

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS Y EN HUMOR ACUOSO EN PACIENTES  
CON VIH/SIDA E INFECCIONES OPORTUNISTAS OCULARES ASOCIADAS

T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:  
MATILDE RUIZ CRUZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. GUSTAVO REYES TERÁN  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO  
VILLEGAS"  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS  
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS  
MC CHRISTOPHER ORMSBY

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE 2014



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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los pacientes que aceptaron participar en la realización de este proyecto de investigación, ya que su contribución es sumamente valiosa para la generación de nuevos conocimientos sobre la infección con VIH.

Agradezco a la Comisión de Equidad y Género de las Legislaturas LX-LXI, y a la Comisión de Igualdad de Género de la Legislatura LXII de la H. Cámara de Diputados de la República Mexicana y a CONACyT por su apoyo económico (becario 240184).

Agradezco a todas las personas que laboran o participan de alguna manera en el CIENI.

Agradezco a Santi, Keo y Gustavo, por su infinita paciencia.

## ÍNDICE

<b>0. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1 Infecciones oculares y VIH	5
1.2 Inmunología ocular	7
1.3 Citocinas y patologías oculares	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>14</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>14</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>14</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
8.1 Citocinas en plasma versus humor acuoso	27
8.2 Diferencias entre niveles de citocinas en plasma y HA en controles versus pacientes con VIH	28
8.3 Diferencias entre niveles de citocinas en plasma y HA en pacientes con retinitis por CMV y sífilis ocular antes del tratamiento específico versus controles y entre sí.	33
8.4 Cambios en los perfiles de citocinas antes y después de los tratamientos específicos para las infecciones oculares	37
8.5 Análisis de componentes principales	41
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>59</b>

## Resumen

**Antecedentes:** Las infecciones oculares oportunistas (IOO) no son poco comunes en la infección por VIH. Medimos varios perfiles de citocinas y quimiocinas en HA y plasma de individuos VIH + con IOO, antes y después del tratamiento específico.

**Métodos:** pacientes VIH + con la siguientes IOO: 23 con retinitis por citomegalovirus (rCMV), 16 con sífilis ocular (SO) y 7 con otras IOO. Como medidas de control se analizó el plasma de 15 donantes sanos y HA de 16 pacientes sometidos a cirugía de catarata. Se midieron las concentraciones de 27 citocinas en HA y plasma antes y después del tratamiento de la IOO mediante un ensayo multiplex (Luminex). Las concentraciones de citocinas en HA y plasma fueron comparadas entre las IOO y entre los individuos VIH+ versus controles, utilizando pruebas de Wilcoxon corregida para comparaciones múltiples.

**Resultados:** se observaron perfiles de citocinas característicos en el HA de rCMV y SO, con mayores niveles de GM-CSF, IL-1 $\alpha$  e IP-10 en rCMV ( $p < 0.03$ ).

Post-tratamiento de rCMV, se observó una reducción significativa en la concentración de citocinas proinflamatorias en el HA ( IFN-2 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF e IFN- $\gamma$ ,  $p < 0.003$ ), quimiocinas (eotaxina, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , e IP-10;  $p < 0.0005$ ) y factores de crecimiento (G-CSF y GM-CSF;  $p < 0.0001$ ).

Se observó una reducción significativa de IL-10 plasmático ( $p < 0.002$ ). Post-tratamiento de SO, se observó una reducción significativa en las concentraciones de citocinas proinflamatorias en el HA (IL-1 $\alpha$  e IL-6;  $p < 0,014$ ), quimiocinas (eotaxina, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ;  $p < 0.005$ ) y factores de crecimiento (G-CSF y GM-CSF;  $p < 0.001$ ). También se encontró una reducción significativa plasmática de IFN-2 $\alpha$  ( $p < 0.014$ ).

**Conclusiones:** Se encontró que las reducciones en los niveles de varias citocinas y quimiocinas en pacientes con rCMV y SO post-tratamiento específico se asocian con una mejoría clínica, controlando un respuesta proinflamatorio Th1.

## Introducción

Globalmente, un estimado de 35.3 (32.2-38.8) millones de personas vivían con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en el 2012 [1]. Este virus, infecta a varios tipos de células del sistema inmune, principalmente a los linfocitos T CD4+, provocando una profunda inmunosupresión con infecciones oportunistas asociadas. El curso de la infección del VIH puede seguirse a través de la medición de la cantidad de RNA viral presente en el plasma (carga viral plasmática, CVp) y la cuenta de linfocitos T CD4+. La infección por VIH inicia con una fase aguda, período de viremia caracterizado por síntomas inespecíficos. Una vez que aparecen las respuestas inmunes adaptativas y se controla parcialmente la replicación viral, llegando a un punto de equilibrio en la CVp, se inicia la etapa crónica, caracterizada por un descenso gradual de la cuenta de linfocitos T CD4+. Esta fase puede durar varios años, durante los cuales, el paciente permanece asintomático. Finalmente, cuando la caída en la cuenta de linfocitos T CD4+ llega a 200 células/ $\mu$ l, se inicia la etapa del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la cual se caracteriza por la aparición de infecciones oportunistas definitorias de SIDA tales como neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, tuberculosis, encefalitis, meningitis, sarcoma de Kaposi e infecciones oculares severas [2].

### *Infecciones oculares y VIH*

A nivel ocular, existen diversas infecciones oportunistas asociadas a SIDA tales como retinitis por citomegalovirus (r-CMV), retinopatía por VIH, sífilis ocular, tuberculosis (TB), toxoplasmosis, criptococosis, herpes zoster oftálmico (HZO), entre otras [3].

La retinitis por CMV (r-CMV) es la infección ocular oportunista más común, diagnosticándose principalmente por la exploración de fondo de ojo bajo midriasis farmacológica [4]. Se presenta en un 22-37% de los pacientes con SIDA antes de iniciar tratamiento antirretroviral (TAR) y habitualmente está asociada a una cuenta de linfocitos T CD4+ <50 células/ $\mu$ l caracterizándose por presentar zonas blanquecinas en retina (retinitis), con microhemorragias y vasculitis, sin vitritis importante. El tratamiento de elección es con valganciclovir vía oral [5].

La sífilis ocular se puede desarrollar en aquellos pacientes con VIH/SIDA cuyas cuentas de CD4+ son mayores a 200 células/ $\mu$ l y por tanto, puede ser la manifestación inicial de SIDA [5]. Se caracteriza por presentar iritis, vitritis, neuritis retrobulbar, perineuritis, papilitis, neuroretinitis, vasculitis de retina, retinitis necrotizante y desprendimiento de retina seroso. Se asocia a afección de Sistema Nervioso Central (SNC) en un 85-100% de los pacientes con SIDA, a diferencia de un 35-40% en las personas VIH negativas. Se recomienda como tratamiento, emplear de 12-24 millones de unidades intravenosas de penicilina G sódica cristalina durante 10-14 días [6].

La principal manifestación de la TB ocular (<2%) es la presencia de granulomas coroides (masas elevadas subretinianas blanco-amarillentas de tamaño variable, sin vasculitis, sin retinitis y sin inflamación en vítreo ni en cámara anterior); también existen reportes de vasculitis, coroiditis, vitritis, etc., aunque en realidad, la TB puede dar cualquier manifestación. En pacientes con SIDA, habitualmente se asocia a una radiografía de tórax normal y el tratamiento es con isoniazida, etambutol, rifampicina y pirazinamida [3] , [7] .

La presencia de Herpes Zoster Oftálmico se caracteriza por la presencia de lesiones vesiculares en piel, distribuidas en la mitad de la cara, con involucro de una o más ramas del nervio trigémino (principalmente rama oftálmica) y es tratado con valaciclovir vía oral; la presencia de criptococosis diseminada se realiza con cultivos positivos y la presencia a nivel oftálmico de focos de coroiditis, papiledema o endoftalmítis; habitualmente es tratada con anfotericina B IV y a nivel ocular se puede emplear voriconazol en cámara anterior.

### *Inmunología ocular*

El globo ocular es un órgano considerado inmunológicamente privilegiado por diversas estrategias que emplea para modificar la respuesta inmune innata y adaptativa: ignorancia inmunológica, tolerancia periférica a los antígenos derivados del globo ocular y el desarrollo de un microambiente inmunosupresor ocular [8].

Un ejemplo de *ignorancia inmunológica* lo encontramos en el tejido corneal, el cual carece de expresión de Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase II en las células presentadoras de antígenos (CPAs), lo cual favorece el retraso en el rechazo de los trasplantes corneales [9].



La *tolerancia periférica* o desviación de la respuesta inmune existente en la cámara anterior del globo ocular tiene como objetivo preservar las estructuras anatómicas oculares internas ante una respuesta inflamatoria severa, que puede llevar a pérdida de la visión por la destrucción de dichas estructuras. Esta respuesta se caracteriza porque los antígenos escapan del reconocimiento y eliminación en el ojo al inducir una tolerancia sistémica. A este fenómeno, se le conoce como desviación inmune asociada a la cámara anterior (anterior chamber-associated immune deviation/ACAID) caracterizado por la preservación de la respuesta inmune con anticuerpos mientras que las respuestas celulares tales como la del tipo de hipersensibilidad retardada (DTH) y la citotóxica (CTL), son suprimidas [9], [10]

La ACAID se refiere a la migración de las CPAs a nivel ocular hacia el torrente sanguíneo que, a través de la malla trabecular, llegan al bazo donde entran en contacto con los linfocitos T “asesinos naturales” (NKT), los cuales son potentes inmunomoduladores tanto de la respuesta  $T_H1$  como  $T_H2$  [11] [12] [13].

Una vez aquí, en la zona marginal del bazo, la unión de los linfocitos NKT con las CPAs, estimula la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ , induciendo así una respuesta anti-inflamatoria. De igual manera, se inhibe la producción de IL-12, cuya función principal es favorecer la diferenciación hacia linfocitos  $T_H1$  y la síntesis de IFN- $\gamma$  para aumentar la actividad citotóxica [11]. Al mismo tiempo, se estimula la producción de quimiocinas (RANTES o CCL5), para favorecer la migración local de diversos leucocitos.

En el bazo, las células B presentan el antígeno a las células T, promoviendo de esta manera la regulación a la baja de las células T y favoreciendo la inducción de células T reguladoras (Treg); a su vez, estas células CD4+ ACAID Treg, inhiben la diferenciación hacia células T<sub>H1</sub> en los tejidos linfáticos secundarios (ganglios linfáticos) mientras que las células CD8+ ACAID Treg inhiben la función de las células T efectoras (T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>) in situ, en el globo ocular. Además, los linfocitos T CD4+ efectoras que penetran en la cámara anterior pueden ser transformados en células Treg que suprimen la inflamación intraocular y evitan el daño de las estructuras oculares internas [9],[14].

Recientemente se ha reportado además que los timocitos y las células T  $\gamma\delta$  esplénicas son necesarias para la inducción de la ACAID y se puede entender que el privilegio inmunológico del ojo depende de la cooperación de varias células de órganos diferentes al globo ocular [15]. En el timo, se generan células reguladoras CD8+ que son capaces de suprimir la hipersensibilidad retardada así como las respuestas T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub> antígeno específicas.

Sabemos que la activación de macrófagos dependiente de células T puede dañar los tejidos; a este tipo de reacción inmunológica se le conoce como reacción de hipersensibilidad retardada (delayed type hypersensitivity/DTH), la cual se caracteriza porque el daño al tejido y la inflamación es causada por células T<sub>H1</sub> y macrófagos activados [9]

Podemos concluir que las características definitorias de ACAID son la generación de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y de células B que producen anticuerpos que no fijan complemento, así como la inhibición de la respuesta de DTH[9].

Los factores *intraoculares inmunosupresores* refuerzan la protección brindada por el privilegio inmunológico, a través de los diferentes componentes inmunosupresores del humor acuoso [15] como son: TGF- $\beta$ , péptido intestinal vasocactivo (VIP), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP), hormona estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH), somatostatina, FasL, trombospondina y proteínas reguladoras del complemento [9]. Algunos componentes del complemento actúan como inmunosupresores a nivel del humor acuoso lo cual da como resultado la producción secuencial de ciertas citocinas, tales como TGF- $\beta$ 2 e IL-10, ambos esenciales en la ACAID .

Así mismo, las células de la superficie ocular y de la barrera hemato-ocular (endotelio corneal, epitelio pigmentado del iris, epitelio pigmentado del cuerpo ciliar y epitelio pigmentado de la retina), contribuyen a la respuesta inmune regional produciendo citocinas in situ, ya que se ha comprobado que las células del sistema inmune que infiltran el globo ocular, son capaces de producir citocinas en diferentes uveítis no infecciosas [14, 16].

Los efectos que producen los componentes del humor acuoso en la DTH son los siguientes: suprimen la inmunidad innata asociada con la activación de células  $T_H1$ , inhiben la activación de células  $T_H1$  y su proliferación así como la producción de  $IFN\gamma$ ,

suprimen la activación de los macrófagos por  $\gamma$ -IFN y promueven la activación de células Treg [9] .

En síntesis, el microambiente ocular suprime la DTH a través de los componentes inmunosupresores que habitualmente se encuentran en el humor acuoso [14]. Cada uno de estos factores, tiene funciones diferentes para las CPAs, células T efectoras y macrófagos con la consecuente producción de citocinas específicas. Conjuntamente cambian la manera en la que las CPAs presentan al antígeno, suprimen la producción de IFN- $\gamma$  por las células T efectoras activadas e inhiben la actividad inflamatoria de los macrófagos previniendo así la inducción de una inflamación dentro del microambiente ocular inmunoprivilegiado. Esta actividad inmunosupresora no sólo tiene un mecanismo de regulación negativa, también promueve la inducción/estimulación de células Treg, las cuales refuerzan el privilegio inmunológico al suprimir la respuesta inmune y producir factores inmunosupresores adicionales dentro del microambiente ocular. Además, estas células Treg, ayudan a mantener la tolerancia ocular a autoantígenos [15]. La inflamación ocular provoca una sobreproducción de IL-6 que a su vez, activa a los macrófagos locales para convertir la forma latente de TGF- $\beta$ 2 en su forma activa, con la finalidad de reestablecer el microambiente inmunosupresor [17].

### *Citocinas y patologías oculares*

Se han detectado citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  ) dentro de fluidos o tejidos oculares inflamados en conjunto con otras citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-10 y TGF- $\beta$ . Con base en lo anterior, se están estudiando los niveles y expresión de

diversas citocinas tanto a nivel sérico como en el humor acuoso, tratando de encontrar alguna correlación con los diferentes cuadros clínicos oftálmicos. Recientemente, el estudio de citocinas a nivel oftálmico, se ha centrado en pacientes con retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad, entre otras patologías vasculares [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25].

