



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CUANTIFICACIÓN DEL GEN DEL DNA RIBOSOMAL
BACTERIANO 16S (16S rDNA) EN PLASMA DE INDIVIDUOS
INFECTADOS CON EL VIRUS DE INMUNIDEFICIENCIA HUMANA
(VIH) MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
MONSERRAT CHÁVEZ TORRES**



Ciudad Universitaria, CD.MX.

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA
PARRA

VOCAL: Profesor: ROCÍO GABRIELA TIRADO MENDOZA

SECRETARIO: Profesor: SANDRA MARÍA PINTO CARDOSO

1er. SUPLENTE: Profesor: GABRIELA LÓPEZ HERRERA

2° SUPLENTE: Profesor: TANYA PLETT TORRES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS, INSTITUTO
NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sandra María Pinto Cardoso

SUSTENTANTE:

Montserrat Chávez Torres

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| ÍNDICE GENERAL | 2 |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 7 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 10 |
| <i>CAPÍTULO I. RESUMEN</i> | 11 |
| <i>CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN</i> | 12 |
| 1. Generalidades sobre el Virus de Inmunodeficiencia Humana y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido | 12 |
| 1.1 Epidemiología de Virus de Inmunodeficiencia Humana y del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido..... | 12 |
| 1.2 Genoma del VIH | 13 |
| 1.3 Curso de la infección por VIH..... | 13 |
| 1.4 Ciclo de Replicación..... | 15 |
| 1.5 Tratamiento Antiretroviral | 15 |
| 2. Translocación bacteriana en la infección por VIH | 17 |
| 2.1 Tracto gastrointestinal en la infección por VIH | 17 |
| 2.2 Microbiota del tracto gastrointestinal | 17 |
| 2.3 Disbiosis de la microbiota del TGI | 18 |
| 2.4 Disbiosis de la microbiota en la infección por VIH | 19 |
| 2.5 Translocación bacteriana a nivel de TGI y activación inmune crónica en la infección por VIH | 21 |
| 2.6 TAR y translocación bacteriana | 23 |
| 2.7 Biomarcadores de translocación bacteriana y de progresión de la infección por VIH | 25 |
| 2.7.1 Cuantificación del gen 16S rDNA en plasma..... | 27 |
| <i>CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN</i> | 34 |
| <i>CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS</i> | 35 |
| <i>CAPÍTULO V. OBJETIVOS</i> | 36 |
| Objetivo general | 36 |
| Objetivos particulares..... | 36 |
| <i>CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS</i> | 37 |
| 1. Cohorte de Estudio | 37 |
| 2. Recolección de plasma de sangre periférica | 38 |

| | | |
|---|--|----|
| 3. | Extracción de DNA de muestras de plasma | 38 |
| 4. | Precipitación de DNA | 39 |
| 5. | Cuantificación del DNA extraído..... | 39 |
| 6. | Cuantificación del gen del DNA ribosomal 16S (16S rDNA) por PCR en tiempo real 39 | |
| 6.1 | Condiciones de PCR en tiempo real | 41 |
| 6.2 | Generación de la Curva Estándar..... | 42 |
| 6.3 | Estandarización de la PCR en tiempo real..... | 45 |
| 6.4 | Cuantificación del gen 16S rDNA en la cohorte de estudio..... | 45 |
| 7. | Cuantificación de marcadores de translocación microbiana (CD14s) y de daño al epitelio intestinal (I-FABP)..... | 45 |
| 8. | Análisis estadístico..... | 46 |
| <i>CAPÍTULO VII. RESULTADOS.....</i> | | 47 |
| 1. | PCR en tiempo real: Estandarización y Generación de la Curva Estándar..... | 47 |
| 2. | Características clínicas de la cohorte de estudio..... | 50 |
| 2.1 | Características de la cohorte transversal | 50 |
| 2.2 | Características de la cohorte longitudinal..... | 56 |
| 2.3 | Cuantificación del Gen 16S rDNA en plasma de la cohorte de estudio | 59 |
| 2.4 | Cuantificación de CD14s en plasma de la cohorte de estudio..... | 59 |
| 2.5 | Cuantificación de I-FABP en plasma de la cohorte de estudio | 60 |
| 2.6 | Asociación de la recuperación linfocitaria con niveles del Gen 16S rDNA en TAR de larga duración y con el marcador CD14s sin TAR..... | 64 |
| <i>CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN</i> | | 67 |
| <i>CAPÍTULO IX. CONCLUSIÓN</i> | | 72 |
| <i>CAPÍTULO X. BIBLIOGRAFÍA</i> | | 73 |
| <i>ANEXO 1. PROTOCOLO “B36-12” APROBADO POR EL COMITÉ DE CIENCIAS Y BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS (INER)</i> | | 79 |
| <i>ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</i> | | 80 |

LISTADO DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|---|
| 16S rDNA | Gen del DNA ribosomal bacteriano 16S |
| ARs | Antirretrovirales |
| ATV | Atazanavir |
| CD14s | CD14 soluble |
| CENSIDA | Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el sida |
| C_T | Ciclo umbral (en inglés) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EFV | Efavirenz |
| ELISA | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FTC | Emtricitabina |
| GALT | Tejido linfoide asociado a intestino |
| gp | Glicoproteína |
| HBV | Virus de Hepatitis B |
| HCV | Virus de Hepatitis C |
| I-FABP | Proteína de unión de ácidos grasos intestinal (en inglés) |
| IN | Integrasa |
| INN | Inhibidores de integrasa |

| | |
|--------------|---|
| INNTR | Inhibidores no análogos de nucleósidos de la retrotranscriptasa |
| INTR | Inhibidores análogos de nucleósidos de la retrotranscriptasa |
| IPs | Inhibidores de proteasa |
| LAL | Ensayo del lisado de amebocitos de Limulus |
| LPB | Proteína de unión a lipopolisacárido (en inglés) |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LPV | Lopinavir |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| NaOAc | Acetato de sodio |
| NFQ | Inhibidor de fluorescencia |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PR | Proteasa |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RT | Retrotranscriptasa |
| SD | Desviación Estándar |
| SIDA | Síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| Std | Disolución estándar |
| TAR | Tratamiento antirretroviral |
| TDF | Tenofovir |
| TGI | Tracto gastrointestinal |

| | |
|-------------------|--|
| UNG | Uracilo-N-glicosilasa |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |
| VIH- | Individuos negativos por la prueba ELISA de detección de VIH |
| VIH+ | Individuos positivos por la prueba ELISA de detección de VIH |
| VIH+ C | Individuos controladores con VIH |
| VIH+ LdTAR | Individuos bajo TAR de larga duración con VIH |
| VIH+ nTAR | Individuos vírgenes a TAR con VIH |
| VIS | Virus de inmunodeficiencia en simios |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Número de personas infectadas con VIH en los estados de la república mexicana según lo reportado CENSIDA en el 2015..... | 12 |
| Figura 2. Genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Se indican los genes virales que codifican a las distintas proteínas. | 13 |
| Figura 3. Historia natural de la infección por VIH. Se muestra la carga viral, la respuesta de células T CD8+ y los niveles de linfocitos T CD4+ durante las fases aguda, crónica y SIDA de la infección por VIH..... | 14 |
| Figura 4. Etapas del ciclo de replicación del VIH (recuadros azules) y los blancos del tratamiento antirretroviral (recuadros rojos). Las etapas del ciclo de replicación viral son fusión, entrada, retrotranscripción, integración ensamblaje y liberación..... | 16 |
| Figura 5. Composición luminal normal de los principales filos, géneros y familias bacterianas en relación a las diversas regiones del tracto gastrointestinal..... | 18 |
| Figura 6. Daños al TGI en la infección por VIH. A) Individuo sin VIH y B) Individuo con VIH. Se observa que en la infección por VIH (B) hay pérdida de la integridad intestinal, disminución de la respuesta inmune celular y translocación microbiana | 22 |
| Figura 7. Consecuencias inmunológicas y clínicas de la translocación bacteriana en individuos infectados con VIH | 23 |
| Figura 8. Anormalidades gastrointestinales continuas en la infección por VIH en individuos sanos y en las fases de la infección por VIH (aguda, crónica y con TAR). Se observa que al progresar la infección por VIH la activación inmune y los marcadores de translocación microbiana y de daño intestinal se incrementan..... | 24 |
| Figura 9. Ribosoma 70S procariota. La subunidad 30S se encuentra resaltada en color rojo | 27 |
| Figura 10. Estructura y regiones variables del gen 16S rDNA de <i>Escherichia coli</i> . R: región.. .. | 28 |
| Figura 11. Diseño del Estudio | 38 |

