedad arterial periférica en los tres grupos de estudio. Las variables que ayudarán a evaluar la presencia de enfermedad arterial son:
 - Grosor miointimal carotídeo medido en mm
 - Índice tobillo – brazo (ITB)
 - Índice cardio – tobillo vascular (CAVI, por sus siglas en inglés), como marcador de rigidez arterial
 - Pletismografía

VARIABLES SECUNDARIAS

- Variables demográficas en los tres grupos de estudio
- Proporción de pacientes con factores de riesgo para enfermedad arterial periférica en los tres grupos de estudio
- Tipo y tiempo de terapia antirretroviral en los tres grupos de estudio

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Citometría de flujo: Anticuerpos fluorescentes dirigidos específicamente contra los receptores celulares a estudiar, lisis de los eritrocitos y fijación mediante solución de fijación/lisis. Análisis de células teñidas mediante citometría de flujo

mediante software especializado Flowjo. Citómetro de flujo del Laboratorio de Infectología del INCMNSZ.

Exploración física vascular y determinación del ITB

Se llevó a cabo una exploración física vascular que incluye palpación de pulsos en extremidades inferiores y superiores (braquial, radial, cubital, femoral, poplíteo, tibial posterior y pedio), y determinación de índices tobillo/brazo para las arterias pedia y tibial posterior de forma bilateral con un método estandarizado. Para la toma de determinación del ITB se dispuso de un ultrasonido Doppler de 8 mHz, gel transductor y un manguito para la toma manual de la presión arterial, 20% más largo que el diámetro mayor de la circunferencia del brazo. La determinación de la presión arterial se realizó a nivel de la arteria braquial en ambos brazos y en ambos pies a nivel de la arteria tibial posterior y de la arteria pedia dorsal, comenzando en sentido de las manecillas del reloj, primero el brazo derecho, continuando con el brazo izquierdo, el pie izquierdo y por último el pie derecho. Dicho método consiste colocar al paciente en decúbito supino durante al menos cinco minutos, en una posición cómoda y descansada, se colocará el manguito del baumanómetro en el brazo derecho del paciente, se palpa el pulso braquial, se aplica gel transductor en el sitio en donde se sienta el pulso, y se colocará el transductor del doppler en un ángulo de 60 grados hacia la cabeza del paciente, se infla el manguito rápidamente, 20 o 30 mm por arriba del nivel donde se dejó de percibir la señal doppler, después lentamente se desinfla el manguito para anotar el valor sistólico, se limpia el gel transductor de la piel del paciente y se repite el procedimiento en el brazo izquierdo. Después de medir la presión sistólica de los brazos se colocará el manguito por encima del tobillo

izquierdo, la localización anatómica de la arteria dorsal debe ser lateral al tendón extensor largo del pie, se colocará transductor doppler en el sitio de palpación del pulso dorsal pedio, se infla el manguito 20 o 30 mm arriba de donde se dejó de percibir la señal doppler, después se desinfla lentamente y anota la presión sistólica, se repetirá el procedimiento para la arteria tibial posterior, y para la pierna contralateral para obtener ambas presiones sistólicas de la dorsal pedia y las tibiales posteriores. Para calcular el ITB se hará la división entre la presión sistólica más alta de ambas extremidades inferiores, entre la presión sistólica braquial más alta, la interpretación del ITB en reposo normal va del 0.91 al 1.30, si el resultado es superior sugiere arterias no compresibles, una disminución del $ITB < 0.90$ es indicativo de enfermedad arterial periférica.

Determinación del grosor miointimal carotídeo:

La medición del grosor de íntima carotídea se realizó en ambas carótidas comunes con el paciente decúbito supino con una ligera hiperextensión del cuello. Se utilizó un equipo de ultrasonido de alta resolución, con transductor lineal con frecuencias > 7 MHz, foco de profundidad a 40 mm. Primero se midió el lado derecho y luego el izquierdo de ambas carótidas comunes en la pared más distal al transductor, por lo menos 5mm por debajo del bulbo carotídeo. En cada estudio se evaluó el grosor de íntima media (GIM) placas de ateroma. El GIM, definido como la distancia existente entre la interfaz luz carotídea-intima y la interfaz media-adventicia de la pared distal, se calcula como la media del GIM carotídeo derecho e izquierdo.

Métodos de análisis estadístico:

Existen confusores que influyen sobre la enfermedad arterial periférica y sobre la presencia de marcadores de senescencia celular y activación inmune, que son los siguientes:

- Edad
- Género
- Etnia
- Hipertensión
- Síndrome metabólico (para efectos del estudio se incluirá dentro de la definición la presencia de diabetes mellitus tipo 2)
- Nadir de CD4
- Presencia de enfermedades inflamatorias crónicas y uso crónico de corticosteroides
- Presencia de infecciones activas

Se realizaron las siguientes estrategias de control de los posibles confusores:

- Se excluirán aquellos pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas (definidas en los criterios de exclusión) y/o uso crónico de corticosteroides. Se excluirán además aquellos pacientes con infecciones activas.