Se conoce poco sobre los niveles de citocinas en pacientes con infecciones intraoculares asociadas a VIH aunque ya se ha tratado de encontrar algún tipo de correlación entre las citocinas encontradas en otras patologías con uveítis y el fenotipo clínico [26], [27].

Existen diversas patologías sistémicas en las que existe una asociación en la elevación de citocinas a nivel sérico con el grado de patología ocular; un ejemplo de esto, es el estudio realizado por Hamid et al. que encontró elevación de TNF- $\alpha$  e IL-12 séricos en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa a diferencia de los pacientes sin ella [20]; en otro estudio se encontraron niveles elevados de IL-6 y de VEGF en el humor acuoso de pacientes con retinopatía diabética a diferencia de pacientes diabéticos sin retinopatía diabética [24].

A su vez, Van Kooij et al, encontraron diferentes citocinas en el humor acuoso de pacientes con uveítis infecciosas que cursaban con edema macular quístico [28].

Existen varios reportes que mencionan terapias basadas en los principios del privilegio inmunológico ocular [9]. Recientemente se ha propuesto que los antígenos introducidos en la cámara anterior del ojo inducen un proceso celular y molecular que culmina con el desarrollo de células Treg, las cuales pueden mitigar enfermedades inmunológicas en el ojo, pulmón y SNC (modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental). Se han propuesto diferentes modelos experimentales de uveítis, con su antígeno/estímulo específico y su correlación clínica, para tratar de entender la fisiopatología de la respuesta inflamatoria a nivel ocular [29]. Recientemente se sugirió que la inhibición intraocular en la producción de IL-6 en los procesos inflamatorios, puede restaurar los niveles de TGF- $\beta$  y por ende, el privilegio inmunológico [30] .

Gracias a la introducción de nuevas tecnologías que permiten analizar múltiples analitos simultáneamente en pequeñas cantidades de muestra (50-150  $\mu$ L), ha sido posible describir simultáneamente el comportamiento de múltiples componentes del humor acuoso [31] [27] [32], con la posibilidad de analizar varias citocinas en una o varias patologías oculares.

## **Justificación**

Las alteraciones en las concentraciones de citocinas en humor acuoso (HA) asociados a diversas patologías oculares en individuos con infección por VIH han sido descritas de manera incompleta. El conocimiento de patrones específicos de concentraciones de citocinas en este compartimiento ocular y de sus variaciones después del tratamiento específico efectivo de la patología, así como su correlación con las

concentraciones de citocinas en plasma, contribuirá al entendimiento de los mecanismos inmunológicos involucrados en patologías oculares específicas que eventualmente podría llevar a mejoras en el tratamiento, diagnóstico y prevención de dichas infecciones. En el presente trabajo se investigaron los patrones de expresión de 27 citocinas en humor acuoso y plasma de individuos infectados por VIH con diversas patologías oculares, antes y después del tratamiento, con resolución clínica de las mismas.

### **Pregunta de Investigación**

¿Cuál es el comportamiento de las diversas citocinas en el humor acuoso y plasma durante los padecimientos inflamatorios oculares de origen infeccioso y posterior a su mejoría clínica en una población de pacientes con VIH?

### **Objetivo General**

Describir el perfil de citocinas tanto en humor acuoso como en circulación periférica (plasma) en pacientes con VIH en el momento en el que ocurre la patología ocular y posterior a la mejoría clínica de la misma.

### **Objetivos Particulares**

- a) Medir simultáneamente la concentración de un panel de 27 citocinas de interés en muestras de humor acuoso y de plasma de individuos infectados por VIH con patologías oculares, antes y después del tratamiento de las mismas.

- b) Describir la relación entre los niveles de citocinas encontrados en el humor acuoso y la sangre periférica con la infección oportunista ocular.
- c) Comparar el comportamiento de las citocinas en el humor acuoso entre cada grupo de enfermedad ocular infecciosa específica en los pacientes con VIH.
- d) Comparar los resultados en plasma de un grupo control sin enfermedad ocular y sin infección por VIH versus el plasma del grupo con VIH e infección ocular oportunista asociada.
- e) Comparar los resultados en humor acuoso con un grupo de pacientes sin infección por VIH ni patología ocular agregada, a quienes se sometió a cirugía de catarata versus el grupo de pacientes con VIH e infección ocular oportunista asociada.

## **Hipótesis**

Dado el ambiente de inflamación crónica desregulada característico de los individuos infectados por VIH, las concentraciones de citocinas en plasma en individuos infectados por el virus serán diferentes a las observadas en individuos sin la infección.

En individuos con VIH y manifestaciones infecciosas oculares, los niveles de citocinas en humor acuoso, pre y post-tratamiento específico, serán diferentes.

Cada patología ocular presentará un patrón característico de concentraciones de citocinas en humor acuoso, asociados a la patogénesis particular de cada patógeno que será diferente al grupo control de humor acuoso.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *Diseño*

Estudio prospectivo, longitudinal, observacional y comparativo.

### *UNIVERSO DE ESTUDIO*

#### Definición de caso:

Pacientes que acuden a atenderse al Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en la Ciudad de México, con infección por VIH e infección oportunista ocular (retinitis por CMV, sífilis, tuberculosis, HZO y hongos), en el período comprendido de noviembre 2010 a mayo del 2012.

#### Definición de controles:

- Individuos sanos a nivel sistémico y oftalmológico que fueron sometidos a cirugía de catarata.
- Individuos sanos sin enfermedad sistémica ni ocular que aceptaran donar sangre para análisis de plasma.

### *Consideraciones éticas*

Este proyecto fue revisado y autorizado por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias; se llevó a cabo de conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki sobre investigación biomédica en seres humanos. Por cuestiones éticas, los individuos sanos sin indicación de cirugía de catarata, donaron exclusivamente sangre (no HA) para análisis de comparación de citocinas en plasma versus los pacientes con VIH e infección ocular activa. Todos los participantes dieron consentimiento escrito previo a la obtención de las muestras.

### *Criterios de Inclusión*

1. Pacientes con diagnóstico de infección por VIH con lesiones oculares de origen infeccioso diagnosticadas clínicamente. Se tomó una muestra basal de HA y plasma al momento del diagnóstico y antes de iniciar tratamiento específico para la infección oportunista. Posteriormente, al momento de presentar mejoría posterior al tratamiento, se tomó nuevamente muestra de humor acuoso y plasma. Para la confirmación del diagnóstico de cada una de las patologías oculares se realizaron las pruebas correspondientes: Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) y Fluorescent Treponemal Antibody Absorption (FTA-abs) séricos para sífilis, cultivos para hongos y TB e imagen clínica para retinitis por CMV.
2. Individuos con o sin tratamiento antirretroviral.
3. Individuos sin tratamiento con esteroides tópicos.
4. Individuos que hayan firmado la carta de consentimiento escrito.
5. Individuos mayores de 18 años.

6. Individuos sin infección por VIH y sin enfermedades oftalmológicas, con catarata senil, sometidos a cirugía de catarata y que acepten donar HA para ser analizado.
7. Individuos sin infección por VIH, sin otras infecciones aparentes, que acepten donar plasma para análisis de citocinas.

#### *Criterios de exclusión*

1. Individuos diabéticos o hipertensos.
2. Individuos con infección por el virus de la hepatitis B y/o C.
3. Individuos con patología ocular agregada: glaucoma, traumatismo, con transplante de córnea y degeneración macular relacionada con la edad (DMRE).

#### *Criterios de eliminación*

1. Individuos que no concluyan las tomas de muestra o el seguimiento clínico.

#### *PROCEDIMIENTO.*

- 1) Se obtuvo consentimiento informado escrito de todos los participantes.
- 2) Se realizó una evaluación clínica oftalmológica completa (lámpara de hendidura, revisión de fondo de ojo bajo midriasis farmacológica) para cada participante. En caso de que el paciente presentara lesiones oculares sugestivas de alguna patología infecciosa, se documentó fotográficamente con imágenes de fondo de ojo.

- 3) El diagnóstico de infecciones oculares fue clínico, de acuerdo a las características que pueden presentar cada uno de los agentes infecciosos a diferentes niveles del globo ocular. Se solicitaron exámenes de laboratorio según cada caso para reforzar el diagnóstico clínico oftalmológico (VDRL, FTAabs, cultivos) así como cuenta de linfocitos T CD4, y carga viral plasmática de VIH.
- 4) Se tomaron dos tubos de 10 mL de sangre anticoagulada con EDTA al momento del diagnóstico de la infección oportunista ocular y posteriormente al momento de evidencia clínica de mejoría, para medición de citocinas en plasma. Se consideró como mejoría a la desaparición de las lesiones a nivel ocular posterior al tratamiento específico para cada patología.
- 5) Se tomó una muestra de humor acuoso en aquellos pacientes con infección oportunista ocular diagnosticada clínicamente, al momento del diagnóstico y posteriormente al momento de evidencia clínica de mejoría, para medición de citocinas. Se consideró como mejoría a la desaparición de las lesiones oculares posterior a tratamiento específico de cada patología.
- 6) Se tomó muestra de humor acuoso en pacientes sin VIH que se sometieron a cirugía de catarata por causa senil, no diabéticos ni hipertensos y sin patologías oculares de otra índole (glaucoma, traumatismo, DMRE).
- 7) Se tomó una muestra de sangre (dos tubos de 10 mL) en personas sanas, sin infección por VIH, de 18 a 35 años para medir niveles de citocinas en plasma.

### *Análisis de citocinas en plasma*

Se determinó simultáneamente la presencia de múltiples citocinas en pequeños volúmenes de plasma de los individuos participantes mediante el equipo Luminex 200 (Luminex Corporation, Austin, TX), utilizando la tecnología xMAP (Multi-Analyte Profile). Esta tecnología se basa en el uso de hasta 100 grupos de microesferas con firmas espectrales únicas, a las cuales se les unen diferentes anticuerpos de captura que permiten el análisis de hasta 100 analitos de manera simultánea. El panel de citocinas a estudiar incluyó: Eotaxina, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF), Interferón 2 alfa (IFN-2 $\alpha$ ), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), Interleucina (IL)-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, Proteína-10 Inducida por Gamma Interferón (IP-10), Proteína-1 Quimioatrayente de Monocitos (MCP-1), Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ), Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 beta (MIP-1 $\beta$ ), RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y TNF $\beta$ . Se utilizó el estuche de reactivos Milliplex Human Cytokine (Millipore, Billerica, MA). Brevemente, una alícuota de 200  $\mu$ L de plasma se agregó una mezcla de microesferas marcadas con anticuerpos para cada una de las citocinas a analizar. Después de una incubación de 1 h, se añadió solución de anticuerpos reporteros biotinilados con una incubación adicional de 1 h. Las mezclas fueron reveladas utilizando un exceso de solución de estreptavidina-ficoeritrina con una incubación adicional de 1 h. Las mezclas de reacción fueron concentradas por filtrado al vacío y analizadas en el instrumento Luminex 200. Los datos generados fueron analizados por el software Milliplex Analyst provisto por el fabricante. En cada corrida se incluyeron curvas patrón y controles puntuales altos y bajos para cada analito, que permitieron obtener y validar los valores de concentración para cada citocina analizada.

### *Toma de muestra y análisis de Humor Acuoso*

Previa asepsia y antisepsia, con colocación de campos estériles, antibiótico tópico oftálmico profiláctico durante 30 minutos previos a la toma del HA y con colocación de anestesia tópica, se tomó una muestra HA de la cámara anterior (100-150  $\mu$ L) en aquellos pacientes con diagnóstico de infección ocular y al momento de la mejoría de ésta. La muestra fue congelada inmediatamente después de su obtención a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriormente ser procesada. En los pacientes con catarata senil, sólo se tomó muestra al momento previo del inicio de la cirugía de catarata, siendo la toma de HA parte del procedimiento. Posteriormente se analizó la muestra de HA para el panel de citocinas compuesto por: eotaxina, G-CSF, GM-CSF,  $\text{IFN}\alpha_2$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF- $\alpha$  y TNF-  $\beta$  (Milliplex Human Cytokine, Millipore) como se describió arriba.

### *Tamaño de la muestra*

El tamaño de la muestra estuvo restringido por el número de pacientes que acudieron a consulta a lo largo de la duración del estudio. Dado que se trata de un estudio exploratorio, no se requirió un cálculo de tamaño de muestra.

## *Análisis estadístico*

El instrumento Luminex proporciona estimaciones de la concentración de las citocinas estudiadas con base en una interpolación de una curva patrón, por lo que las mediciones que quedan abajo o arriba de esta curva se representan como mayor que... o menor que... los valores de los límites de detección. Dado que una gran cantidad de valores quedan en estos rangos, para cada citocina, el valor mínimo se ajustó al valor inferior más alto de todas las curvas patrón que se usaron en los análisis, y de igual modo para los valores más altos. Usamos para todos los análisis pruebas no paramétricas basadas en escalas ordinales, para incluir los valores extremos sin causar un sesgo por diferencias en sensibilidad de las curvas patrones. Para las mediciones entre grupos independientes y antes y después del tratamiento usamos la prueba de Wilcoxon de signo-rango, en sus versiones de muestras independientes y pareadas, respectivamente. Dada la gran cantidad de posibles combinaciones de grupos y citocinas, se necesitó corregir para comparaciones múltiples, en la que usamos el estadígrafo  $q$  de Storey. Consideramos una comparación como significativa con una  $p < 0.05$  y una  $q < 0.2$ . Los análisis se realizaron en el ambiente estadístico R versión 3.0.2, con el paquete `qvalue`.

Dividimos el análisis en dos fases. En la primera investigamos las diferencias que existen entre pacientes con catarata y controles versus pacientes VIH+, independientemente de la coinfección ocular que tuvieran. En la segunda fase estudiamos la posibilidad de que los patrones de citocinas entre pacientes VIH+ con coinfección ocular viral (citomegalovirus) fueran diferentes de los patrones de pacientes VIH+ con coinfección ocular bacteriana (sífilis).

Para el análisis multivariado asumimos que varias de las citocinas se comportarían de una manera no independiente, por lo que buscamos estas asociaciones mediante un análisis de componentes principales de los datos basales para plasma y acuoso por separado. Los análisis se realizaron usando el ambiente estadístico R con el paquete FactoMineR , modelando valores omitidos con el paquete missMDA [33], [34].

Para el análisis de las características inmunológicas basales entre los diferentes grupos (retinitis por CMV, Sífilis Ocular y Granulomas Coroideos por TB en el grupo de pacientes con VIH/SIDA) usamos la prueba de Kruskal Wallis.