| | |
|---|----|
| Figura 12. Funcionamiento de la Sonda tipo "Taqman" | 40 |
| Figura 13. Condiciones de la PCR en tiempo real para la amplificación del gen 16S rDNA. UNG: uracilo-N-glicosilasa que elimina las trazas de DNA de doble cadena. | 41 |
| Figura 14. Generación de la curva estándar a partir de una muestra (heces) que contenía el gen 16S rDNA seguido de diluciones seriales. | 43 |
| Figura 15. Gráfico "Rn vs Número de ciclo" arrojado por el software del equipo de qPCR. | 44 |
| Figura 16. Sensibilidad y repetibilidad de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16SrDNA. | 48 |
| Figura 17. Reproducibilidad de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16S rDNA. | 49 |
| Figura 18. Curva estándar utilizada para cuantificar el gen 16S rDNA en muestras de plasma | 50 |
| Figura 19. Comparación de los datos clínicos de la cohorte del estudio transversal. | 54 |
| Figura 20. Comparación de los datos clínicos del grupo LdTAR bajo distintos regímenes de TAR (Efavirenz: EFV/TDF/FTC e inhibidores de proteasa: IP)..... | 55 |
| Figura 21. Comparación de datos clínicos de la cohorte del estudio longitudinal. | 58 |
| Figura 22. Comparación de la cuantificación del Gen 16S rDNA en la cohorte de estudio transversal, longitudinal y según el régimen de TAR..... | 61 |
| Figura 23. Comparación de la cuantificación de CD14s en la cohorte de estudio transversal, longitudinal, según el régimen de TAR y correlación entre CD14s y el Gen 16S rDNA de la cohorte de estudio..... | 62 |
| Figura 24. Comparación de la cuantificación de I-FABP, en la cohorte de estudio transversal, longitudinal, según el régimen de TAR y correlación entre I-FABP y el Gen 16S rDNA. | 63 |

Figura 25. Correlación entre CD14s e I-FABP en individuos bajo el esquema de inhibidores de proteasa..... 64

Figura 26. Asociación de la recuperación del conteo de CD4+ con niveles del Gen 16S rDNA en TAR de larga duración y con el marcador CD14s sin TAR 65

Figura 27. Asociación entre marcadores de translocación bacteriana y el sistema inmune, la carga viral e I-FABP en la infección por VIH en individuos controladores..... 66

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Enfermedades asociadas con cambios en la composición y la función del microbioma gastrointestinal. | 20 |
| Tabla 2. Biomarcadores detectados en plasma de individuos infectados con VIH..... | 26 |
| Tabla 3. Investigaciones en las que se ha empleado la técnica PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16S rDNA | 29 |
| Tabla 4. Secuencias de los primers y la sonda empleadas en la amplificación del gen 16S rDNA mediante qPCR..... | 41 |
| Tabla 5. Reactivos empleados en la qPCR por muestra..... | 42 |
| Tabla 6. Concentraciones de las diluciones estándar e intervalo de la curva estándar.... | 43 |
| Tabla 7. Repetibilidad de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16SrDNA. | 48 |
| Tabla 8. Características clínicas de la cohorte del estudio transversal. | 53 |
| Tabla 9. Características clínicas del grupo bajo TAR de larga duración por régimen..... | 53 |
| Tabla 10. Características clínicas de la cohorte del estudio longitudinal..... | 57 |

CAPÍTULO I. RESUMEN

En la fase aguda de la infección por VIH se da una pérdida sustancial de linfocitos T CD4+, en especial de las células Th17, lo que genera un importante daño a nivel del tracto gastrointestinal (TGI), ya que la mayoría de estas células residen dentro de él. Por esta razón, este tejido es un sitio importante para la replicación del VIH y funge como reservorio para la persistencia viral. Los daños de la mucosa intestinal en la infección por VIH se caracterizan por pérdida de las placas de Peyer, atrofia de las vellosidades de los enterocitos, pérdida de las uniones estrechas, cambios en la microbiota comensal y mala absorción de nutrientes. Todo esto conlleva a la salida de los productos bacterianos del lumen intestinal a la circulación sanguínea, a lo cual se conoce como translocación bacteriana. Esta última, se ha evaluado en plasma o suero, mediante la cuantificación del gen del DNA ribosomal bacteriano 16S (16S rDNA) por PCR en tiempo real, ya que es un marcador filogenético presente en todas las bacterias que codifica para un RNA de la subunidad 30S de los ribosomas procariotas.

En el presente estudio se cuantificó el gen 16S rDNA en plasma de individuos infectados por VIH con o sin tratamiento antirretroviral (TAR) mediante PCR en tiempo real. Además, se correlacionó dicha cuantificación con los niveles de I-FABP, CD14s, conteo de linfocitos T CD4+ y carga viral para conocer la relación entre el daño a nivel de epitelio intestinal, translocación bacteriana y restauración del sistema inmune bajo TAR en la infección por VIH.

Se encontraron altos niveles del gen 16S rDNA en plasma de sujetos infectados por VIH que en individuos sanos. Particularmente, en individuos bajo TAR de larga duración. Asimismo, se observó que una terapia basada en el uso de inhibidores de proteasa podría incrementar el daño a nivel de TGI y a su vez la translocación bacteriana.

CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades sobre el Virus de Inmunodeficiencia Humana y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido

1.1 Epidemiología de Virus de Inmunodeficiencia Humana y del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y fue descubierto en 1983 [2, 3]. A finales del 2014, 36,9 millones de personas vivían con VIH en el mundo [4, 5].

En México, según el Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el sida (CENSIDA) [6], a finales del 2015, 190 mil personas vivían con VIH, de las cuales el 62.7% conocían su diagnóstico. El Distrito Federal, Estado de México y Veracruz presentaron el mayor número de personas infectadas con VIH (Figura 1). En el 2013, 4,965 personas murieron a causa de enfermedades asociadas con SIDA.

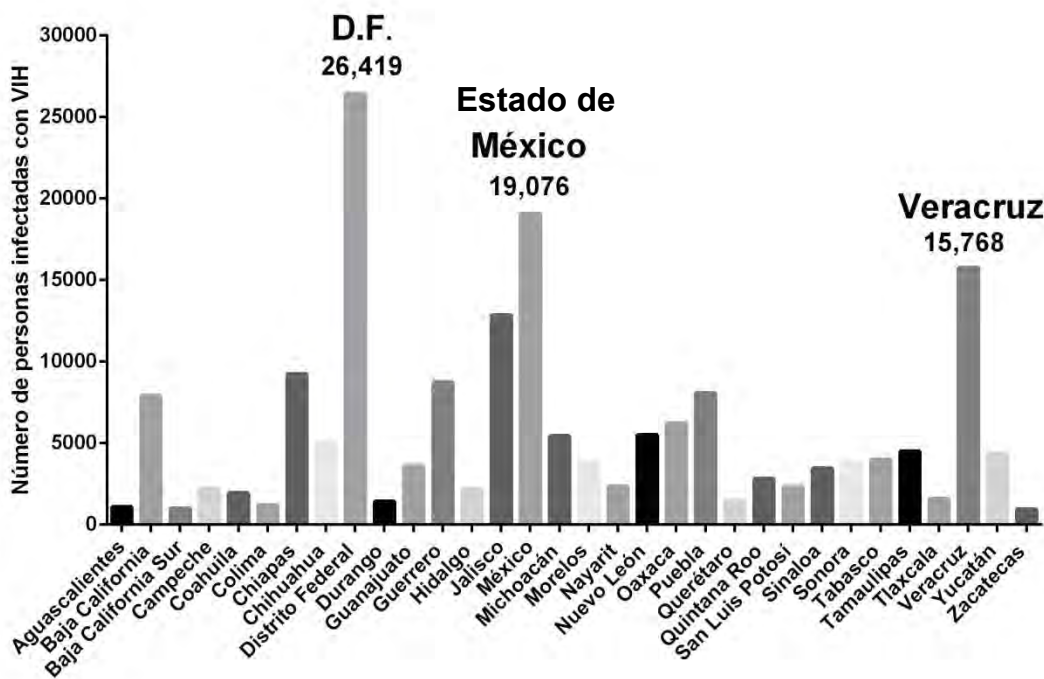


Figura 1. Número de personas infectadas con VIH en los estados de la república mexicana según lo reportado CENSIDA en el 2015 [6].

1.2 Genoma del VIH

El VIH es un lentivirus de la familia *Retroviridae*, cuyo genoma se encuentra en una sola cadena de ácido ribonucleico (RNA), de sentido positivo que presenta 9,3 kb (Figura 2). Además de los genes típicos de los retrovirus, *pol*, *gag* y *env*, el VIH posee otros elementos en su genoma, como los genes *vif*, *tat*, *rev*, *nef*, *vpu* y *vpr*, que codifican para proteínas reguladoras y accesorias importantes en el ciclo de replicación, en la interacción con la célula hospedera y la respuesta inmune. Por ejemplo, el gen *pol* codifica a las enzimas retrotranscriptasa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR) [7].