- Tomando como punto de partida la característica de hiper – recuperación inmune, que es la más rara dentro del grupo de pacientes activos, se realizará un pareado 2 a 1 por edad, género, etnia, nadir de CD4, hipertensión y presencia de síndrome metabólico de la siguiente manera:

- Pacientes hiper – recuperadores y pacientes concordantes

- Pacientes hiper – recuperadores y pacientes discordantes
- Pacientes hiper – recuperadores y pacientes sin tratamiento antirretroviral previo
- Pacientes hiper – recuperadores y controles sanos

Hasta el momento se tienen pareados los pacientes hiper – recuperadores (29 pacientes), de acuerdo a los criterios descritos, con 59 pacientes concordantes y 59 pacientes discordantes, con un total de 157 pacientes.

Se realizarán pruebas no paramétricas para comparación de variables continuas en los grupos de estudio (prueba de Kruskal – Wallis y U de Mann – Whitney), mediante el programa de análisis estadístico SPSS 22.0

6. RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO

- a) Molestias generadas por el estudio: Toma de una sola muestra de sangre venos periférica mediante venopunción periférica, cantidad aproximada 5 – 10 mL
- b) Riesgos potenciales: Dolor. Posibilidad de sangrado ligero o equimosis en el sitio de la punción. Reacción vasovagal que puede llegar al síncope.
- c) Métodos de detección de los riesgos anticipados: La punción venosa periférica se realizó por parte de los investigadores, quienes cuentan con entrenamiento para este tipo de procedimientos. La realización del ultrasonido carotídeo no representa ningún riesgo específico para la salud de los pacientes, y será realizado por Médicos del Servicio de Cirugía Vascular, quienes cuentan con entrenamiento para ese tipo de procedimientos.

- d) Medidas de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: La toma de muestra se realizó por parte de los investigadores en la Clínica de VIH del INCMNSZ, en la Unidad del Paciente Ambulatorio. Se dispuso de equipo estéril y descartable, de uso individual por paciente. En la Clínica de VIH se dispone de coche de paro equipado e insumos para el manejo inmediato de los de los posibles riesgos
- e) Procedimiento a seguir para resolución de los riesgos:
- Sangrado: Maniobras de hemostasia y vigilancia
 - Equimosis: vigilancia, de ser necesario, seguimiento clínico
 - Síncope/presíncope: Monitoreo no invasivo, maniobras de protección de la vía aérea. De ser necesaria, transferencia inmediata al Servicio de Urgencias.
- f) Beneficios directos esperados:
- Aporte a la comprensión de los mecanismos inmunopatogénicos del envejecimiento prematuro en los pacientes que viven con VIH, y su asociación con la presencia de enfermedad arterial periférica.
 - Actualización de la base de datos de la Clínica de VIH del INCMNSZ, con el fin de detectar pacientes con patrones excepcionales de recuperación inmune
- g) Beneficios indirectos esperados
- Detección de pacientes con enfermedad arterial periférica subclínica que ameriten inicio de tratamiento. Las anomalías detectadas en el ultrasonido Doppler carotídeo serán comunicadas a los Médicos Tratantes de los pacientes del estudio, con el fin de iniciar tratamiento específico si es que lo amerita.
- h) Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto

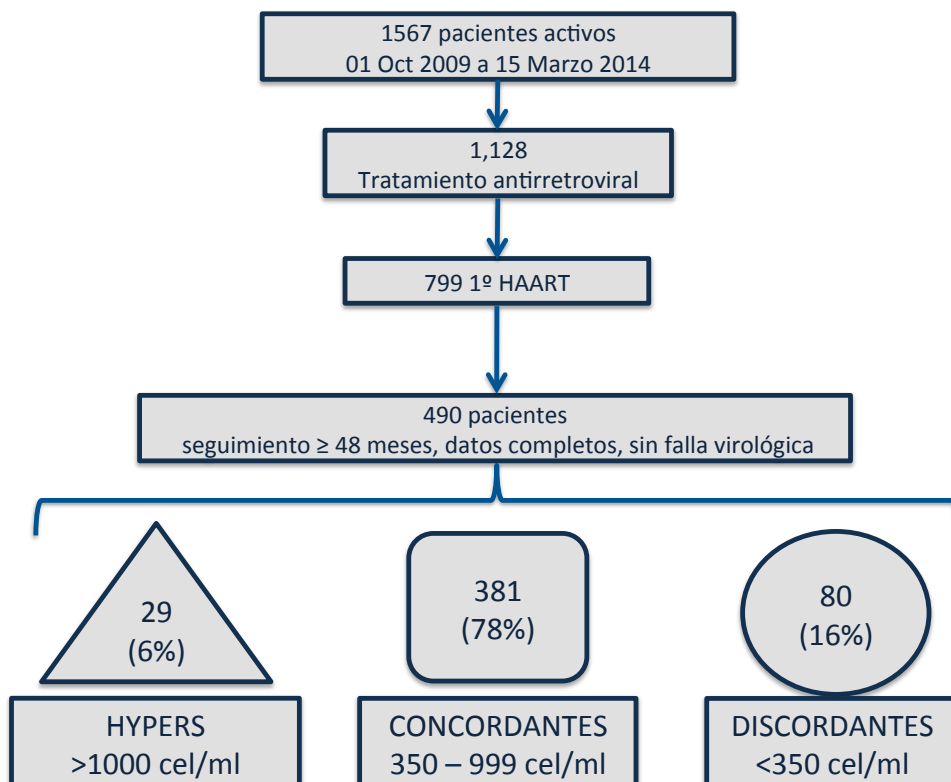
- La venopunción periférica representa un riesgo mínimo para los pacientes.