## **Resultados**

Se reclutaron un total de 77 pacientes; 46 individuos con infección por VIH (HA y plasma) y 31 controles sin infección por VIH (15 plasmas y 16 HA). En el grupo con VIH tuvimos 43 hombres (93%) y 3 mujeres (6%); en el grupo de plasmas controles tuvimos 9 hombres (60%) y 6 mujeres (40%); en el grupo de acuosos controles tuvimos 10 hombres (62%) y 6 mujeres (37%). La mediana de edad en el grupo con VIH fue de 33 años (RIC 27-39); la mediana de edad para el grupo de plasmas controles fue de 29 años (RIC 27-34); la mediana de edad para el grupo de HA controles (pacientes sometidos a cirugía de catarata no diabéticos y sin enfermedades oculares) fue de 65 años (RIC 62-73) (Tabla I).



Tabla I. Características demográficas de los diferentes grupos.

	Grupos (n=77)					
	46 pacientes VIH		15 controles (plasma)		16 controles (Humor Acuoso)	
<b>Género</b>	3 mujeres (6%)	43 hombres (93%)	6 mujeres (40%)	9 hombres (60%)	6 mujeres (37%)	10 hombres (62%)
<b>Edad (mediana, años)</b>	33 (RIC 27-39)		29 (RIC 27-34)		65 (RIC 62-73)	

RIC = rango intercuartil

VIH = Virus de la Inmunodeficiencia Humana

De acuerdo a la infección oportunista ocular que tuvieron, los 46 pacientes con VIH se encontraban distribuidos de la siguiente manera: 23 pacientes con retinitis por CMV (23 muestras de plasma y 23 de HA), 16 pacientes con sífilis (16 muestras de plasma y 15 de HA), 5 pacientes con granulomas coroideos asociados a tuberculosis (solo muestras de plasma), 1 paciente con herpes zoster oftálmico (HZO) (solo muestra de plasma) y 1 paciente con hipopion severo secundario a criptococosis diseminada (plasma y HA) (Figura 1).

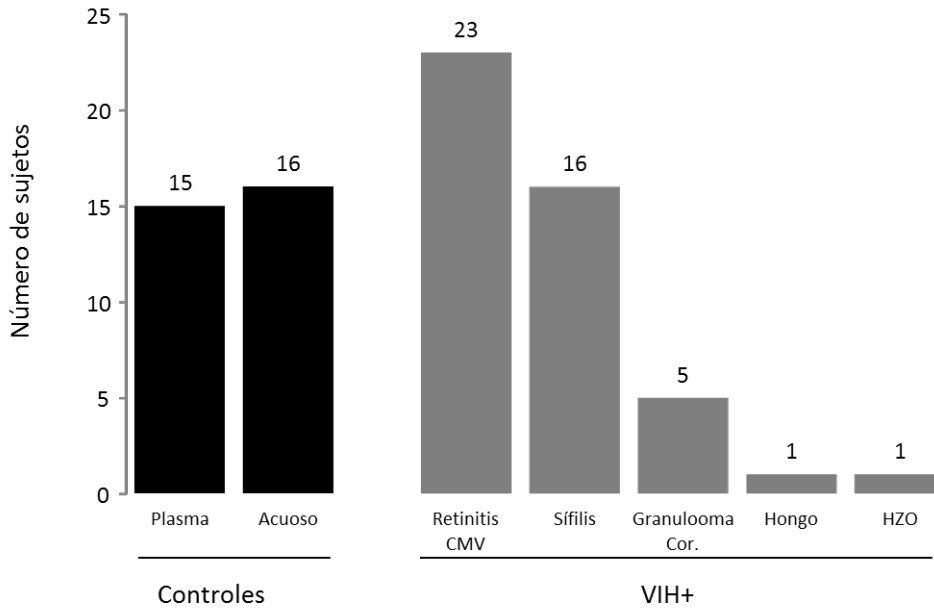


Figura 1. Número de pacientes incluidos en el presente estudio. Número total=77.

Se analizaron los patrones de citocinas de las cinco patologías infecciosas, encontrándose diferencias solamente en los dos grupos con mayor cantidad de pacientes (retinitis por CMV y sífilis ocular) al compararlos con el grupo control plasma y el grupo control humor acuoso, por lo cual, este estudio se centra en la descripción de citocinas de estas dos patologías oculares.

En cuanto a las características inmunológicas de los pacientes con VIH/SIDA (Tabla II), encontramos diferencias al comparar las medianas basales de cuentas de linfocitos T CD4+ ( $p < 0.0001$ ) y CVp de VIH ( $p = 0.003$ ) entre los pacientes con retinitis por CMV, sífilis y granulomas coroideos. Ajustando con Bonferroni encontramos que el grupo diferente en cuanto al nivel basal de linfocitos T CD4+ fue el de sífilis, al compararlo con CMV ( $p = 0.00007$ ) y con granuloma coroidal por TB ( $p = 0.004$ ). No hubo diferencias en

cuanto al estado inmunológico basal al comparar a los pacientes con retinitis por CMV vs granuloma coroideo por TB.

Tabla II. Características inmunológicas basales en pacientes con VIH e infección ocular. n=44

	Retinitis por CMV n=23	Sífilis n=16	Granuloma Coroideo por MTB n=5
<b>CD4: mediana, (RIC)</b>	49 (23-145) * **	317(217.5-479.5) * **	41 (24-148.5) *
<b>% CD4: mediana, (RIC)</b>	9 (6.75-12.5)	17 (11.75-21)	14 (9-16)
<b>Carga Viral VIH: mediana, (RIC)</b>	10943 (109-265637) *	21037 (39-148468.50) *	992572 (111490-2027043.5) *
<b>Log VIH Carga Viral: mediana, (RIC)</b>	4.04 (2.4-5.42)	3.16 (1.59-4.96)	6 (4.15-6.27)

VIH = Virus de la Inmunodeficiencia Humana

CMV = citomegalovirus

MTV = *Mycobacterium tuberculosis*

CD4 = linfocitos T CD4+

RIC = rango intercuartil

\*Kruskall Wallis p <0.0001 para CD4 y p = 0.003 para la Carga Viral.

\*\* Bonferroni p = 0.00007

### *Citocinas en plasma vs. Humor Acuoso.*

Varias de las medianas de las citocinas analizadas se encontraron por debajo de su límite de detección, de acuerdo a la curva patrón del ensayo o ligeramente detectables tanto en plasma como en HA de los grupos control como el grupo de pacientes con VIH (Tabla III). Se observaron diferencias importantes en las concentraciones plasmáticas y en HA para varias citocinas tanto en los controles como en el grupo de pacientes con VIH. Estos resultados en conjunto sugieren una compartimentalización con perfiles característicos de citocinas en HA vs. plasma, tanto en individuos sanos como en pacientes con VIH.

Tabla III. Medianas basales de citocinas (Plasma y Humor Acuoso) en controles y pacientes con VIH.

Citocina (pg/ml)	Controles		VIH	
	Plasma Mediana (RIC) n=15	Humor Acuoso Mediana (RIC) n=16	Plasma n=45	Humor Acuoso n=39
Eotaxina	60.84 (33.30-110.45)	32.15 (27.78-34.42)	63.35 (49.27-79.12)	56.07 (39.95-76.85)
G-CSF	180 (98.55-325.25)	11.55 (11.55-18.36)	65.695 (25.97-160.5)	298 (79.65-584.25)
GM-CSF	10.77 (1.93-31.90)	12.93 (9.39-18.80)	3.84 (1.93-6.92)	36.61 (9.39-74.93)
IFN-2 $\alpha$	45.03 (2.97-74.88)	<8.09	20.94 (10.74-46.44)	100.53 (28.31-172.25)
IFN- $\gamma$	21.47(3.84-78.64)	3.29 (3.29-3.59)	4.15 (2.84-8.42)	16.34 (4.67-45.47)
IL-10	3.87 (3.87-4.89)	<8.44	15.2 (8.04-33.48)	8.44 (8.44-33.56)
IL-12p40	<59.10	<5.05	<59.10	<5.05
IL-12p70	36.15(7.81-105.5)	<2.37	<7.81	<2.37
IL-13	25.15 (7.81-36.99)	<15.36	<7.81	<15.36
IL-15	2.86 (2.86-2.89)	<2.86	<2.86	<2.86
IL-17	11.47 (3.11-62.05)	<3.14	<3.11	<3.14
IL-1 $\alpha$	2.87 (2.87-23.88)	<2.18	18.98 (9.45-52.48)	137.5 (41.05-1052.5)
IL-1 $\beta$	1.61 (1.61-7.76)	<5.03	<1.61	<5.03
IL-2	1.54- (1.54-25.8)	<3.94	1.54 (1.54-1.86)	3.94 (3.94-5.54)
IL-3	<1.99	15.79 (10.9-24.20)	<1.99	9.925 (1.66-242.25)
IL-4	<13.30	<8.34	<13.30	<8.34
IL-5	<1.65	3.99	<1.65	<3.99
IL-6	1.33 (1.33-7.98)	49.22 (14.05-91.25)	3.84 (1.52-10.92)	172.5 (55.03-355.81)
IL-7	1.89 (1.89-2.63)	<2.43	3.37 (1.89-7.25)	<2.43
IL-8	4.48 (1.32-20.84)	9.68 (3.20-22.41)	10.72 (5.61-21.57)	77.87 (34.52-190.25)
IP-10	249 (153.5-417.75)	203.5 (165-309.75)	2435.66 (1168.87-4172.25)	12394.76 (8821.75-14772.44)
MCP-1	113 (88.66-177.75)	1396 (1058.25-2122)	289.5 (217.5-467)	8513 (4112.75-10615)
MIP-1 $\alpha$	26.39 (26.39-29.53)	24.35 (18.74-26.23)	<26.39	34.68 (24.07-56.47)
MIP-1 $\beta$	35.30 (17.23-46.87)	12.74 (10.70-20.70)	29.70 (18.41-47.77)	44.49 (22.42-148.15)
RANTES	2388 (1176.5-4222.5)	<50.69	4445 (3155.5-5757)	<50.69
TNF $\alpha$	9.2 (1.93-17)	<2.58	26.26 (14.37-32.75)	12.77 (3.41-31.64)
TNF $\beta$	4.12 (4.12-9.36)	<7.91	<4.12	<7.91

< = menor al límite de detección

VIH = Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RIC = Rango Intercuartil

*Diferencias entre niveles de citocinas en plasma y Humor Acuoso en controles versus pacientes con VIH.*

Se encontraron diferencias en las concentraciones de citocinas en el humor acuoso vs. plasma al comparar entre grupo control vs. pacientes con VIH. En la tabla IV, se muestran sólo las citocinas con diferencias significativas ya sea en plasma o en acuoso.

Tabla IV. Niveles de citocinas en plasma y acuoso. Comparación de controles versus pacientes con VIH e infección ocular.

Citocina (pg/ml)	Plasma Control n=15 Mediana (RIC)	Plasma VIH Mediana (RIC) n=45	p Wx < 0.05* q Wx < 0.2**	Humor Acuoso Control n=16 Mediana (RIC)	Humor Acuoso VIH n=39 Mediana (RIC)	p Wx < 0.05* q Wx < 0.2 **
Eotaxina	60.84 (33.305-110.45)	63.35 (49.27625-79.12)	NS	32.155 (27.78-34.42)	56.07 (39.95-76.85)	p 0.0000211 q 0.0000311
G-CSF	180 (98.55-325.25)	65.695 (25.97-160.5)	p 0.0081 q 0.006	11.55 (11.55-18.3625)	298 (79.65-584.25)	p 0.00000136 q 0.000002
GM-CSF	10.77 (1.93-31.90)	3.84 (1.93-6.92)	NS	12.93 (9.39-18.80)	36.61 (9.39-74.93)	p 0.027 q 0.016
IFN-2 $\alpha$	45.03 (2.97-74.88)	20.945 (10.74-46.44)	NS	<8.09	100.53 (28.31-172.25)	p 0.000000085 q 0.0000004
IFN- $\gamma$	21.47 (3.84-78.64)	4.15 (3.84-8.42)	p 0.019 q 0.012	<3.29	16.3425 (4.67-45.47)	p 0.0000099 q 0.00005
IL-10	3.87 (3.87-4.89)	15.2 (8.04-33.48)	p 0.0000237 q 0.00003	<8.44	8.44 (8.44-33.56)	p 0.0019 q 0.0017
IL-12p70	36.15 (7.81-105.5)	< 7.81	p 0.0000305 q 0.00003	<2.37	<2.37	NS
IL-17	11.47 (3.11-62.055)	<3.11	p 0.001 q 0.001	<3.14	<3.14	NS
IL-1 $\alpha$	2.87 (2.87-23.885)	18.985 (9.45-52.48)	p 0.027 q 0.016	<2.18	137.5 (41.05-1052.5)	p 0.000000515 q 0.0000004
IL-2	1.54 (1.54-25.08)	1.54 (1.54-1.86)	NS	<3.94	3.94 (3.94-5.54)	p 0.031 q 0.01
IL-6	1.33 (1.33-7.985)	3.84 (1.52-10.92)	NS	49.22 (14.05-91.255)	172.5 (55.035-355.815)	p 0.0133 q 0.009
IL-8	4.48 (1.32-20.84)	10.72 (5.61-21.57)	NS	9.68 (3.20-22.41)	77.87 (34.52-190.25) n	p 0.000000496 q 0.000001
IP-10	249 (153.5-417.75)	2435.66 (1168.87-4172.25)	p 0.000000323 q 0.000001	203.5 (165-309.75)	12394.76 (8821.75-14772.44)	p 0.0000000182 q 0.0000002
MCP-1	113 (88.66-177.75)	289.5 (217.5-467)	p 0.0000222 q 0.00003	1396 (1058.25-2122)	8513 (4112.75-10615) <sup>a</sup>	p 0.00000112 q 0.000002
MIP-1 $\alpha$	26.39 (26.39-29.53)	<26.39	NS	24.35 (18.74-26.23)	34.68 (24.07-56.47)	p 0.003 q 0.002
MIP-1 $\beta$	35.3 (17.23-46.87)	29.705 (18.41-47.77)	NS	12.74 (10.70-20.70)	44.49 (22.42-148.15)	p 0.0002152 q 0.0002
RANTES	2388 (1176.5-4222.5)	4445 (3155.5-5757)	p 0.019 q 0.012	<50.69	<50.69	NS
TNF $\alpha$	9.2 (1.93-17.002)	26.26 (14.37-32.75)	p 0.0004 q 0.0004	<2.58	12.77 (3.4-31.64)	p 0.000005 q 0.00001

VIH= Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RIC = Rango Intercuartil

NS = no significativo

< = menor al límite de detección

\*p Wilcoxon

\*\*q de Storey para múltiples comparaciones

<sup>a</sup> n = 36

Se puede observar que hay citocinas que están elevadas en el HA de los pacientes con VIH y no en el plasma como son: eotaxina, GM-CSF, IFN-2 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . También hubo citocinas que se encontraban elevadas sólo en el plasma de los pacientes con VIH y no en el HA a diferencia del grupo control como es el caso de RANTES. Hubo citocinas que se encontraban elevadas tanto en plasma como en HA en los pacientes con VIH a diferencia de los controles: G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IP-10, MCP-1 y TNF- $\alpha$ . También se encontraron citocinas disminuidas en el plasma de los pacientes con VIH a diferencia del grupo control: IL-12p70 e IL-17; así como citocinas más elevadas en el HA de los pacientes con VIH a diferencia del control (Tabla IV, Figura 2 y Figura 3).