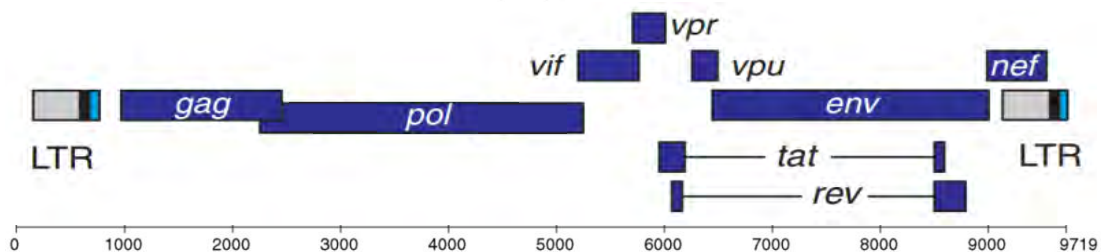


Figura 2. Genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Se indican los genes virales que codifican a las distintas proteínas. Tomado de [7].

1.3 Curso de la infección por VIH

El VIH infecta de manera selectiva a los linfocitos T CD4+ y en menor proporción a macrófagos y células dendríticas, lo que provoca el agotamiento lento del sistema inmune.

Las rutas de transmisión son: contacto sexual (mediante mucosas), de madre a hijo (durante el embarazo, parto o a través de leche materna, también conocida como transmisión vertical), intercambio de jeringas de usuarios de drogas intravenosas, accidentes laborales, transfusión sanguínea y trasplante de órganos.

El curso natural de la infección por VIH, es decir, sin intervención (tratamiento), se puede dividir en tres fases (Figura 3): (1) infección aguda caracterizada por una alta viremia asociada a una replicación descontrolada del virus, así como una caída importante del recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica y mucosas; (2) una fase crónica asintomática de duración variable con una media de 10 años, distinguida por el restablecimiento del recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica, una caída en la carga viral, la cual se estabiliza (set point viral), lo que coincide con la respuesta inmune específica contra el VIH por los linfocitos T CD8+; y por último (3) la fase de SIDA definida por un recuento de células T CD4+ menor a 200 células/ μ L, aumento de la viremia y la manifestación de enfermedades oportunistas.[8]

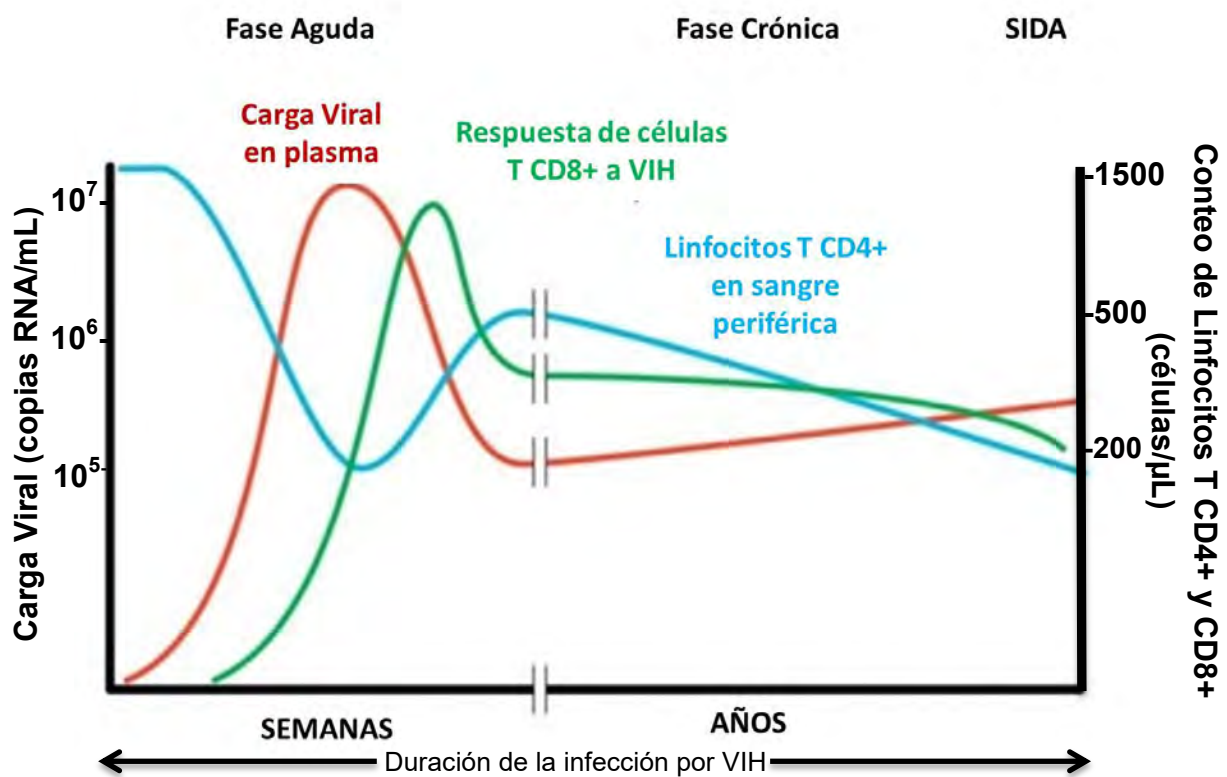


Figura 3. Historia natural de la infección por VIH. Se muestra la carga viral, la respuesta de células T CD8+ y los niveles de linfocitos T CD4+ durante las fases aguda, crónica y SIDA de la infección por VIH, Tomada y modificada de [8].

1.4 Ciclo de Replicación

La infección por VIH comienza con la fusión y entrada de una partícula viral a la célula huésped, para lo cual se requiere que las glicoproteínas virales gp120 y gp41 entren en contacto con el receptor celular CD4, y posteriormente con los correceptores celulares CCR5 o CXCR4. Una vez que la maquinaria del virus se depositó en el citoplasma celular se da la retrotranscripción por la enzima retrotranscriptasa (RT), cuyo producto es una copia de DNA de doble cadena a partir del RNA viral. Posteriormente, el DNA llega al núcleo para ser integrado al DNA del huésped por la enzima integrasa (IN), generando el DNA proviral. Luego, se da la transcripción y traducción, para sintetizar las proteínas virales que serán transportadas a la membrana plasmática para formar los viriones inmaduros. Estos últimos, son liberados de la célula por gemación, para después madurar por el corte de polipéptidos para generar proteínas individuales y maduras mediante la enzima proteasa (PR), de esta manera los viriones maduros están listos para infectar a una nueva célula [9]. El ciclo de replicación se presenta en la Figura 4.

1.5 Tratamiento Antiretroviral

El tratamiento antirretroviral (TAR) tiene como objetivo principal suprimir la replicación viral, llevando a niveles indetectables la carga viral y como consecuencias secundarias; disminuye la infección de nuevas células, restaura el sistema inmune evidenciado por el aumento del recuento de linfocitos T CD4+ y detiene el progreso de la infección por VIH. Por lo tanto, el uso de TAR ha reducido en forma significativa la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por VIH, en particular han disminuido de manera drástica las enfermedades asociadas a SIDA. Los antirretrovirales (ARs) son moléculas que actúan en distintas etapas del ciclo de replicación viral (Figura 4). Hasta la fecha, la FDA (del inglés; Food and Drug Administration) ha aprobado 36 ARs para su uso como tratamiento en la infección por VIH [9, 10].

Las clases de ARs actuales son: inhibidores de entrada, antagonistas de fusión, inhibidores análogos de nucleósidos de la retrotranscriptasa (INTR), inhibidores no análogos de nucleósidos de la retrotranscriptasa (INNTR), inhibidores de integrasa (IIN) e inhibidores de proteasa (IP). Los dos primeros son moléculas que evitan el reconocimiento y entrada del virus a la célula, los INTR e INNTR impiden la retrotranscripción del RNA viral a DNA viral, los IIN evitan la integración del DNA proviral y los IP inhiben la formación de viriones maduros [11].

En México, la TAR de primera línea, se basa en la utilización de tres clases de fármacos como triterapia, habitualmente dos INTR más un INNTR, o bien dos INTR más un IP.