La información que aportará el estudio sobrepasa el potencial riesgo existente. La participación de los pacientes es de carácter voluntario, pudiendo retirarse libremente en cualquier etapa del proyecto.

7. COSTOS

- El estudio está patrocinado por CONACyT y no se generarán gastos adicionales para el paciente más que los de su cuidado estándar.
- Los estudios de Ecografía Doppler carotídea fueron cubiertos por el Departamento de Angiología y Cirugía Vascular.
- No está planificado que los pacientes que participan en el estudio reciban compensación o incentivos de ningún tipo.

8. ALGORITMO DE LA DEPURACIÓN DE LA BASE DE DATOS



CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Desai S., Landay A. Early Immune Senescence in HIV Disease. *Curr HIV/AIDS Rep* (2010) 7:4–10
2. Deeks SG. Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy. *Top HIV Med* 2009; 17:118–23.
3. Justice AC. HIV and aging: time for a new paradigm. *Curr HIV/AIDS Rep* 2010; 7:69–76.
4. Powderly WG. Non-AIDS-defining illnesses in the mature patient. The graying of an epidemic—Clinical considerations of HIV and aging. Vol 3, 2010.
5. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 2010; 16:238–46.
6. Capeau J. Premature Aging and Premature Age-Related Comorbidities in HIV-Infected Patients: Facts and Hypotheses. *Clin Infect Dis*. 2011 Dec;53(11):1127-9
7. Poles M, Boscardin W, Elliott J, et al. Lack of decay of HIV-1 in gut-associated lymphoid tissue reservoirs in maximally suppressed individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 43:65–8.
8. Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol* 2006;18:399–405.
9. Brenchley J y cols. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8 + T cells. *Blood*. 2003 101: 2711-2720

10. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA: CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996, 14:233–258.
11. Spaulding C, Guo W, Effros RB: Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol* 1999, 34:633–644
12. Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, et al.: Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002, 29:346–355.
13. Kaplan R y cols. T Cell Activation and Senescence Predict Subclinical Carotid Artery Disease in HIV-Infected Women. *JID* 2011:203
14. Sainz T y cols. Subclinical Atherosclerosis and Markers of Immune Activation in HIV-Infected Children and Adolescents: The CaroVIH Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014;65:42–49
15. *Trends in Immunology* March 2011, Vol. 32, No. 3
16. Hunt PW, Deeks SG, Rodriguez B, Valdez H, Shade SB, Abrams DI, Kitahata MM, Krone M, Neilands TB, Brand RJ, Lederman MM, Martin JN. Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. *AIDS*. 2003 Sep 5;17(13):1907-15.
17. Althoff KN, Justice AC, Gange SJ, Deeks SG, Saag MS, Silverberg MJ, Gill MJ, Lau B, Napravnik S, Tedaldi E, Klein MB, Gebo KA; North American AIDS Cohorts Collaboration on Research, Design (NA-ACCORD). Virologic and immunologic response to HAART, by age and regimen class. *AIDS*. 2010 Oct 23;24(16):2469-79