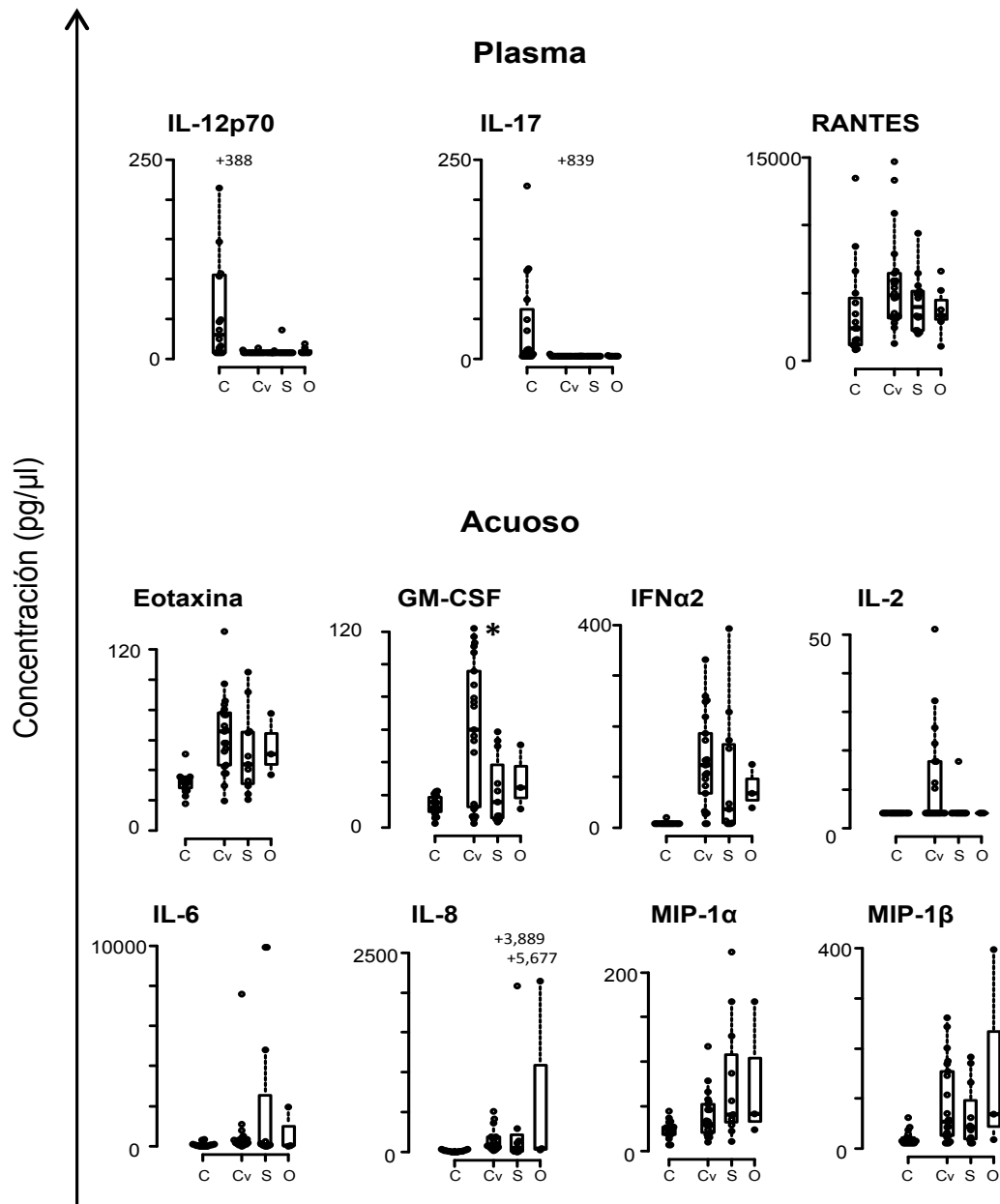


Figura 2

Figura 2. Concentración de citocinas medidas en plasma y en humor acuoso en la condición basal (pre tratamiento). Los controles para plasma (C) son sujetos voluntarios sanos y para humor acuoso son pacientes con indicación de cirugía de catarata, sin datos de infección por VIH u otras. Los pacientes con infección por VIH se subdividieron de acuerdo a su coinfección ocular: citomegalovirus (Cv), sífilis (S) u otros (O). Todas las citocinas mostradas tienen diferencias significativas entre controles y pacientes VIH positivos (prueba signo-rango de Wilcoxon  $p < 0.05$ , Storey  $q < 0.2$ ) las citocinas en donde no hubo diferencias significativas no son mostradas en esta figura. Los números arriba y dentro de las figuras muestran valores extremos fuera de la escala y de la gráfica. Los asteriscos muestran diferencias entre los pacientes VIH+ con CMV versus pacientes VIH+ con sífilis ocular ( $p < 0.05$ ,  $q < 0.2$ ).



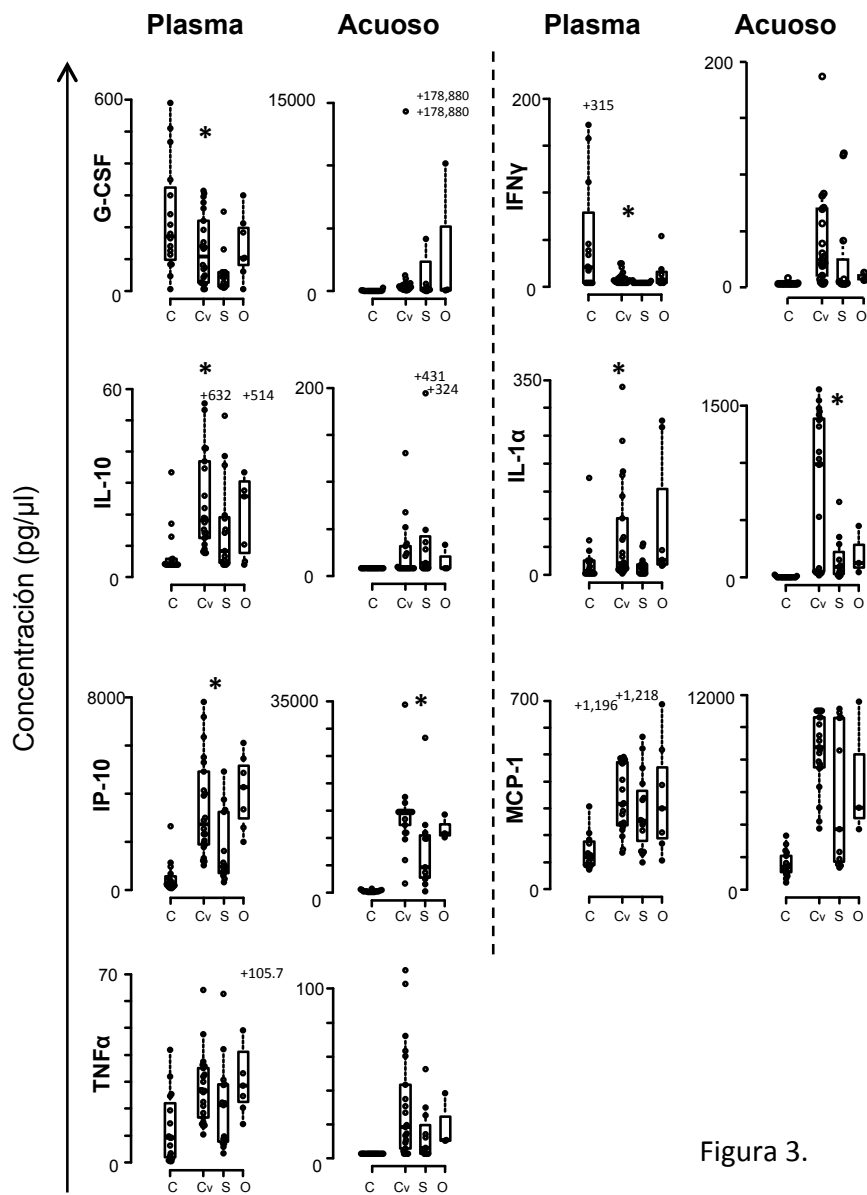


Figura 3.

Figura 3. Concentración de citocinas medidas en plasma y en humor acuoso en la condición basal (pre tratamiento). Los controles para plasma (C) son sujetos voluntarios sanos y para humor acuoso son pacientes con indicación de cirugía de catarata, sin datos de infección por VIH u otras. Los pacientes con infección por VIH se subdividieron de acuerdo a su coinfección ocular: citomegalovirus (Cv), sífilis (S) u otros (O). Todas las citocinas mostradas tienen diferencias significativas entre controles y pacientes VIH positivos (prueba signo-rango de Wilcoxon  $p < 0.05$ , Storey  $q < 0.2$ ), tanto en humor acuoso como en plasma; las citocinas en donde no hubo diferencias significativas no son mostradas en esta figura. Se muestran las citocinas que fueron significativas tanto en humor acuoso como en plasma. Los asteriscos muestran diferencias entre los pacientes VIH+ con CMV versus pacientes VIH+ con sífilis ocular ( $p < 0.05$ ,  $q < 0.2$ ). Los números arriba y dentro de las figuras muestran valores extremos fuera de la escala y de la gráfica.

Estos resultados en conjunto sugieren diferencias importantes en los perfiles de citocinas de controles y pacientes con VIH e infección ocular, tanto en el compartimento del HA como en el plasma y que estas diferencias son específicas del compartimento del que se trate. En general, es notable un aumento de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ .; citocinas antiinflamatorias como IL-10; quimiocinas como IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y eotaxina; factores de crecimiento como G-CSF, GM-CSF, IL-2 e interferones en el HA de pacientes con VIH e infección ocular, lo cual refleja una alteración evidente de la homeostasis ocular.

*Diferencias entre los niveles de citocinas en plasma y Humor Acuoso en pacientes con retinitis por CMV y sífilis ocular antes del tratamiento específico versus controles y entre sí.*

Se compararon las muestras basales de humor acuoso en los pacientes con retinitis por CMV y pacientes con sífilis ocular versus el grupo control (catarata) y pudimos observar que MCP-1, IP-10, IFN-2 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y G-CSF estaban más elevadas en los pacientes con retinitis por CMV que en el grupo con sífilis ocular en comparación con el grupo control. Observamos que IL-10 en el HA de los pacientes con sífilis ocular se encontraba ligeramente más elevada que en los pacientes con retinitis por CMV a diferencia del grupo control (Tabla V).

Al comparar las muestras basales de plasma en los pacientes con retinitis por CMV y pacientes con sífilis ocular versus el grupo control pudimos observar que IP-10, IL-10 y MCP-1 estaban más elevadas en los pacientes con retinitis por CMV que en el grupo con sífilis ocular en comparación con el grupo control. Observamos que IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-17, e IL-13 se encontraban más elevadas en el plasma del grupo control (Tabla V).

El G-CSF estaba elevado en el plasma control a diferencia del grupo de pacientes con sífilis ocular y TNF- $\alpha$ , RANTES, IL-1 $\alpha$ , IL-6, e IL-7 sólo se encontraban elevadas en el plasma de los pacientes con retinitis por CMV en comparación con el grupo de sífilis ocular (Tabla V).

Tabla V. Comparación de muestras de Humor Acuoso y Plasma basales en pacientes con retinitis por CMV y Sífilis Ocular versus Controles.

Humor Acuoso								
Citocina (pg/ml)	CMV Mediana n=21	Control Mediana n=16	pWx* <0.05	q Wx** <0.2	Sífilis Mediana n=11	Control Mediana n=16	p Wx* <0.05	q Wx** <0.2
MCP-1	8759	1396	0.0000002	0.0000002	3740.5	1396	0.003	0.0006
IP-10	14772.44	203.5	0.0000001	0.0000002	4622.5	203.5	0.00004	0.00001
IFN2 $\alpha$	123	8.09	0.0000007	0.0000006	37.13	8.09	0.000005	0.000003
Eotaxina	65.81	32.15	0.00001	0.000005	43.76	32.15	0.04	0.004
IL-1 $\alpha$	991	2.18	0.0000001	0.0000002	88.92	2.18	0.00001	0.000005
GM-CSF	59.98	12.93	0.007	0.001				
TNF- $\alpha$	18.52	2.58	0.000006	0.000003	5.96	2.58	0.0003	0.00009
MIP-1 $\beta$	53.96	12.74	0.0004	0.0001	42.05	12.74	0.01	0.001
MIP-1 $\alpha$	30.33	24.35	0.02	0.003	41.1	24.35	0.003	0.0005
IFN- $\gamma$	24.51	3.29	0.000008	0.000003	4.47	3.29	0.03	0.003
IL-8	87.94	9.68	0.00000001	0.00000007	54.95	9.68	0.009	0.001
IL-10	8.44	8.44	0.003	0.0005	13.58	8.44	0.001	0.0002
IL-6	254	49.22	0.001	0.0002				
G-CSF	344.04	11.55	0.0000009	0.0000006	119.48	11.55	0.0005	0.0001
Plasma								
Citocina (pg/ml)	CMV Mediana n=22	Control Mediana n=15	pWx* <0.05	q Wx** <0.2	Sífilis Mediana n=11	Control Mediana n=16	p Wx* <0.05	q Wx** <0.2
IP-10	2718	249	0.00000004	0.0000001	972.75	249	0.0001	0.00003
TNF- $\alpha$	26.67	9.2	0.0003	0.00009				
G-CSF					45.17	180	0.001	0.0002
IL-12p70	7.81	36.15	0.0004	0.0001	7.81	36.15	0.0009	0.0001
IFN- $\gamma$					3.84	21.47	0.004	0.0007
IL-17	3.11	11.47	0.008	0.001	3.11	11.47	0.005	0.0008
IL-10	18.08	3.87	0.000008	0.000003	8.4	3.87	0.007	0.0011
IL-1 $\alpha$	20.65	2.87	0.01	0.001				
MCP-1	316.5	113	0.00002	0.000009	253	113	0.001	0.0003
RANTES	4841	2388	0.01	0.001				
IL-13	7.81	25.15	0.0001	0.00004	7.81	25.15	0.0006	0.0001
IL-6	6.57	1.33	0.02	0.002				
IL-7	6.3975	1.89	0.01	0.001				

CMV = citomegalovirus \* p Wilcoxon

\*\*q de Storey para múltiples comparaciones

Se compararon las muestras basales de HA y plasma de pacientes con retinitis por CMV versus los pacientes con Sífilis ocular, encontrándose diferencias entre ambos grupos en el HA en GM-CSF, IL-1 $\alpha$  e IP-10. Hubo diferencias en los plasmas entre ambas patologías en: G-CSF, IFN-2 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-7, IL-8 e IP-10 (Tabla VI; Figura 2 y Figura 3). Sólo se compararon los grupos de CMV y Sífilis por ser los que contaban con un número mayor de pacientes (n=22 y n=15, respectivamente).