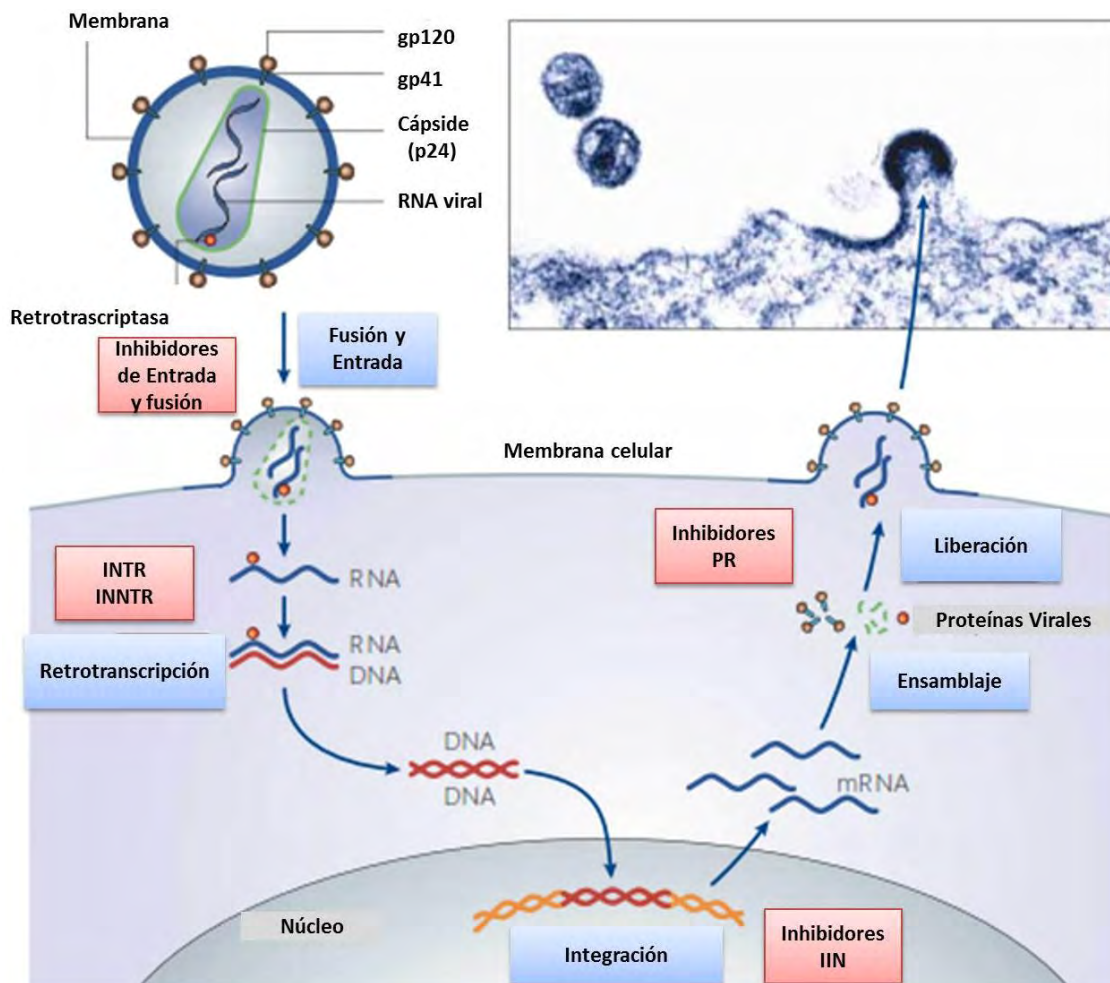


Figura 4. Etapas del ciclo de replicación del VIH (recuadros azules) y los blancos del tratamiento antirretroviral (recuadros rojos). Las etapas del ciclo

de replicación viral son fusión, entrada, retrotranscripción, integración ensamblaje y liberación. Modificada de [12].

2. Translocación bacteriana en la infección por VIH

2.1 Tracto gastrointestinal en la infección por VIH

El tracto gastrointestinal (TGI) es uno de los órganos linfoides más grande del cuerpo, de hecho, se ha estimado que contiene al menos 60% de las células T totales del cuerpo [8, 13]. Los linfocitos y otras células del sistema inmune adaptativo e innato, se encuentran a lo largo de TGI, tanto en tejidos organizados como dispersos, en todo el epitelio de superficie de la mucosa o lamina propia [14].

Los tejidos linfoides organizados en el intestino se conocen como tejidos linfoides asociados a intestino (GALT), en donde inician las respuestas inmunitarias mientras que en la lámina propia se encuentran las células efectoras de la respuesta inmunitaria local [13, 15].

Como se mencionó, en la fase aguda de la infección por VIH se da una pérdida sustancial de linfocitos T CD4+, en especial de las células Th17 [16], lo que genera un importante daño a nivel del TGI, ya que la mayoría de estas células residen dentro de él [17, 18]. Por esta razón, este tejido es un sitio importante para la replicación del VIH y funge como reservorio para la persistencia viral [19, 20].

2.2 Microbiota del tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) comprende una gran población de diversas especies de bacterias, hongos y virus, conocida como microbiota (Figura 5). El colon por sí solo contiene aproximadamente 10^{14} microorganismos [21]. Esta parte bacteriana de la microbiota se compone de aproximadamente 1,000 especies de bacterias que pertenecen en su mayoría a dos filos principales: *Firmicutes* y *Bacteroidetes* [22]. Otro filos, tales como *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Cianobacterias* son constituyentes menores [23]. Existe una relación simbiótica entre la

microbiota, la mucosa del TGI y el sistema inmune local. Esto se ha revisado recientemente [24].

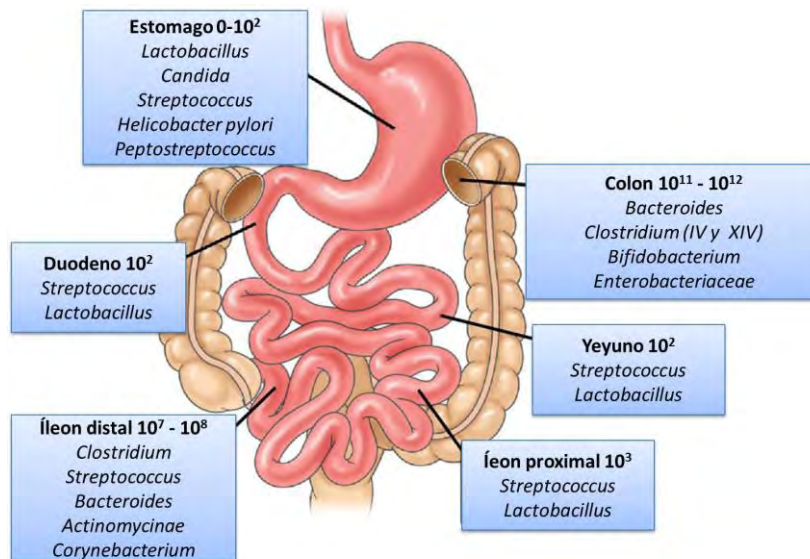


Figura 5. Composición luminal normal de los principales filos, géneros y familias bacterianas en relación a las diversas regiones del tracto gastrointestinal. Modificado de [25].

La microbiota tiene funciones muy importantes para el hospedero, entre las cuales, permite funciones digestivas, modula el metabolismo del huésped y estimula el desarrollo del sistema inmune de la mucosa [26]. Además, tiene una función muy importante en prevenir la colonización por patógenos. Asimismo, la microbiota puede (i) bloquear el crecimiento del patógeno por sustancias derivadas de la misma y por lo tanto interferir con la propagación, esto es denominado “resistencia a la colonización” [27], (ii) estimular respuestas inmunes innatas y adaptativas, (iii) ayudar a eliminar el patógeno desde el lumen intestinal al final de una infección aguda [28].

2.3 Disbiosis de la microbiota del TGI

Aunque la microbiota sea beneficiosa para el huésped, una perturbación en las comunidades bacterianas (disbiosis) a nivel de TGI puede tener un impacto negativo para el hospedero. En varias revisiones, según estudios recientes, muestran que los

cambios en la composición y la función del microbioma gastrointestinal se asocian con diversas enfermedades incluyendo la infección por VIH (Tabla 1) [24, 29].

2.4 Disbiosis de la microbiota en la infección por VIH

El papel de la microbiota en la patogénesis de la infección por el VIH se ha convertido en el objeto de intensa investigación en los últimos años. Investigaciones sugieren que la interrupción de la comunidad microbiana comensal de varios sitios anatómicos puede desempeñar un papel crítico en la patogénesis del VIH y la susceptibilidad a infecciones secundarias [41].

Durante la infección crónica por el VIH, el aumento de la supresión inmune causada por la depleción de linfocitos T CD4 +, contribuye a la elevada susceptibilidad a patógenos, tales como las enfermedades causadas por bacterias y/u hongos. Además, la deficiencia inmune altera las interacciones homeostáticas normales con las comunidades microbianas. Por lo tanto, los patógenos oportunistas tienen la capacidad de explotar ambientes inflamatorios como ventaja para proliferar [42].

Gori y colaboradores en 2008, fueron los primeros en reportar evidencia de disbiosis gastrointestinal en individuos infectados con VIH, observaron un aumento en la abundancia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, además, una reducción de Bifidobacterias y Lactobacilos en muestras fecales en comparación con individuos sanos [43].

Desde entonces, se han reportado alteraciones específicas en la microbiota intestinal de individuos con VIH [38-40, 44-49]. En particular, se ha observado, a nivel de género, un enriquecimiento significativo de *Prevotella* y una disminución en *Bacteroides*. En cuanto a filo, se ha encontrado un aumento en la abundancia relativa de *Proteobacteria* y una disminución de *Firmicutes* comparado con individuos sanos. Así mismo, la infección por VIH se asocia con la depleción de especies comensales, tales como, *Roseburia*, *Lachnospira*, *Ruminococcus*, etc. y el enriquecimiento de patógenos oportunistas (*Fusobacteria*, *Anaerococcus*, *Peptostreptococcus* y *Porphyromonas*).