18. Kaufmann GR, Perrin L, Pantaleo G, Opravil M, Furrer H, Telenti A, Hirschel B, Ledergerber B, Vernazza P, Bernasconi E, Rickenbach M, Egger M, Battegay M; Swiss HIV Cohort Study Group. CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med.* 2003 Oct 13;163(18):2187-95.
19. Khanna N, Opravil M, Furrer H, Cavassini M, Vernazza P, Bernasconi E, Weber R, Hirschel B, Battegay M, Kaufmann GR; Swiss HIV Cohort Study. CD4+ T cell count recovery in HIV type 1-infected patients is independent of class of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2008 Oct 15;47(8):1093-101.
20. Viard JP, Burgard M, Hubert JB, Aaron L, Rabian C, Pertuiset N, Lourenço M, Rothschild C, Rouzioux C. Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *AIDS.* 2004 Jan 2;18(1):45-9
21. Benveniste O, Flahault A, Rollot F, Elbim C, Estaquier J, Pédrón B, Duval X, Dereuddre-Bosquet N, Clayette P, Sterkers G, Simon A, Ameisen JC, Leport C. Mechanisms involved in the low-level regeneration of CD4+ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy who have prolonged undetectable plasma viral loads. *J Infect Dis.* 2005 May 15;191(10):1670-9.
22. Marchetti G, Gazzola L, Trabattoni D, Bai F, Ancona G, Ferraris L, Meroni L, Galli M, Clerici M, Gori A, D'Arminio Monforte A. Skewed T-cell maturation and function in HIV-infected patients failing CD4+ recovery upon long-term virologically suppressive HAART. *AIDS.* 2010 Jun 19;24(10):1455-60

23. Negredo E, Massanella M, Puig J, Pérez-Alvarez N, Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, Villarroya F, Moltó J, Santos JR, Clotet B, Blanco J. Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications. *Clin Infect Dis*. 2010 May 1;50(9):1300-8
24. Sin publicar. Factores inmunofenotípicos y funcionales de los linfocitos T CD4+ determinantes de la hiperrespuesta inmune al tratamiento antirretroviral en los pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Jonnathan Cázares Lara. Santiago Pérez Patrigeon. Departamento de Infectología, Inmunopatogénesis Infecciosa. INCMNSZ, 2013
25. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003; 187:1534-43.

ANEXO 1: HOJA EXPERIMENTAL PARA EXPERIMENTOS DE INMUNOFENOTIPO

Pa so	Estimulaciones (pSTAT5 Treguladoras)	Inmunofenotipo		Ficoll	
		(Senescencia Activación IL2R)	Treguladoras		
1.		Flebotomía			
2.		PREPARAR MASTER MIX + REACTIVOS Calentar L/F en estufa a 37°C Enfriar el MeOH 90%		Tubos Plasma DMSO SFB Frío Ficoll	
3.	Descongelar Interleucinas	Ab EN TUBOS		Centrifugar 10min 1500rpm	
4.	200uL SANGRE EN EPPENDORFFS				
5.	Estimular con Interleucina e Incubar 37°C por 5min De acuerdo a hoja	Incubar 4°C por 30min De acuerdo a hoja experimental		Obtener Plasma Sangre en Falcon	
6.	ENTRAN CONTROLES 1mL LYSE/FIX por 10min 37°C			Plasma , centrifugar a 3000rpm y alicutar	
7.	Quick/spin y Aspirado			Preparar Ficoll 3 a 1	
8.	1mL LYSE/FIX			Reconstituir con PBS	
9.	Quick/spin y Aspirado			Sangre en Ficoll	
10.	200uL PFA 1.5% 10min 37°C		SALE CO ENTRA CPe 1mL PERM Incubar en hielo 20min	Centrifugar 1500rpm 30min sin freno	
11.	Quick/spin y Aspirado			Recuperar anillo en falcon 50mL	
12.	1mL PBS			Lavado con PBS 50mL	
13.	Quick/spin y Aspirado			Centrifugar 1500rpm 10min	
14.	SALE CONTRL CO entra CMe 1ml MeOH 90% por goteo con vortex 20 min 4°C en hielo			1mL PERM	Decantar
15.	Quick/spin y Aspirado			Quick/spin y Aspirado	Lavado con PBS 50mL
16.	1mL PBS			1mL PERM	Centrifugar 1500rpm 10min
17.	Quick/spin y Aspirado			Quick/spin y Aspirado	Decantar
18.	1mL PBS				Resuspender en 30mL PBS
19.	Quick/spin y Aspirado				Separar 50uL Contabilizar Resuspender en DMSO (5 a 10 x10⁶) Alicuotar 1mL en crioviales
20.	SALEN CONTROLES Ab Intra y extracelulares 30min 4°C 50uL MM + 5uLpSTAT5			SALEN CONTROLES Tinción Intracelular Incubación 4°C 30min	
21.	1mL PBS			1mL PERM	
22.	Quick/spin y Aspirado			Quick/spin y Aspirado	Mr. Frosty
23.	1mL PBS			1mL PERM	Congelar -75º
24.	Quick/spin y Aspirado			Quick/spin y Aspirado	
25.	ENTRA CONTROLES 200µL PFA 1.5%				
26.	Transferir a FACS				
27.	Guardar 4°C				
28.	Análisis FACS				