Tabla VI. Comparación de muestras de Humor Acuoso y Plasma basales en pacientes con retinitis por CMV vs Sífilis Ocular.

Citocina (pg/ml)	Compartiment o	CMV Mediana n=22	Sífilis Mediana n=15	p Wx* <0.05	q Wx** <0.2
<b>GM-CSF</b>	HA	59.98	15.47	0.0262	0.1571
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	HA	991	88.92	0.033	0.15
<b>IP-10</b>	HA	14772.44	4622.5	0.002	0.046
<b>GCSF</b>	Plasma	107.475	45.1725	0.032	0.157
<b>IFN2<math>\alpha</math></b>	Plasma	25.495	12.505	0.022	0.151
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Plasma	6.22	3.84	0.003	0.047
<b>IL-10</b>	Plasma	18.085	8.4	0.034	0.157
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Plasma	20.655	12.475	0.043	0.157
<b>IL-7</b>	Plasma	6.3975	1.89	0.007	0.067
<b>IL-8</b>	Plasma	14.2175	5.61	0.003	0.047
<b>IP-10</b>	Plasma	2718	972.75	0.001	0.046

HA = Humor Acuoso

\* p Wilcoxon

\*\*q de Storey para múltiples comparaciones

Estos resultados en conjunto evidencian perfiles de citocinas característicos de la retinitis por CMV versus sífilis ocular, diferentes ambos a los controles sanos lo cual podría reflejar mecanismos inmunológicos distintos en respuesta a las dos infecciones. Es importante resaltar el fuerte perfil inflamatorio observado en la retinitis por CMV en comparación con la sífilis ocular, así como la alteración sistémica mayor observada en los pacientes con CMV en comparación con los pacientes de sífilis ocular.

*Cambios en los perfiles de citocinas antes y después de los tratamientos específicos para las infecciones oculares.*

A continuación se compararon los perfiles de citocinas antes y después del tratamiento específico en pacientes con retinitis por CMV y con sífilis ocular. En los pacientes con Retinitis por CMV encontramos una disminución (deltas= $\Delta$ ) estadísticamente significativa entre los niveles pre y post tratamiento en 15 citocinas: eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN-2 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL2, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el Humor Acuoso y solamente una citocina en plasma (IL-10). En los pacientes con sífilis ocular hubo una disminución (deltas= $\Delta$ ) estadísticamente significativa entre los niveles pre y post tratamiento en 9 citocinas: eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 y MIP-1 $\alpha$  en el Humor Acuoso y solamente una citocina en plasma (IFN-2 $\alpha$ ) (Tabla VII, Figura 4) mostró elevación posterior al tratamiento.

Tabla VII. Niveles de citocinas (pre y post tratamiento= deltas  $\Delta$ ) en el Humor Acuoso y Plasma de pacientes con retinitis por CMV y Sífilis ocular.

Retinitis CMV (Basal vs Final). Deltas= $\Delta$					
Citocina (pg/ml)	Compartimento	n	Delta de las medianas	p Wx* <0.05	q Wx** <0.2
Eotaxina	HA	17	-15.25	0.00001	0.001
G-CSF	HA	17	-359	0.0001	0.003
GM-CSF	HA	17	-32.71	0.00001	0.001
IFN-2 $\alpha$	HA	17	-114.3	0.0008	0.01
IFN- $\gamma$	HA	17	-27.22	0.0007	0.01
IL-10	HA	17	0	0.01	0.11
IL-1 $\alpha$	HA	17	-234.83	0.00005	0.001
IL-6	HA	17	-206.09	0.0005	0.011
IL-8	HA	17	-135.8	0.0000007	0.002
IP-10	HA	17	-7772.44	0.0005	0.011
MCP-1	HA	17	-5291.18	0.00003	0.001
MIP-1 $\alpha$	HA	17	-19.94	0.00004	0.001
MIP-1 $\beta$	HA	17	-36.81	0.00007	0.002
TNF- $\alpha$	HA	17	-12.15	0.003	0.02
IL-10	Plasma	19	-6.365	0.002	0.03
Sífilis (Basal vs Final). Deltas= $\Delta$					
Citocina (pg/ml)	Compartimento	n	Delta de las medianas	p Wx* <0.05	q Wx** <0.2
Eotaxina	HA	10	-17.13	0.001	0.02
G-CSF	HA	10	-107.69	0.009	0.08
GM-CSF	HA	10	-4.59	0.001	0.02
IL-1 $\alpha$	HA	10	-54.26	0.001	0.02
IL-6	HA	10	-45.93	0.014	0.11
IL-8	HA	10	-39.22	0.003	0.03
IP-10	HA	10	-2920.75	0.001	0.02
MCP-1	HA	10	-2007.75	0.001	0.02
MIP-1 $\alpha$	HA	10	-19.34	0.005	0.05
IFN-2 $\alpha$	Plasma	12	14.66	0.014	0.11

HA = Humor Acuoso

CMV = citomegalovirus

\*p Wilcoxon

\*\*q de Storey para multiples comparaciones

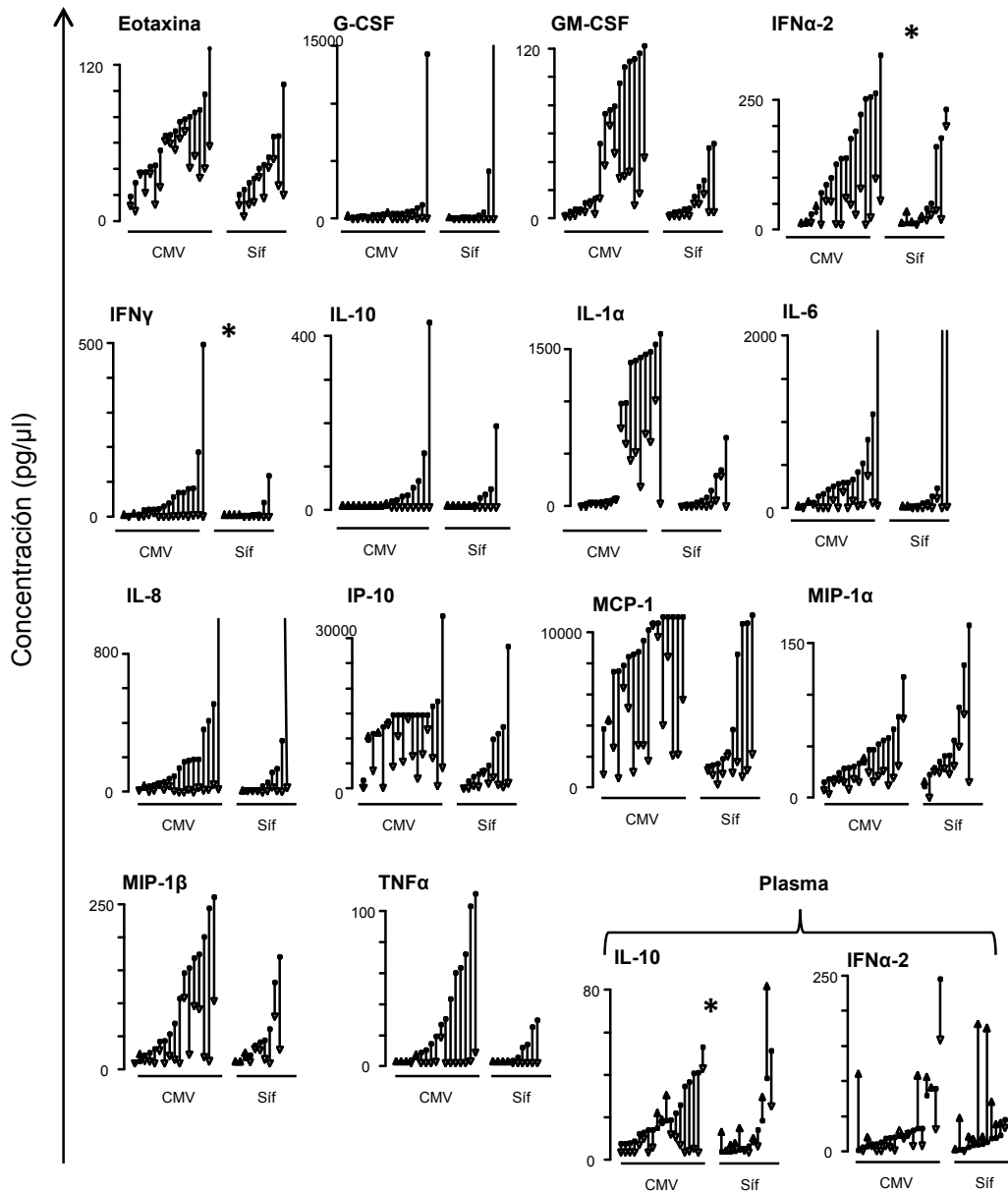


Figura 4. Concentraciones de citocinas medidas en humor acuoso y plasma (corchete inferior) de pacientes VIH positivos antes y después de tratamiento. CMV: pacientes con coinfección ocular por citomegalovirus; Sif: pacientes con coinfección ocular por sífilis. Las flechas son cada paciente individual, y la dirección de la flecha indica si aumentó o disminuyó la citocina correspondiente. Sólo se muestran las citocinas para las cuales hubo diferencias significativas (prueba de Wilcoxon pareada  $p < 0.05$ , Storey  $q < 0.2$ ) entre los valores antes de tratamiento versus después de tratamiento. Los asteriscos muestran diferencias entre la magnitud del cambio (delta) en esa citocina entre el grupo CMV y el grupo Sif (prueba signo-rango de Wilcoxon  $p < 0.05$ , Storey  $q < 0.2$ ).



Al comparar las medianas de las deltas ( $\Delta$ ) entre retinitis por CMV versus sífilis ocular, solo hubo diferencia entre estos dos grupos en 4 citocinas:  $\Delta$  de IFN-2 $\alpha$  e IL-10 en plasma y  $\Delta$  de INF-2 $\alpha$  e INF- $\gamma$  en acuoso. Observamos que los pacientes con sífilis ocular tuvieron elevación de esas citocinas en plasma a diferencia de los pacientes con retinitis por CMV que mostraron una reducción. En el HA las dos citocinas tuvieron una disminución en ambas enfermedades, con mayor decremento en los pacientes con retinitis por CMV. (Tabla VIII, Figura 4).

Tabla VIII. Comparación de las medianas de las deltas  $\Delta$  entre los pacientes con retinitis por CMV vs los pacientes con Sífilis Ocular.

CMV vs Sífilis							
Citocina (pg/ml)	Compartiment <sup>o</sup>	CMV n	Sífilis n	Mediana $\Delta$ CMV	Mediana $\Delta$ Sífilis	p Wx * <0.05	q Wx ** <0.2
<b>Delta IFN-2<math>\alpha</math></b>	Plasma	19	12	-3.53	14.66	0.013	0.17
<b>Delta IL-10</b>	Plasma	19	12	-6.365	2.075	0.007	0.109
<b>Delta INF-2<math>\alpha</math></b>	HA	17	10	-114.3	-11.01	0.034	0.157
<b>Delta INF-<math>\gamma</math></b>	HA	17	10	-27.22	-1.155	0.032	0.157

HA = Humor Acuoso

CMV = citomegalovirus

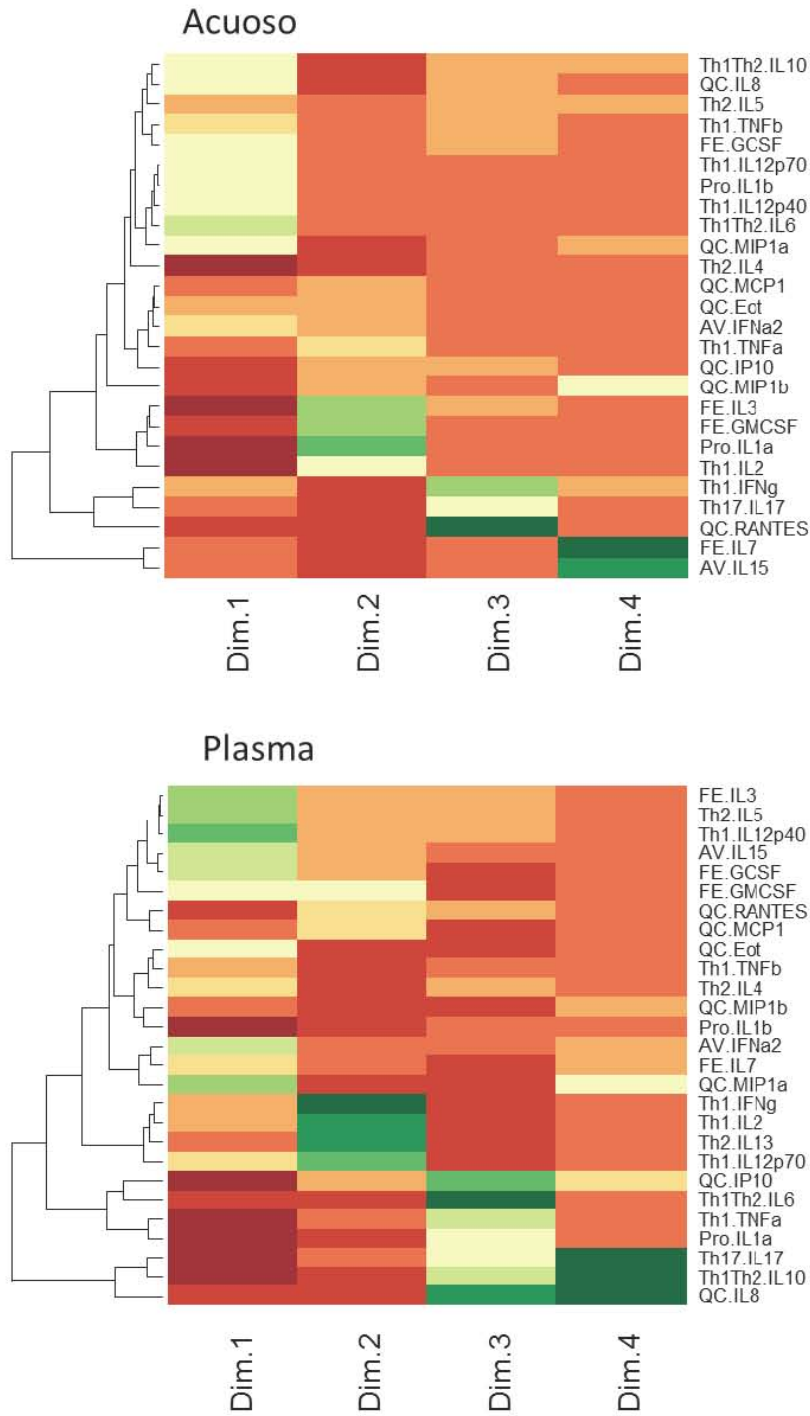
\*p Wilcoxon

\*\*q de Storey para multiples comparaciones

Estos resultados muestran un cambio notable debido al tratamiento específico en ambas infecciones oculares, con disminución de múltiples citocinas elevadas en el estado basal de la infección ocular. En particular es evidente la disminución del ambiente inflamatorio en ambas infecciones oculares, siendo especialmente evidente la disminución en interferones de tipo I y II después del tratamiento de la retinitis por CMV.