Tabla 1. Enfermedades asociadas con cambios en la composición y la función del microbioma gastrointestinal.

| Enfermedad | Descripción del cambio en el microbioma intestinal | Referencia |
|---|---|-------------------|
| Enfermedad Intestinal Inflamatoria | Disminución de la abundancia de clase <i>Clostridia</i> | [30, 31] |
| Asma Infantil | Correlacionada por la diversidad microbiana intestinal baja durante el primer mes de vida | [32, 33] |
| Obesidad | Reducción en la diversidad microbiana y en algunos estudios incremento en la razón de los filos <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> | [34] |
| Enfermedades hepáticas crónicas | Incremento en la abundancia de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> | [35] |
| Cáncer Colorectal | Incremento en el filo <i>Bacteroidetes</i> y reducción en la abundancia de los géneros <i>Faecalibacterium</i> y <i>Roseburia</i> . | [36] |
| Diabetes tipo 2 | El filo <i>Firmicutes</i> y la clase <i>Clostridia</i> se encontraron disminuidas. La clase <i>Betaproteobacteria</i> enriquecida. | [37] |
| VIH | Aumento en la abundancia relativa del género <i>Prevotella</i> y disminución de <i>Bacteroides</i> , depleción de especies comensales (<i>Roseburia</i> , <i>Lachnospira</i> , <i>Ruminococcus</i>) y enriquecimiento de patógenos oportunistas (<i>Fusobacteria</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> y <i>Porphyromonas</i>). | [38-40] |

2.5 Translocación bacteriana a nivel de TGI y activación inmune crónica en la infección por VIH

Una característica distintiva de la infección por VIH y que está asociada con la progresión a SIDA, es la activación inmune crónica, la cual, está vinculada con una mayor morbilidad y mortalidad. Hay varias causas de dicha activación en los individuos infectados por VIH, sin embargo, la disfunción de la mucosa intestinal es un factor importante que contribuye a la persistencia de la inflamación y disfunción inmunológica. Los daños de la mucosa intestinal en la infección por VIH se caracterizan por pérdida de las placas de Peyer, atrofia de las vellosidades de los enterocitos, pérdida de las uniones estrechas, cambios en la microbiota comensal y mala absorción de nutrientes (Figura 6). Todo esto conlleva a la salida de los productos bacterianos del lumen intestinal a la circulación sanguínea, a lo cual se conoce como translocación bacteriana [50-52].

En circunstancias normales, la translocación bacteriana es contrarrestada por fagocitosis dentro de la lámina propia y en los ganglios linfáticos mesentéricos (Figura 7). Sin embargo, debido a que en la infección por VIH el sistema inmune de la mucosa del huésped se ve comprometida, estos mecanismos de defensa pueden fallar, permitiendo así que productos bacterianos lleguen a circulación periférica [52].

La translocación bacteriana durante la infección por el VIH fue descrita por primera vez en 2006 [53], cuando se demostró que productos bacterianos se encontraban significativamente elevados en el plasma de individuos infectados con VIH (Figura 7). Lo anterior, también fue demostrado en modelos con primates infectados por el virus de inmunodeficiencia en simios (VIS) [53].

Es importante mencionar, que la translocación bacteriana no es un fenómeno restringido a la infección por VIH. De hecho, se ha reportado en varias enfermedades, tales como, enfermedades inflamatorias del intestino, cardiovasculares, en la infección por virus de la hepatitis C (HCV), alcoholismo, por mencionar algunas [24].

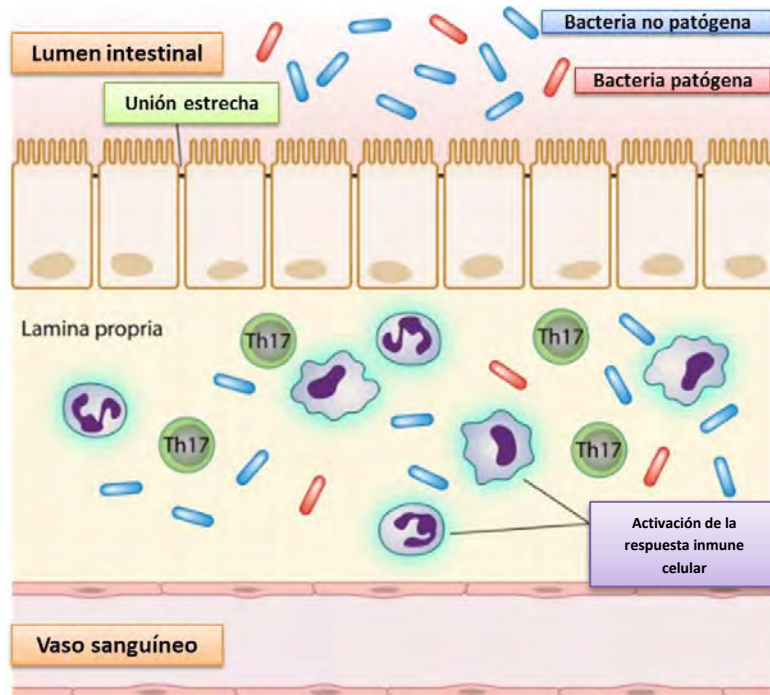
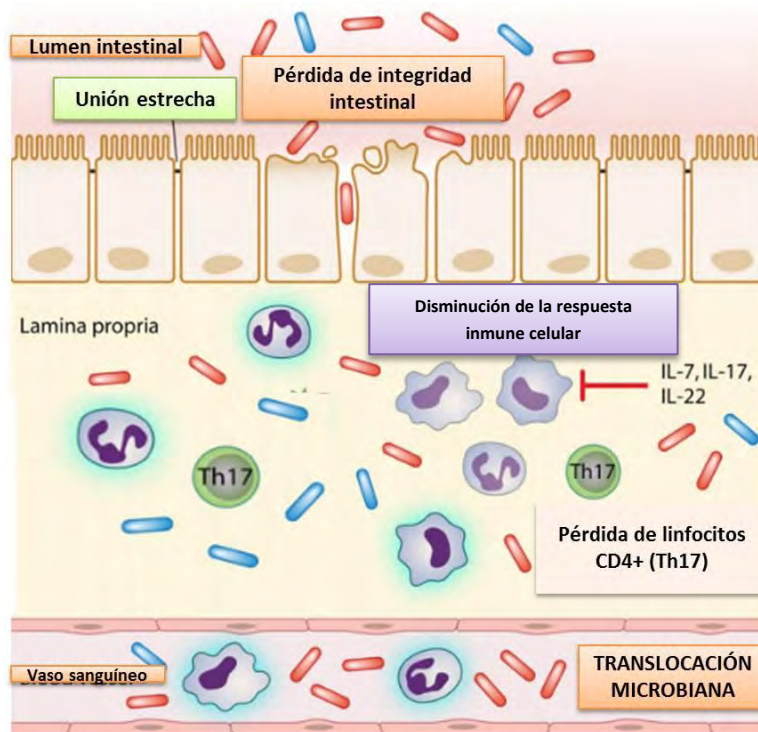
A**B**

Figura 6. Daños al TGI en la infección por VIH. A) Individuo sin VIH y B) Individuo con VIH. Se observa que en la infección por VIH (B) hay pérdida de la integridad intestinal, disminución de la respuesta inmune celular y translocación microbiana. Modificada de [54].

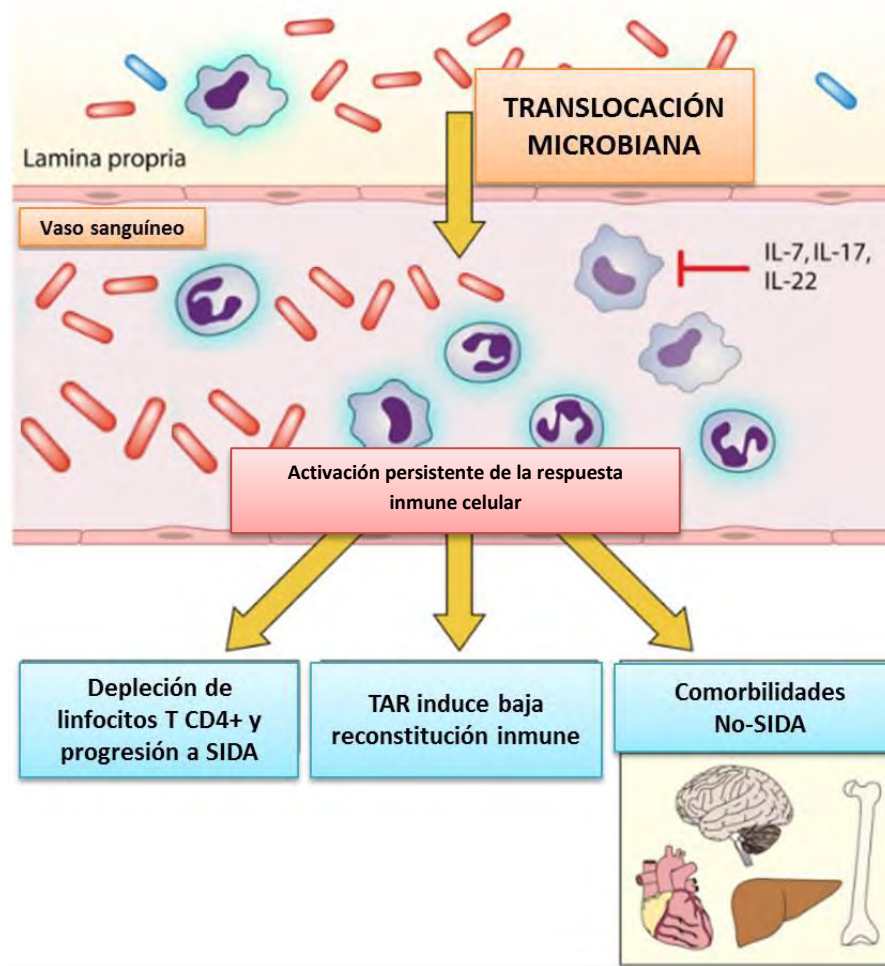


Figura 7. Consecuencias inmunológicas y clínicas de la translocación bacteriana en individuos infectados con VIH. Modificada de [54].