### *Análisis de componentes principales.*

Se hizo un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de buscar patrones globales de expresión de citocinas característicos de cada infección ocular y de controles versus pacientes con VIH e infección ocular. En cuanto al ACP de los datos basales para plasma y acuoso por separado, seleccionamos sólo las dimensiones que explicaban más del 5% de la varianza. Las dimensiones se conformaron por variables de diversa naturaleza, incluyendo quimiocinas, citocinas  $T_H1$ , citocinas  $T_H2$ , factores de estimulación y antivirales (Figura 5). Como se puede ver en el mapa de calor (Heat Map), no parecen agruparse en una sólo función.



QC: Quimiocina; FE:Factor de estimulación; Pro:Proinflamatorio; AV:Antiviral

Figura 5. Mapa de calor (heat map) de las aportaciones a la varianza de cada citocina a las cuatro principales dimensiones de cada compartimento (humor acuoso y plasma) obtenidas por análisis de componentes principales. Rojo son aportaciones altas, verde son aportaciones bajas. La escala se ajustó para cada columna.

Analizamos las correlaciones entre las dimensiones dentro del HA y plasma y tampoco encontramos que hubiese una correlación entre las dimensiones dentro del acuoso y el plasma, sugiriendo que los patrones de citocinas en ambos casos son independientes; posteriormente analizamos las dimensiones principales del HA y plasma de los pacientes con VIH vs. los controles y los pacientes con retinitis por CMV vs. sífilis ocular (Figura 6).

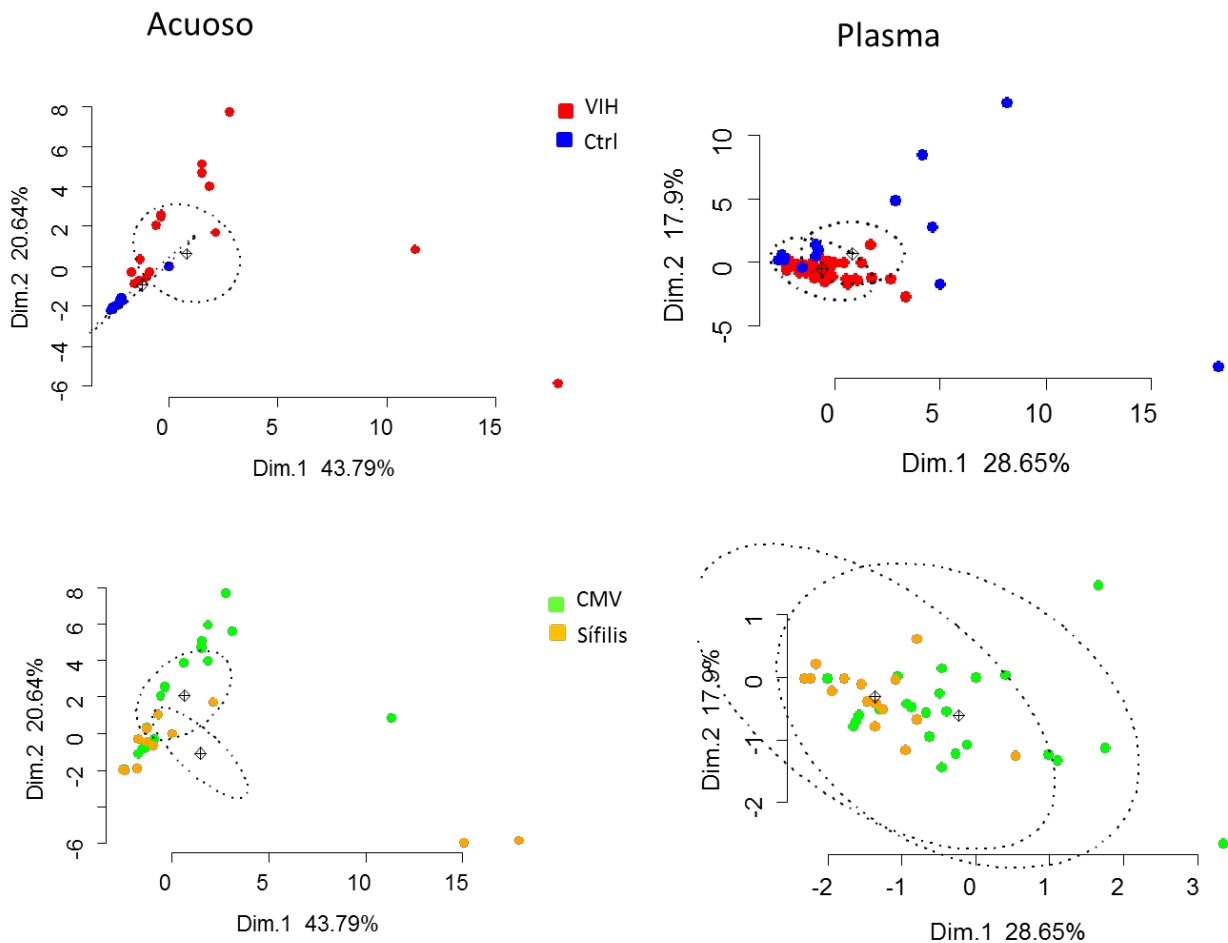


Figura 6. Gráficas de cada medición (sujeto) en las dos principales dimensiones del análisis de componentes principales. Las gráficas de la izquierda muestran las dimensiones del humor acuoso, y las de la derecha las de plasma. Arriba se agruparon los sujetos por estatus de infección por VIH (con o sin infección) y abajo se tomaron sólo los pacientes VIH positivos, agrupándose en los que tenían coinfección por citomegalovirus (CMV) o sífilis. Para cada grupo se dibujó una elipse de confiabilidad al 95%, calculada por 100 repeticiones con reemplazo (bootstrapping).

Sólo las dimensiones principales del acuoso parecieron tener un comportamiento diferente entre los pacientes VIH y los controles, o entre la infección por citomegalovirus y sífilis; los centros de las elipses de confianza del 95% no traslapan con los bordes de la otra, lo que muestra que el patrón de citocinas de los pacientes VIH e infección ocular (respuesta principalmente  $T_H1$ ) es significativamente diferente del patrón de los controles. De igual modo, dentro de los pacientes infectados, los que tuvieron CMV presentaron un patrón diferente de los que tuvieron sífilis ocular. Estos resultados en conjunto, confirman los diferentes patrones de expresión de citocinas en los pacientes con VIH con distintas infecciones oculares lo cual sugiere que existen mecanismos inmunológicos complejos y diferentes que caracterizan a la respuesta hacia cada infección particular.

## Discusión

Este es el primer estudio prospectivo y longitudinal realizado en pacientes con VIH y retinitis por CMV o sífilis ocular en el que se muestra la disminución en la concentración de citocinas proinflamatorias y de quimiocinas en el HA posterior al tratamiento sistémico específico, acompañado de mejoría clínica oftalmológica. Asimismo, analizamos el comportamiento de las citocinas de manera simultánea en dos compartimentos: HA y plasma, en dos tiempos diferentes (pre y post-tratamiento específico), en pacientes con retinitis por CMV y sífilis ocular ambas asociadas a VIH, en comparación con grupos controles sanos en plasma y HA.

Las características demográficas e inmunológicas de nuestra cohorte son similares a lo reportado previamente por otros estudios en pacientes con VIH [3]: una población predominantemente masculina, joven (mediana = 33 años, RIC 27-39) y con mayor inmunosupresión en aquellos pacientes con retinitis por CMV en comparación con los pacientes con sífilis ocular [6]. Como era de esperarse, encontramos una mayor edad (mediana = 65 años, RIC 62-73) en el grupo de pacientes sometidos a cirugía de catarata sin patología ocular ni sistémica agregada, ya que la presencia de opacidad en el cristalino está asociada al envejecimiento [35]. Por las implicaciones éticas, éste fue nuestro grupo control para poder realizar las comparaciones en el HA, ya que se puede tomar una muestra de éste antes de realizar el procedimiento quirúrgico para extracción de catarata sin que esto implique un mayor riesgo.

En el plasma de los pacientes con retinitis por CMV, encontramos que las citocinas (G-CSF, IFN-2 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-7, IL-8 e IP-10) estaban más elevadas en comparación con los pacientes con sífilis ocular. Algunas de las citocinas elevadas, son

responsables del desarrollo de diferentes grupos celulares (G-CSF e IL-7), otras son quimiocinas principalmente pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-8 e IP-10) y algunas anti-inflamatorias (IL-10).

La presencia de esta última citocina (IL-10), podría ser reflejo de un intento por controlar la inflamación causada por la retinitis por CMV asociada a la desviación inmune de la cámara anterior (anterior chamber immune deviation/ACAID) [15].

A diferencia del plasma, en el HA de los pacientes con retinitis por CMV, encontramos que las citocinas GM-CSF, IL-1 $\alpha$  e IP-10, se encontraban más elevadas que en los pacientes con sífilis ocular. Esto sugiere que la respuesta, dependiente de monocitos y macrófagos, es más potente en pacientes con retinitis por CMV que en aquellos con sífilis al momento de la infección ocular.

Estos hallazgos son similares a lo reportado por Lahmar, I et al, que observaron niveles elevados de GM-CSF e IL-1 en el HA de pacientes con uveítis virales. [36].

Scholz et al, ha propuesto que los niveles elevados de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  podrían contribuir a la persistencia de la retinitis por CMV, con la consecuente destrucción de la retina ya que se ha visto que el CMV permanece latente en las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) y que tanto TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , sensibilizan a estas células para desarrollar apoptosis mediada por FasL [37]. Nosotros no encontramos diferencias

en el HA en las concentraciones basales de estas dos citocinas al momento de la infección ocular entre los pacientes con sífilis ocular y retinitis por CMV, sin embargo, la disminución en la concentración de ambas citocinas posterior al tratamiento fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con retinitis por CMV. Llama la atención, que IFN- $\gamma$  se encontró con mayor elevación en el plasma de los pacientes con retinitis por CMV a diferencia del grupo con sífilis ocular antes del tratamiento (mediana = 6.22 versus 3.84,  $p = 0.003$ ).

Algunos autores sugieren que los niveles elevados de IFN- $\gamma$  en el HA o vítreo, podrían contribuir con el curso clínico de los pacientes con necrosis retiniana asociada a virus herpes zoster [38]. Nosotros no encontramos niveles elevados de IFN- $\gamma$  en el HA basal de los pacientes (pero sí en plasma) con retinitis por CMV a diferencia de los pacientes con sífilis ocular, sin embargo, si encontramos diferencias significativas en la concentración de IP-10. El IP-10 en el humor acuoso es producido localmente por linfocitos T que migran de la sangre al ojo y se ha mencionado que los niveles de IP-10 en el HA, están relacionados con el estadio clínico de la enfermedad. Esto sugiere un rol patogénico de IP-10 en el reclutamiento de células T activadas hacia el ojo en pacientes con uveítis así como el papel crítico que juegan las células en la patogénesis de las uveítis, migrando estas células hacia sitios inflamados con alta producción de IFN- $\gamma$  [39]. Con lo anterior, es entendible que en nuestro grupo de pacientes con retinitis por CMV encontramos una mayor concentración de IP-10 a diferencia del grupo de sífilis ocular.

Iyer et al, en un estudio transversal en pacientes con retinitis por CMV asociada a VIH, también observaron una respuesta mediada por linfocitos y monocitos/macrófagos,



con elevación de IP-10, fractalkina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor/PDGF-AA), G-CSF, Flt-3L y MCP-1 en el HA [40]. Nosotros encontramos resultados similares en cuanto al comportamiento de IP-10 y MCP-1 encontrando también niveles más elevados de IFN-2 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y G-CSF en el HA de los pacientes con retinitis por CMV a diferencia del grupo de sífilis ocular al momento de compararlas con el grupo control (catarata); por otro lado, solamente IL-10 se encontraba más elevada en el HA del grupo con sífilis ocular al compararla con el grupo control.

Al comparar las concentraciones basales plasmáticas de los pacientes con sífilis ocular, encontramos niveles menores de G-CSF, IFN-2 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-7, IL-8 e IP-10 a diferencia de los pacientes con retinitis por CMV. En el HA basal, observamos niveles menores de GM-CSF, IL-1 $\alpha$  e IP-10 en el grupo de sífilis ocular en comparación con el grupo de pacientes con retinitis por CMV. La mayor concentración de citocinas en el grupo de retinitis por CMV nos hace suponer que estas son en parte responsables de una mayor destrucción de la retina .

La mayor elevación de ciertas citocinas (IP-10, IL-10 y MCP-1) en el plasma basal de los pacientes con retinitis por CMV a diferencia del grupo con sífilis ocular y el control, nos muestra una mayor respuesta pro y anti inflamatoria a nivel periférico.

En cuanto al comportamiento de las citocinas posterior al tratamiento específico, en plasma, los pacientes con retinitis por CMV tuvieron una reducción significativa de IL-10, la cual tiene función anti-inflamatoria. En el HA, disminuyeron varias citocinas/quimiocinas proinflamatorias: eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN-2 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 ,

IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . En el HA de los pacientes con sífilis ocular, varias citocinas y quimiocinas (eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IP -10, MCP-1 y MIP-1 $\alpha$ ), tuvieron una reducción significativa post-tratamiento.