2.6 TAR y translocación bacteriana

Los tratamientos antirretrovirales actuales, como se mencionó, pueden suprimir la viremia a niveles indetectables y su uso mejora considerablemente la calidad y esperanza de vida en un individuo infectado por VIH. Sin embargo, a pesar de esta supresión en la viremia, individuos con TAR aún presentan un incremento en la morbilidad y mortalidad en comparación a individuos no infectados con VIH (Figura 8). Esto se asocia a la actividad inmune residual generada por los bajos niveles de replicación viral en los órganos linfoides secundarios. Además, una de las potenciales

causas de dicha activación durante el tratamiento es la translocación bacteriana. De hecho, aunque la translocación bacteriana disminuye en individuos infectados con VIH bajo TAR en comparación con los individuos no tratados, esta se mantiene significativamente mayor con respecto a los individuos no infectados [55]. Los altos niveles de translocación bacteriana se asocian con la activación crónica del sistema inmune y la falta de reconstitución inmune en la infección por VIH bajo TAR. Asimismo, existe una relación inversa entre el conteo de linfocitos T CD4+ y la translocación bacteriana, así como una disminución de los linfocitos T CD4+ residentes en el TGI. Aunque la TAR induzca reconstitución de estos linfocitos en circulación periférica, en el TGI se ve muy limitada. Por lo tanto, a pesar del uso de TAR, las disfunciones inmunológicas y anatómicas persisten [56, 57].

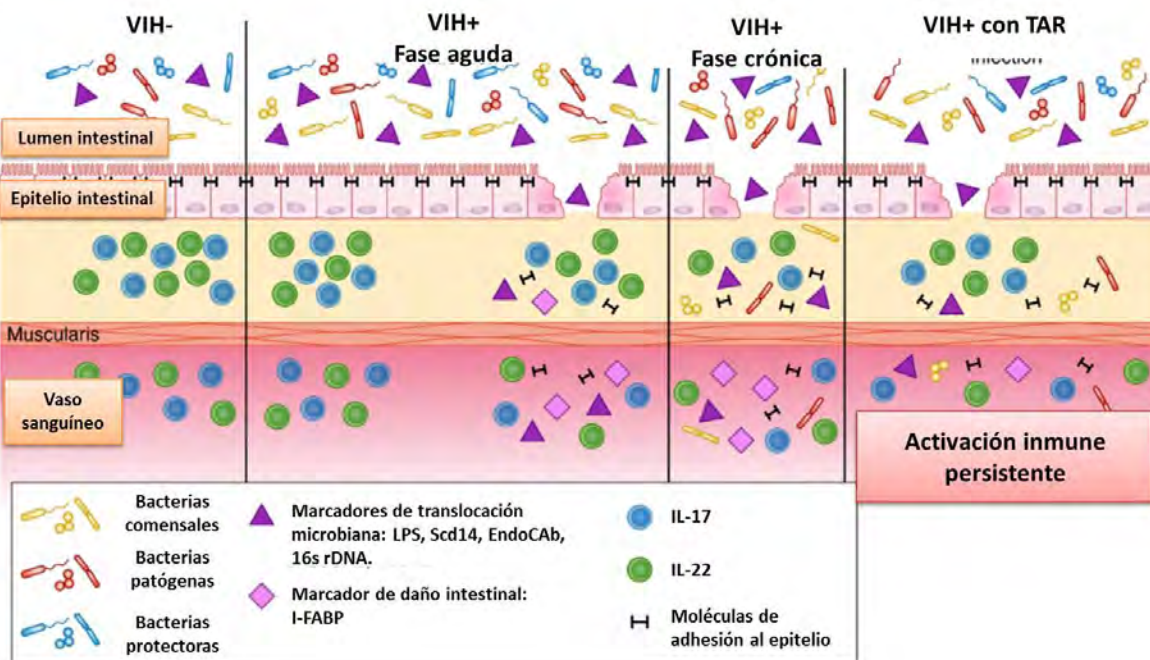


Figura 8. Anormalidades gastrointestinales continuas en la infección por VIH en individuos sanos y en las fases de la infección por VIH (aguda, crónica y con TAR). Se observa que al progresar la infección por VIH la activación inmune y los marcadores de translocación microbiana y de daño intestinal se incrementan. Tomada de [58].

2.7 Biomarcadores de translocación bacteriana y de progresión de la infección por VIH

La translocación bacteriana se puede evaluar, ya sea directamente a través de la medición de productos bacterianos en plasma o suero, tales como el lipopolisacárido (LPS), componente de la membrana de las bacterias Gram negativas, y fragmentos bacterianos de DNA o RNA, o indirectamente por la medición del CD14 soluble (CD14s), proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) y EndoCAb (Tabla 2) [54]. Recientemente, los niveles plasmáticos de la proteína de unión de ácidos grasos intestinal (I-FABP), un marcador de daño de los enterocitos (células del epitelio intestinal) también se ha propuesto como un marcador de disfunción intestinal [54]. En la tabla 2 se resumen las principales características de los marcadores de translocación bacteriana y sus asociaciones con la progresión de la infección por VIH. Estas asociaciones fueron determinadas mediante la medición de dichos marcadores en plasma de individuos infectados por VIH sin y con TAR.

En la mayoría de los estudios publicados los marcadores sCD14, LBP y EndoCAb se determinan en plasma mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), que generalmente produce resultados fiables y reproducibles. En particular, sCD14 ha sido ampliamente utilizado como marcador de translocación bacteriana, dada la práctica estandarización de su medición. Es importante señalar, que el sCD14 sirve como marcador biológico de la activación de monocitos y macrófagos, y aunque se correlaciona con LPS, no es un marcador directo y específico de la translocación bacteriana *per se*. Por el contrario, el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) permite la determinación cuantitativa de LPS directamente en sangre. Sin embargo, el ensayo presenta dificultades técnicas debido a la contaminación de reactivos y de inhibidores naturales presentes en plasma. Además, ya que el LPS es un componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas, el ensayo no permite determinar la translocación de bacterias Gram positivas.

Un marcador y un método alternativo para evaluar la translocación bacteriana, es la determinación en plasma de la carga total bacteriana mediante la detección y cuantificación del gen del DNA ribosomal 16S (16S rDNA) que está universalmente conservado en bacterias.

Tabla 2. Biomarcadores detectados en plasma de individuos infectados con VIH. Tomada y modificada de [54].

| Biomarcadores | Descripción | Método | Limitaciones para su detección |
|--|---|----------------------|---|
| Marcadores de translocación bacteriana | | | |
| LPS | Componente de la membrana externa en bacterias Gram negativas | Ensayo LAL o ELISA | <ul style="list-style-type: none"> - Contaminación de reactivos - Inhibidores plasmáticos - Específico para bacterias Gram negativas |
| CD14s | Proteína expresada por monocitos y macrófagos; la forma soluble aparece después de la evacuación o se secreta directamente desde las vesículas intracelulares. | ELISA | <ul style="list-style-type: none"> - Citocinas proinflamatorias (IFN-α e IFN-β) pueden incrementar los niveles de CD14s |
| LPB | Proteína de fase aguda que se une al LPS y lo presenta a la molécula CD14 y al TLR-4. | ELISA | <ul style="list-style-type: none"> - Producida por hepatocitos, influenciado por coinfección de HCV/HBV |
| EndoCAb | Anticuerpos de tipo IgM, IgG e IgA dirigidos contra el antígeno del LPS que neutralizan su actividad. | ELISA | <ul style="list-style-type: none"> - En condiciones normales, cuando el LPS está en circulación periférica, estos anticuerpos se unen al LPS, disminuyendo sus títulos - En presencia de productos microbianos en circulación, los niveles de EndoCAb se incrementan como parte de la respuesta humoral normal a la estimulación antigénica |
| Gen 16S rDNA | Fragmentos de DNA derivados de la degradación bacteriana | PCR del gen 16S rDNA | <ul style="list-style-type: none"> - Contaminación proveniente de reactivos (DNA polimerasa Taq) - Contaminación de la muestra - Cantidad de DNA circulante bacteriano |
| Marcadores de daño al epitelio intestinal | | | |
| I-FABP | Proteína de unión de ácidos grasos intestinal expresada en células epiteliales de la mucosa del tejido del intestino delgado. Cuando se produce daño en la mucosa intestinal, I-FABP se libera a circulación y aumenta su concentración plasmática. | ELISA | <ul style="list-style-type: none"> - No específica si existe o no translocación bacteriana, solo es marcador de daño intestinal. |

2.7.1 Cuantificación del gen 16S rDNA en plasma

El gen del DNA ribosomal bacteriano 16S es un marcador filogenético presente en todas las bacterias que codifica para un RNA de la subunidad 30S de los ribosomas procariotas (Figura 9). El gen 16S rDNA posee 1,542 nucleótidos organizados en 9 regiones hipervariables (regiones con variación a nivel de nucleótidos: V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 y V9) y regiones constantes (Figura 10) [59]. La ventaja de cuantificar el gen 16S rDNA en plasma es que además de informarnos acerca de la carga total bacteriana también nos podría permitir conocer de qué bacterias provienen los productos que translocan a circulación periférica mediante el uso de secuenciación del DNA. La mayoría de los ensayos con PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de punto final únicamente permiten la amplificación de una o varias regiones del gen 16S rDNA para determinar su presencia o ausencia. En contraste, la técnica de PCR en tiempo real permite la cuantificación de este gen. Sin embargo, este método presenta desventajas debido a que los kits de extracción de DNA pueden generar resultados de tipo falsos positivos (cuantificación de DNA exógeno a la muestra de interés) ya que contiene trazas de ácidos nucleicos de origen bacteriano en los reactivos, es decir, se cuantifica DNA proveniente del kit y no de la muestra [60]. En la tabla 3, se muestra una recopilación de investigaciones en las que se ha empleado la técnica PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16S rDNA.

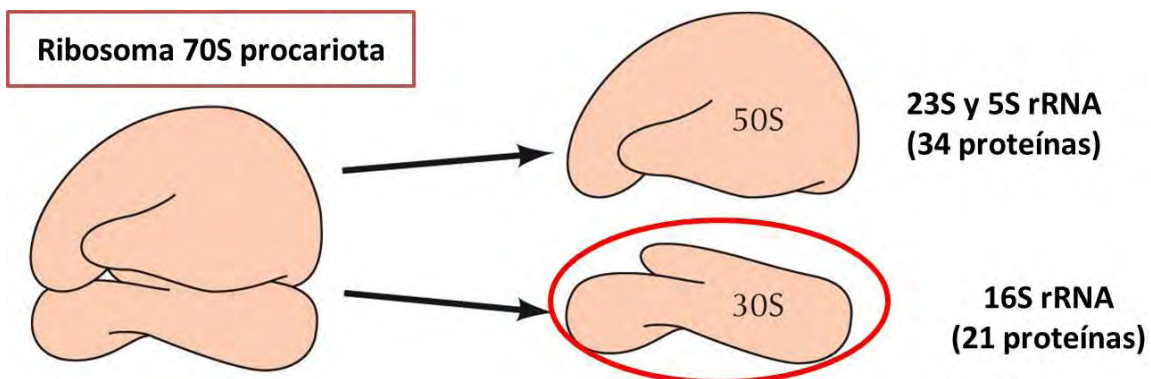


Figura 9. Ribosoma 70S procariota. La subunidad 30S se encuentra resaltada en color rojo. Tomada y modificada de [59]

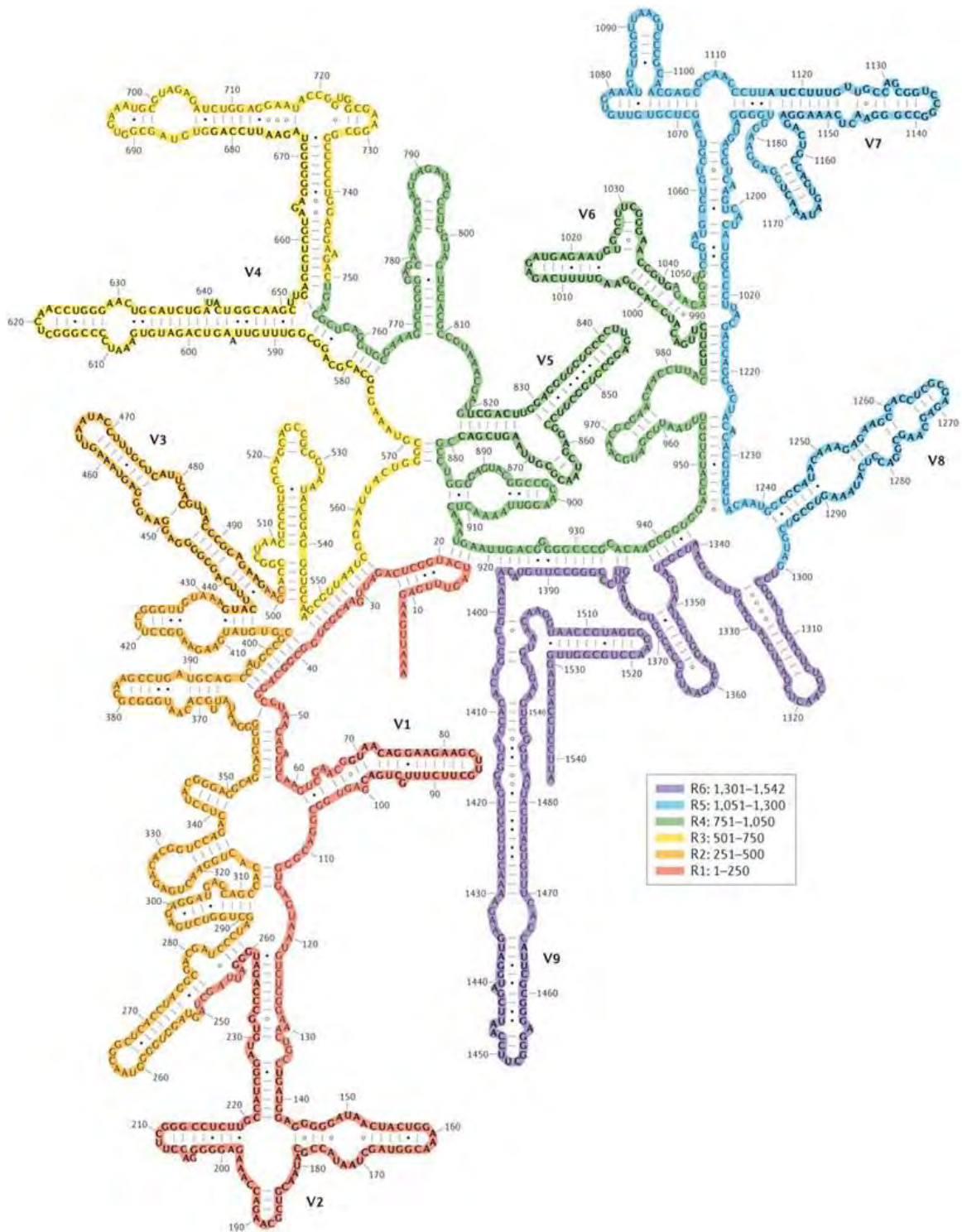


Figura 10. Estructura y regiones variables del gen 16S rDNA de *Escherichia coli*. R: región. Tomada de [59].

Tabla 3. Investigaciones en las que se ha empleado la técnica PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16S rDNA

| Referencia | Volumen de espécimen | Reactivos empleados para la extracción de DNA | Primers, sonda y tipo de polimerasa | Condiciones de Amplificación |
|------------|----------------------|---|---|---|
| [16] | 200 µL (plasma) | DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) | Primers (0.5 mM): 8F: 59-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG) 361R: 59-CGYCCATTGBGBAADAT TCC) Taq polymerase (Invitrogen) | 94°C por 5 min 45 ciclos: - 94°C por 10s - 54°C por 45s - 72°C por 60s Equipo: LightCycler 480 (Roche). |
| [61] | 200 µL (plasma) | DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) Pirocarbonato de dietilo (DEPC) Nuclease shrimp (SNuc) | Primers (20 µM): 16SF,5_AACAGGATTAGATACCCTGGTAG-3 16S R, 5_GGTTCTKCGCGT TGCWTC-3 Sonda 16S (20 µM): 5-FAMAAAC7AC5TGCTCCACCGCT-BHQ1-3 FAM y BHQ1 (Fluorocromos) | 37°C por 10 min 72°C por 20 min. 95°C por 2 min 40 ciclos: - 95°C por 2 min, - 95°C por 5 s - 60°C por 30 s Equipo: Stratagene MX3005P |