Cuando comparamos la mediana del cambio (pre tratamiento – post tratamiento = delta) en el HA de los pacientes con retinitis por CMV en comparación con los pacientes con sífilis ocular, encontramos que el IFN-2 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  estaban más elevadas en los pacientes con retinitis por CMV al momento del diagnóstico de la infección ocular, con una mayor disminución post-tratamiento que en los pacientes con sífilis ocular; en contraste, IL-10 e IFN-2 $\alpha$  en plasma de los pacientes con retinitis por CMV, mostraron una disminución, en comparación con el aumento en los pacientes con sífilis ocular post-tratamiento; esto contrasta con lo reportado por Knudsen et al, quien menciona que existe una disminución de IL-10 plasmática posterior al tratamiento específico en pacientes con sífilis. [41]

Estas variaciones en las concentraciones de citocinas podrían deberse a lo que ya ha sido sugerido por otros autores quienes han observado cambios en los niveles de citocinas durante las primeras horas posteriores a una infección, sugiriendo que existe un balance dinámico entre las diferentes citocinas dependiente del tiempo de evolución y la severidad de la enfermedad [42].

Todos nuestros hallazgos sugieren que al dar un tratamiento sistémico específico para el control de una infección ocular, provoca también un descenso en los niveles de

diversos grupos de citocinas anti-inflamatorias, inmunomoduladoras y citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y factores estimulantes, principalmente en el HA de los pacientes con VIH e infección ocular.

Al momento de comparar el HA de los pacientes con VIH e infección ocular con el grupo control (pacientes sometidos a cirugía de catarata), varias citocinas se encontraban por debajo de su límite de detección, tales como: IL-12p70, IL-17 y RANTES; las únicas citocinas por debajo de sus límites de detección en el HA del grupo control fueron: IFN- $2\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-2, y TNF $\alpha$ , a diferencia del grupo de pacientes con VIH e infección ocular. Las bajas concentraciones de IL-10 pueden explicarse debido a que en el grupo control no hay una infección ocular activa y que por ello no se necesita del efecto regulador anti-inflamatorio de esta citocina.

En el HA, citocinas (GM-CSF, G-CSF, IFN- $\gamma$ , IFN- $2\alpha$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6 y TNF $\alpha$ ) y quimiocinas (eotaxina, IP-10, MCP-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ) se encontraban elevadas en los pacientes con VIH al momento del diagnóstico de la infección ocular a diferencia del grupo control. El perfil que predomina en el HA es pro-inflamatorio con varias quimiocinas lo cual sugiere que la producción de éstas es llevado a cabo a nivel intraocular reforzado además por la presencia de diversos factores estimulantes hematopoyéticos (GM-CSF and G-CSF).

Encontramos una respuesta  $T_H2$  reducida en los pacientes con VIH e infección ocular (HA y plasma) y en ambos grupos control (HA y plasma) basados en que IL-12p40, IL-4 e IL-5 se encontraban por debajo de sus límites de detección.

En el plasma de pacientes con VIH e infección ocular encontramos elevadas IL-10, IL-1 $\alpha$ , IP-10, MCP-1, RANTES y TNF- $\alpha$  en comparación con el grupo control. Una diferencia similar fue encontrada entre los niveles de quimiocinas en el HA en comparación con la sangre periférica en pacientes con uveítis no Infecciosas [16]. Interesantemente, RANTES se encontraba más elevada solamente en el plasma de los pacientes con VIH e infección ocular, a diferencia de lo observado en el plasma del grupo control y en los humores acuosos, en quienes se encontraba por debajo del límite de detección. Es importante mencionar que TNF- $\alpha$ , RANTES, IL-1 $\alpha$ , IL-6, e IL-7 sólo se encontraban elevadas en el plasma de los pacientes con retinitis por CMV en comparación con el grupo de sífilis ocular. Estos resultados podrían explicarse como por un intento de inmunomodulación a través de RANTES e IL-10 en los pacientes con VIH e infección ocular, principalmente viral, de acuerdo con lo descrito en la desviación inmune asociada a la cámara anterior (ACAID) [15].

Un estudio llevado a cabo en ratones en quienes se provocaba experimentalmente uveítis autoinmune, reportó que los macrófagos oculares eran los principales productores de RANTES así como los encargados de la regulación de la inflamación, siendo además esta citocina probablemente la responsable del reclutamiento de los linfocitos T CCR5+ CD8+ hacia el sitio de inflamación [43].

Esto puede explicar en parte la severidad de la inflamación que nosotros encontramos a nivel intraocular en nuestros pacientes con VIH e infección ocular, ya que la ausencia de RANTES en el HA podría facilitar la presencia de una respuesta pro-inflamatoria dada la falta de acción inmunomoduladora de ésta citocina. La ausencia de RANTES en el HA de nuestros pacientes con VIH e infección ocular contrasta con lo encontrado en pacientes con uveítis anterior aguda [42].

Más investigaciones deben realizarse para analizar si RANTES se comporta de la misma manera en el HA en otras infecciones oculares en pacientes sin VIH o nuestros hallazgos están relacionados a la patología sistémica inmunosupresora (VIH) o se debe a que la respuesta en el HA depende de un estímulo antigénico específico como ya ha sido mencionado por otros autores [10], [44].

Algunos autores han encontrado concentraciones elevadas de MCP-1, IL-8 y RANTES en muestras de pacientes con uveítis. Este hallazgo es consistente con nuestros resultados ya que tuvimos concentraciones elevadas de IL-8 and MCP-1 (ambas con un papel quimiotáctico y pro inflamatorio) [45]. En nuestro estudio, los niveles de IL-8 en plasma no mostraron diferencia entre el grupo de pacientes con VIH e infección ocular al compararlos con el grupo control pero sí encontramos niveles elevados de IL-8 en el HA de nuestros pacientes con VIH e infección ocular al compararlos con el grupo control. Estos resultados concuerdan con lo observado por otros autores y podrían explicarse debido a que esta citocina es producida a nivel intraocular por los procesos ciliares [46]. Recientemente se reportó que posterior a múltiples inyecciones de ganciclovir intravítreo, existe un descenso continuo de IL-8 en el HA de pacientes con retinitis por CMV [47].

Varios estudios muestran diferentes resultados en cuanto a los niveles de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-6 en el HA de uveítis infecciosas y no infecciosas [27, 28, 31, 48-50]. En cuanto a esto, nosotros encontramos altas concentraciones de IL-10 en el HA y plasma de los pacientes con VIH e infección ocular en comparación con los controles. También, IFN- $\gamma$  e IFN-2 $\alpha$  estuvieron presentes en menores concentraciones en el plasma de nuestros pacientes con VIH e infección ocular en contraste con el grupo control pero con mayores concentraciones en el HA de los pacientes con VIH e infección ocular y a su vez, ambos interferones, mostraron una mayor concentración en el plasma de los pacientes con retinitis por CMV con una mayor reducción post tratamiento a diferencia del grupo con sífilis ocular (Tabla VII y VIII).

Las medianas de las citocinas que estaban por debajo de su límite de detección en el plasma de los pacientes con VIH al momento del diagnóstico de la infección ocular fueron: IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-5, MIP-1 $\alpha$  y TNF $\beta$ . Una posible explicación de éstos resultados podría ser el estado inmunosupresor asociado al VIH.

Más estudios que incluyan a un grupo de pacientes con VIH sin infección oportunista ocular podrían ayudar a determinar si lo encontrado en el plasma está asociado a la infección ocular o a la infección por VIH.

Las lipoproteínas del treponema aumentan la expresión de CCR5 y disminuyen la de CXCR4 (ambos receptores de quimiocinas, para RANTES y SDF-1 respectivamente). Esta diferencia, presente en los macrófagos de las úlceras genitales y en los linfocitos T

CD4, favorece la transmisión del VIH y a su vez, podría explicar porque los pacientes con sífilis adquieren fácilmente el VIH [51] [52].

El chancro presente en la sífilis es una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), la cual es muy efectiva para la eliminación de los treponemas en el sitio de la lesión. La DTH depende del infiltrado de linfocitos T, los cuales, se encuentran deficientes en los pacientes con VIH, aunque también puede haber una deficiencia en la producción de citocinas proinflamatorias o en el número y/o función de los macrófagos [53]. En pacientes VIH+ los resultados para VDRL y FTAabs pueden salir alterados por el deterioro en el estado inmunológico [6].

El reconocimiento de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) es iniciada por los macrófagos y las células dendríticas (DC) a través de los receptores Toll-like, los cuales estimulan la producción de citocinas tales como IL-12 y TNF $\alpha$ . Posteriormente, IL-12 activa la respuesta T<sub>H</sub>1 de la inmunidad adaptativa con secreción de IFN- $\gamma$ . Altas concentraciones de IL-12, TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  son la característica de una infección activa por tuberculosis [54]. En pacientes con uveítis asociada a tuberculosis, han sido reportados niveles elevados en el HA de IL-6, IL-8, monocina inducida por interferón-gamma (MIG, quimio atrayente de linfocitos T) y de IP-10 a diferencia de lo encontrado en pacientes con uveítis idiopática. Esto sugiere que los pacientes con uveítis y tuberculosis que responden al tratamiento contra *Mycobacterium tuberculosis* no es porque tengan una infección activa a nivel intraocular sino que se trata de una respuesta autoinmune con reacción inflamatoria a nivel ocular, disparada por la tuberculosis [55]. En nuestro estudio, incluimos cinco pacientes con granulomas coroides asociados a

infección diseminada por tuberculosis, sin inflamación en la cámara anterior ni en el vítreo por lo cual, solo medimos citocinas en el plasma y no en el HA; nosotros no encontramos diferencias en los niveles de citocinas o algún patrón específico de citocinas en el plasma de éste grupo, lo cual, puede deberse a la poca cantidad de pacientes.

Nuestros resultados sugieren que el perfil de citocinas en el plasma está compuesto por quimiocinas, citocinas  $T_H1$ , citocinas  $T_H2$ , factores de estimulación y antivirales, y no parece que estén agrupadas en una sola función en nuestros pacientes con VIH e infección ocular, siendo similar a lo encontrado en el grupo control (Figura 5). Nosotros sólo encontramos una tendencia hacia un perfil  $T_H1$  en el HA de nuestros pacientes con VIH e infección ocular diferente a lo encontrado en el HA de grupo control y a su vez, con diferencias en las concentraciones de algunas citocinas en el grupo de pacientes con retinitis por CMV y sífilis ocular. No encontramos evidencia de una respuesta del tipo  $T_H17$  en nuestros pacientes.

Existen varias teorías que proponen que, conforme progresa la infección por VIH, se da un remplazo en la respuesta  $T_H1$  por  $T_H2$ , con la consecuente reducción en la inmunidad celular anti-VIH [2]. Nosotros encontramos una débil respuesta de tipo  $T_H2$  (dada principalmente por la presencia de IL-10) en nuestros pacientes con VIH e infección oportunista ocular, a pesar de que los pacientes con retinitis por CMV, se encontraban en un estadio avanzado de la enfermedad con severa inmunosupresión. Es conocido que en pacientes con VIH hay una disminución en los linfocitos T  $CD4+$  productores de IL-2 e IFN- $\gamma$ , así como un incremento en los productores de IL-4 e IL-10; por otro lado, el TNF- $\alpha$  e IL-2 inducen y mantienen la replicación del VIH. Recientemente, se observó una



asociación entre la infección por VIH y el aumento de la carga viral con la elevación de IL-10, disminuyendo ésta última con la administración de fármacos antiretrovirales [56].

En nuestro estudio no pudimos obtener un suficiente número de pacientes con las otras 3 patologías oculares asociadas a VIH (sólo cinco pacientes con MTB diseminada y granulomas coroideos, un paciente con HZO y un paciente con hipopion asociada a criptococosis diseminada). Por esta razón, nos enfocamos a la descripción y comparación de las concentraciones de citocinas en las dos principales patologías oculares con el mayor número de pacientes (retinitis por CMV y sífilis ocular) con infección por VIH.

Otra limitante de nuestro estudio fue la falta de un grupo control para el HA de pacientes que tuvieran VIH pero sin infección ocular; debido a las implicaciones éticas, nuestro estudio control para el HA fueron pacientes que iban a ser sometidos a cirugía de catarata senil, sin ninguna otra patología ocular o sistémica y nuestro grupo control para el plasma fueron pacientes con edad similar a nuestros pacientes con VIH. Estamos conscientes sin embargo, que la diferencia en la mediana de edad entre los grupos de HA (VIH=33 años y catarata senil=65 años), puede afectar la concentración de diferentes citocinas. Nosotros no tuvimos ningún efecto adverso (catarata, endoftalmitis, hiphema) asociado a la toma de muestras de HA [57].

Con todo lo anterior, podemos hipotetizar porqué aunque una pequeña área de retina está infectada por CMV (retinitis) y a pesar de la ausencia de inflamación clínica en

comparación con los pacientes con sífilis ocular, el daño es tan severo en los pacientes con retinitis por CMV, causando la destrucción de todas las capas retinianas y agujeros que pueden promover no solo la presencia de desprendimiento de retina sino también la liberación y migración de auto antígenos así como de citocinas (que favorecen aún más una respuesta pro-inflamatoria), múltiples quimiocinas y factores inmunes que perpetúan el daño inflamatorio intraocular.

Ante la necesidad de controlar la respuesta inflamatoria localizada y con la finalidad de preservar la visión, se ha propuesto la inyección intravítrea de varios medicamentos anti- TNF- $\alpha$  para uveítis no infecciosas crónicas con buenos resultados [58], [59]. También en la actualidad contamos con diversos tratamientos enfocados en diversas citocinas [60, 61], [62], [63], [64], [65], [66], [67], [68], [69], [70], [71], [72].

El conocer las diferentes y múltiples citocinas que están involucradas en la patogénesis de las infecciones intraoculares en los pacientes con VIH, tiene importantes implicaciones para el desarrollo futuro de nuevas drogas dirigidas contra éstas citocinas. Más investigaciones sobre este tema deben realizarse. Nosotros demostramos la reducción significativa de varias citocinas y quimiocinas de manera simultánea en pacientes con retinitis por CMV y sífilis ocular posterior al tratamiento sistémico específico para cada patología ocular asociado a mejoría clínica. Futuros tratamientos deben enfocarse en encontrar alguna droga para uso intravítreo que pueda reducir de manera simultánea múltiples citocinas que están involucradas en la destrucción de las estructuras oculares en este grupo de pacientes.

## **Conclusiones**

El entendimiento de la fisiopatología y del papel que juegan las citocinas en pacientes con VIH e infecciones oportunistas oculares asociadas severas, es fundamental para proponer nuevos tratamientos enfocados hacia las citocinas involucradas. En el presente estudio, se corrobora la disminución simultánea de varias quimiocinas y citocinas pro inflamatorias (principalmente respuesta  $T_H1$ ) posterior al tratamiento específico en el humor acuoso de pacientes con VIH e infección oportunista ocular asociada. Hasta nuestro conocimiento, esta disminución simultánea en pacientes con retinitis por CMV y sífilis ocular, no había sido demostrada. Con lo anterior, los futuros tratamientos, deben enfocarse a tener efecto en varias citocinas a nivel intraocular de manera simultánea.

## Referencias

1. UNAIDS, J.U.N.P.o.H.A., *Global Report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013*. WHO-Library Cataloguing-in-Publication Data, 2013. UNAIDS / JC2502 / 1 / E: p. 1-198.
2. Levy, J., *El VIH y la patogénesis el SIDA. El VIH y la patogénesis el SIDA*. 1a. edición. Fondo de Cultura Económica, INER, 2008.
3. Vrabec, T., *Posterior segment manifestations of HIV/AIDS*. Survey of Ophthalmology, 2004. 49(2): p. 131-57.
4. Gariano, R., Leland SR, Freeman WR., *Ocular examination and diagnosis in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome*. West J Med, 1993. 158: p. 254-262.
5. Jabs, D.A., et al., *Longitudinal Study of the Ocular Complications of AIDS*. Ophthalmology, 2007. 114(4): p. 780-786.e3.
6. Browning, D.J., *Posterior Segment Manifestations of Active Ocular Syphilis, Their Response to a Neurosyphilis Regimen of Penicillin Therapy, and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Status on Response*. Ophthalmology, 2000(107): p. 2015-2023.
7. Babu, R.B., et al., *Ocular Tuberculosis in Acquired Immunodeficiency Syndrome*. American Journal of Ophthalmology, 2006. 142(3): p. 413-418.e2.
8. Kaufman P, A.A., *Adler's Physiology of the Eye*. 10nd , revised edition ed, ed. I. Mosby, and Elsevier.2004.
9. Niederkorn JY, K.H., *Immune Response and the Eye*, ed. r.e. Karger. 2nd. Vol. 92. 2007.
10. Ferguson, T.A. and J.M. Herndon, *The Immune Response and the Eye: The ACAID Inducing Signal Is Dependent on the Nature of the Antigen*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1994. 35: p. 3085-3093.
11. McKenna, K.C. and J.A. Kapp, *Ocular Immune Privilege and CTL Tolerance*. Immunologic Research, 2004. 29/1-3: p. 103-111.
12. Niederkorn, J.Y., *Emerging concepts in CD8+ T regulatory cells*. Current Opinion in Immunology, 2008. 20(3): p. 327-331.
13. Zheng, S.G., et al., *An Intracameral Injection of Antigen Induces In Situ Chemokines and Cytokines Required for the Generation of Circulating Immunoregulatory Monocytes*. PLoS ONE, 2012. 7(8): p. e43182.
14. Mochizuki, M., S. Sugita, and K. Kamoi, *Immunological homeostasis of the eye*. Progress in Retinal and Eye Research, 2013. 33: p. 10-27.
15. Hori, J., *Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation*. Journal of Ocular Biology, Diseases, and Informatics, 2008. 1(2-4): p. 94-100.
16. Takase, H., *Capacity of ocular infiltrating T helper type 1 cells of patients with non-infectious uveitis to produce chemokines*. British Journal of Ophthalmology, 2006. 90(6): p. 765-768.
17. Greiner K, A.R., *The role of cytokines for the diagnosis of uveitis*. Klin Monbl Augenheilkd, 2008. 225(6): p. 564-9.
18. Maier, R., et al., *Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients*. Molecular Vision, 2008(14): p. 637-643.
19. Mojca Globocnik Petrovic, M., P. Peter Korosec, Mitja Kosnik, MD, PhD., and M. and Marko Hawlina, PhD, *Vitreous Levels of Interleukin-8 in Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy*. American Journal of Ophthalmology, 2007. 143(1): p. 175-176.

20. Hamid, M.A.A., et al., *Serum Levels of Interleukin-12 and TNF-Alpha Predict Non Proliferative Diabetic Retinopathy in Type-1 Diabetic Patients*. Research Journal of Medicine and Medical Sciences, 2009. 4(2): p. 340-344.
21. Yoshimura, T., et al., *Comprehensive Analysis of Inflammatory Immune Mediators in Vitreoretinal Diseases*. Plos ONE 2009. 4(12): p. 1-9.
22. Forooghian, F., et al., *Alterations in the Intraocular Cytokine Milieu after Intravitreal Bevacizumab*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2010. 51(5): p. 2388-2392.
23. Yoshihiro Wakabayashi, M., Yoshihiko Usui, MD, Yoko Okunuki, MD, Takeshi Kezuka, MD, Masaru Takeuchi, MD, Hiroshi Goto, MD, Takuya Iwasaki, MD. , *Correlation of Vascular Endothelial Growth Factor with Chemokines in the Vitreous in Diabetic Retinopathy*. Retina, 2010. 30: p. 339-344.
24. Chui Ming Gemmy Cheung, et al., *Comparison of aqueous humor cytokine and chemokine levels in diabetic patients with and without retinopathy*. Molecular Vision, 2012. 18(18): p. 830-837.
25. Noma, H., H. Funatsu, and T. Mimura, *Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-6 are Correlated With Serous Retinal Detachment in Central Retinal Vein Occlusion*. Current Eye Research, 2012. 37(1): p. 62-67.
26. Ooi, K., et al., *Cytokines and Chemokines in Uveitis - Is there a Correlation with Clinical Phenotype?* Clinical Medicine & Research, 2006. 4(4): p. 294-309.
27. Ooi, K.G.-J., et al., *Multiplex Cytokine Detection versus ELISA for Aqueous Humor: IL-5, IL-10, and IFN $\gamma$  Profiles in Uveitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006(47): p. 272-277.
28. van Kooij, B., et al., *Distinct Cytokine and Chemokine Profiles in the Aqueous of Patients With Uveitis and Cystoid Macular Edema*. American Journal of Ophthalmology, 2006. 142(1): p. 192-194.
29. Matthias D. Becker, M., PhD, FEBOa,b,\* , Per A. Dullforce, PhDa,c,, P. Tammy M. Martin, c, Justine R. Smith, MBBS, PhD, FRACOa,, and P. Stephen R. Planck, d,e, James T. Rosenbaum, MDa,d,e, *Immune mechanisms in uveitis What can be learned from in vivo imaging?* Ophthalmology Clinics of North America, 2002(15): p. 259–270.
30. Ohta, K., et al., *IL-6 Antagonizes TGF- $\beta$  and Abolishes Immune Privilege in Eyes with Endotoxin-Induced Uveitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000(41): p. 2591-2599.
31. Curnow, S.J., *Multiplex Bead Immunoassay Analysis of Aqueous Humor Reveals Distinct Cytokine Profiles In Uveitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005. 46(11): p. 4251-4259.
32. Sharma, R.K., A.T. Rogojina, and K.V. Chalam, *Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor*. Molecular Vision, 2009(15): p. 60-69.
33. Francois Husson, J.J., Sebastien Le and Jeremy Mazet *FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining with R. R package version 1.25*.  
. 2013.
34. Josse, F.H.a.J., *missMDA: Handling missing values with/in multivariate data analysis (principal component methods). R package version 1.7.2*.  
. 2013.
35. J Panchapakesan, P.M., K Tumuluri, E Rochtchina, S Foran, R G Cumming., *Five year incidence of cataract surgery: the Blue Mountains Eye Study*. British Journal of Ophthalmology, 2003. 87: p. 168-172.
36. Lahmar, I., et al., *Cytokine Profiles in Toxoplasmic and Viral Uveitis*. The Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(8): p. 1239-1249.

37. Scholz M, D.H., Cinatl J., *Human cytomegalovirus retinitis: pathogenicity, immune evasion and persistence*. Trends Microbiol, 2003. 11(4): p. 171-8.
38. Abe T, S.M., Saigo Y, Tamai M, *Interferon gamma expression and clinical features in patients with acute retinal necrosis syndrome*. Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2003. 241(12): p. 982-7.
39. Abu El-asrar, A.M., et al., *Chemokines and gelatinases in the aqueous humor of patients with active uveitis*. American Journal of Ophthalmology, 2004. 138(3): p. 401-411.
40. Iyer, J.V., et al., *Cytokine analysis of aqueous humor in HIV patients with cytomegalovirus retinitis*. Cytokine, 2013.
41. Knudsen A, B.T., Kofoed K., *Cytokine expression during syphilis infection in HIV-1-infected individuals*. Sexually Transmitted Diseases, 2009. 36(5): p. 300-4.
42. Verma MJ, L.A., Rager H, Strieter R, Kunkel S, Taub D, Wakefield D., *Chemokines in acute anterior uveitis*. Current Eye Research, 1997. 16(12): p. 1202-8.
43. Sonoda, K.-H., et al., *Immunoregulatory Role of Ocular Macrophages: The Macrophages Produce RANTES to Suppress Experimental Autoimmune Uveitis*. The Journal of Immunology, 2003. 171: p. 2652-2659.
44. Lima Vallochi, A., et al., *Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly*. Clinical Ophthalmology, 2008. 2(4): p. 837-848.
45. Tuaille N., et al., *MCP-1 Expression in Endotoxin-Induced Uveitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2002(43): p. 1493-1498.
46. Ghasemi, H., et al., *Roles of IL-8 in Ocular Inflammations: A Review*. Ocular Immunology and Inflammation, 2011. 19(6): p. 401-412.
47. Wag B, T.B., Tao Y, Hou J, Zhao XT, Li XX, *Continued Decline of Aqueous Interleukin-8 After Multiple Intravitreal Injections of Ganciclovir for Cytomegalovirus Retinitis*. J Ocul Pharmacol Ther, 2014 May 29. [Epub ahead of print].
48. Takase, H., *Cytokine Profile in Aqueous Humor and Sera of Patients with Infectious or Noninfectious Uveitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. 47(4): p. 1557-1561.
49. Calder, V., et al., *Increased CD4+ Expression and Decreased IL-10 in the Anterior Chamber in Idiopathic Uveitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1999. 40: p. 2019-2024.
50. Hill, T., et al., *Intracellular T lymphocyte cytokine profiles in the aqueous humour of patients with uveitis and correlation with clinical phenotype*. Clinical and Experimental Immunology, 2005. 139(1): p. 132-137.
51. Sellati, T.J., et al., *Virulent Treponema pallidum, Lipoprotein, and Synthetic Lipopeptides Induce CCR5 on Human Monocytes and Enhance Their Susceptibility to Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. 181: p. 283-93.
52. Funnyé, A.S., A.J. Akhtar, and V. Dip, *Syphilis and Human Immunodeficiency Virus Co-Infection*. Journal of The National Medical Association, 2003. 95(5): p. 363-382.
53. Tseng, C.K., et al., *Syphilis Superinfection Activates Expression of Human Immunodeficiency Virus I in Latently Infected Rabbits*. American Journal of Pathology, 1991. 138(5): p. 1149-1164.
54. Oliver, Benjamin G., et al., *Mediators of Innate and Adaptive Immune Responses Differentially Affect Immune Restoration Disease Associated with Mycobacterium tuberculosis in HIV Patients Beginning Antiretroviral Therapy*. The Journal of Infectious Diseases, 2010. 202(11): p. 1728-1737.
55. Ang, M., et al., *Aqueous cytokine and chemokine analysis in uveitis associated with tuberculosis*. Molecular Vision, 2012(18): p. 565-573.

56. Brockman, M.A., et al., *IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells*. *Blood*, 2009. 114(2): p. 346-356.
57. Campochiaro, P.A., et al., *Monitoring Ocular Drug Therapy by Analysis of Aqueous Samples*. *Ophthalmology*, 2009. 116(11): p. 2158-2164.
58. Farvardin, M., et al., *Intravitreal Infliximab for the treatment of sight-threatening chronic noninfectious uveitis*. *Retina*, 2010(30): p. 1530-1535.
59. Hun Bae, J. and S. Chul Lee, *Effect of intravitreal methotrexate and aqueous humor cytokine levels in refractory retinal vasculitis in Behcet Disease*. *Retina*, 2011.
60. Smolin, G., *Biosynthetic human interferon treatment of herpetic keratitis*. *Tr. Am. Ophth. Soc.*, 1983. LXXXI: p. 785-824.
61. Chou, S., et al., *Alpha-Interferon Administration in Cytomegalovirus Retinitis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984. 25(1): p. 25-28.
62. Vilček, J. and M. Feldmann, *Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2004. 25(4): p. 201-209.
63. Yang, C.H., *Effects of the NF- $\kappa$ B Inhibitor Pyrrolidine Dithiocarbamate on Experimentally Induced Autoimmune Anterior Uveitis*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2005. 46(4): p. 1339-1347.
64. Cai, S. and B. Curtis, *Induction of interleukin-6 in human retinal epithelial cells by an attenuated Herpes simplex virus vector requires viral replication and NF $\kappa$ B activation*. *Experimental Eye Research*, 2008. 86(2): p. 178-188.
65. Oh-i, K., et al., *Intravitreal injection of Tacrolimus (FK506) suppresses ongoing experimental autoimmune uveoretinitis in Rats*. *British Journal of Ophthalmology*, 2007. 91(2): p. 237-242.
66. Bousquet, E., et al., *Protective Effect of Intravitreal Administration of Tresperimus, an Immunosuppressive Drug, on Experimental Autoimmune Uveoretinitis*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2011. 52(8): p. 5414-5423.
67. Palmer, D.C. and N.P. Restifo, *Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function*. *Trends in Immunology*, 2009. 30(12): p. 592-602.
68. Yu, C.R., et al., *Suppressor of Cytokine Signaling-1 (SOCS1) Inhibits Lymphocyte Recruitment into the Retina and Protects SOCS1 Transgenic Rats and Mice from Ocular Inflammation*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2011. 52(9): p. 6978-6986.
69. Salek-Ardakani, S. and M. Croft, *Tumor Necrosis Factor Receptor/Tumor Necrosis Factor Family Members in Antiviral CD8 T-Cell Immunity*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2010. 30(4): p. 205-218.
70. Raja, H., et al., *Effect of Intravitreal Methotrexate and Rituximab on Interleukin-10 Levels in Aqueous Humor of Treated Eyes with Vitreoretinal Lymphoma*. *PLoS ONE*, 2013. 8(6): p. e65627.
71. Adamus, G., et al., *A Promising Therapeutic Approach for Treatment of Posterior Uveitis: Recombinant T Cell Receptor Ligand Protects Lewis Rats from Acute and Recurrent Experimental Autoimmune Uveitis*. *Ophthalmic Research*, 2010. 44(1): p. 24-33.
72. Piccinini, A.M., et al., *Rationally Evolving MCP-1/CCL2 into a Decoy Protein with Potent Anti-inflammatory Activity in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. 285(12): p. 8782-8792.