| | | | Brilliant II Fast QPCR mix (Roche) | Real-time PCR machine |
|------|-----------------------------------|---|--|---|
| [62] | 350 µL (plasma) | Easy-DNA Kit, Invitrogen, Carlsbad CA, USA Lysozyme (10 µL) | Primers (50 µM): RW01-(AACTGGAGGAAGGT GGGGAT) DG74-(AGGAGGTGATCCAA CCGCA) Taq polymerase (AmpliTaq Gold, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) | 94°C por 10 min 40 ciclos: - 94°C por 1 min - 55°C por 1 min - 72°C por 1 min 10 min a 72°C. |
| [63] | 200 µL (plasma) | QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) | | |
| [64] | Plasma | DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) | Primers (100 nM): 314F,5CCTACGGGAGGCAGCAG 518R,5ATTACCGCGGCTGCTGG Power SYBR green master mix (Applied Biosystems) | 95°C por 5 min 40 ciclos: - 95°C por 15 s - 60°C por 1 min |
| [65] | Plasma Orina Esputo | DNA Extraction MagnaPure (Roche) | PLK1 (5-TAC GGG AGG CAG CAGT-3) PLK2 (5-TAT TAC CGC GGC TGC T-3) | 95°C por 10 min 45 ciclos: - 95°C por 15 s - 52°C por 8 s - 72°C por 10 s |

| | | | | |
|------|--------------------------------|---|--|--|
| | | | <p>Sondas:</p> <p>ISN2 (5-CCG CAG AAT AAG CAC CGG CTA ACT CCG T-3)</p> <p>ISP2 (5-CCT AAC CAG AAA GCC ACG GCT AAC TAC GTG-3)</p> <p>FastStart DNA Master SYBR Green I</p> | <p>Equipo: qPCR system (LightCycler; Roche)</p> |
| [66] | 250 µL (cultivo bacteriano) | QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) | <p>Primers (100 nM):</p> <p>F, 5-TCCTACGGGAGGCAGCA GT-3</p> <p>R, 5-GGACTACCAGGGTATCTAAT CCTGTT- 3</p> <p>Sonda (100 nM):</p> <p>(6-FAM)-5CGTATTACCGCGGCT GCTGGCAC- 3-(TAMRA)</p> <p>FAM y TAMRA (Fluorocromos)</p> <p>TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)</p> | <p>50 °C por 2 min</p> <p>95 °C por 10 min</p> <p>40 ciclos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 95 °C por 15 s - 60 °C por 1 min <p>Equipo:</p> <p>ABI-PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)</p> |
| [67] | 200 ml (hisopado nasofaríngeo) | AGOWA Mag Mini DNA Isolation Kit, catalogue 40410, AGOWA, Berlin, Germany | <p>Primers (10 nM):</p> <p>16S-F1 (59-CGA AAG CGT GGG GAG CAA A -39)</p> <p>16S-R1 (59-GTT CGT ACT CCC</p> | <p>2 min a 50 °C</p> <p>10 min a 95 °C</p> |

| | | | | |
|------|--|--|---|---|
| | | | <p>CAG GCG G-39)</p> <p>Sonda (5mM):</p> <p>16S-P1 (FAM- ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA –MGB).</p> <p>2x master mix (Universal Mastermix, Lie`ge, Belgium)</p> | <p>45 ciclos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 95 °C por 15 s - 60 °C por 1 min <p>Equipo:</p> <p>7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)</p> |
| [60] | 200 µL por reactivo del kit de extracción de DNA | MagNA Pure Total Nucleic Acid Extraction kit | <p>Primers (900 nM):</p> <p>F5-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3</p> <p>R5-GGACTACCAGGGTATCTAAT CCTGTT-3</p> <p>Sonda (200nM):</p> <p>6-FAM-5-CGTATTACCGCGG CTGCTGGCAC- 3-TAMRA)</p> <p>TaqMan Universal PCR Master Mix</p> | <p>50 °C por 2 min</p> <p>95 °C por 10 min</p> <p>40 ciclos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 95 °C por 15 s - 60 °C por 1 min <p>Equipo:</p> <p>ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).</p> |

| | | | | |
|------|--------------------|---|--|--|
| [55] | 200 µL (plasma) | DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) | Primers (0.5 µM): 8F: 5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' 515R:5'GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3' Sonda (0.35 µM): 338P: 5'- FAM -GCT GCC TCC CGT AGG AGT- BHQ1 -3' Platinum Taq polymerase (Introvirgen) | 95 °C por 5 min 45 ciclos: - 95 °C por 15 s - 60 °C por 1 min |
|------|--------------------|---|--|--|

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

Una característica distintiva en la infección por VIH y que está asociada con la progresión a SIDA, es la activación inmune crónica. Hay varias causas de dicha activación en los individuos infectados por VIH, sin embargo, la disfunción de la mucosa intestinal es un factor importante que contribuye a la persistencia de la inflamación y disfunción inmunológica. En la fase aguda de la infección por VIH se da una pérdida sustancial de linfocitos T CD4+, lo que genera un importante daño a nivel TGI, ya que la mayoría de estas células residen en este sitio. Por esta razón, este tejido es un sitio importante para la replicación del VIH y funge como reservorio para la persistencia viral.

Los daños de la mucosa en la infección por VIH se caracterizan por pérdida de las placas de Peyer, atrofia de las vellosidades de los enterocitos, pérdida de las uniones estrechas, cambios en la microbiota comensal y mala absorción de nutrientes. Todo lo anterior conlleva a la salida de los productos bacterianos del lumen intestinal a la circulación sanguínea, a lo cual se conoce como translocación bacteriana y se ha propuesto como una de las principales causas de la activación inmune crónica en la infección por VIH.

Un marcador y un método alternativo para evaluar la translocación bacteriana, es la determinación en plasma de la carga total bacteriana mediante la detección y cuantificación del gen del 16S rDNA universalmente conservado en bacterias mediante PCR en tiempo real.

El presente estudio pretende cuantificar el gen 16S rDNA en plasma de individuos infectados por VIH con o sin tratamiento antirretroviral mediante PCR en tiempo real, ya que nos informará acerca de la translocación microbiana en la infección por VIH. Además, se pretende correlacionar dicha cuantificación con los niveles de I-FABP, CD14s, conteo de linfocitos T CD4+ y carga viral con la finalidad de conocer la relación entre el daño a nivel de epitelio intestinal, la translocación bacteriana y la restauración del sistema inmune bajo TAR en la infección por VIH.

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

Dada la depleción y disfunción sustancial de linfocitos T CD4+ en la infección por VIH a nivel de TGI, la cuantificación del marcador de translocación microbiana (gen 16S rDNA) en plasma será mayor en individuos que viven con VIH en relación con los individuos no infectados. Asimismo, el uso de tratamiento antirretroviral y el tipo de TAR utilizado afectará la translocación de productos bacterianos a circulación periférica.

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

Objetivo general:

1. Cuantificar el gen del DNA ribosomal bacteriano 16S (16S rDNA) en plasma de individuos infectados por VIH mediante PCR en tiempo real para comparar los valores encontrados entre los grupos de la cohorte de estudio transversal (VIH+ C, VIH-, VIH+ nTAR y LdTAR) y longitudinal (VIH+ TAR t=0, t=6, t=12, t=18 y t=24 meses).

Objetivos particulares:

1. Recolectar plasma de sangre periférica.
2. Extraer el DNA de las muestras de plasma mediante el uso del kit de reactivos QIAamp[®]DNA/Blood Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA).
3. Precipitar el DNA extraído usando acetato de sodio (NaOAc) a 0.3 M y etanol frío.
4. Cuantificar el DNA extraído de plasma mediante fluorimetría y nanoespectrofotometría, empleando los equipos Qubit[®] 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies, Malaysia) y Nanodrop[®] ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE), respectivamente.
5. Generar una curva estándar para la cuantificación del gen 16S rDNA por PCR en tiempo real.
6. Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16S rDNA por PCR en tiempo real.
7. Evaluar sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad del ensayo.
8. Cuantificar el gen 16S rDNA por PCR en tiempo real en las muestras de plasma de la cohorte de estudio.
9. Comparar y correlacionar entre los grupos de la cohorte de estudio los valores encontrados del conteo de Linfocitos T CD4+, T CD8+, razón de linfocitos T CD4+/T CD8+, recobro de linfocitos CD4+ y carga viral, para la cuantificación de los marcadores: gen 16S rDNA, CD14s, y I-FABP, mediante el uso de pruebas no paramétricas.

CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cohorte de Estudio

El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ciencias y Bioética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) bajo el código “B36-12” (Anexo 1). Todos los individuos que fueron invitados a participar a este protocolo aceptaron y firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 2). El único criterio de exclusión fue la ingesta de antibióticos previa a la toma de muestras. Se requirió de al menos dos semanas entre la última toma de antibiótico y la toma de muestra fecal y sanguínea.

El estudio fue desarrollado en el Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas, parte del INER y fue un estudio de tipo transversal y longitudinal, como se muestra en la Figura 11.

La cohorte para el estudio transversal se compone de:

- ✓ 10 individuos seronegativos (VIH-, negativos por la prueba ELISA de detección de VIH),
- ✓ 68 individuos infectados con VIH (VIH+, positivos por la prueba ELISA de detección de VIH); de los cuales 6 eran controladores (VIH+ C, definidos por mantener una carga viral menor a 2000 copias de RNA del VIH-1/mL por lo menos 1 año seguido y sin tratamiento), 29 eran vírgenes a TAR (VIH+ nTAR, con cargas virales y recuentos de linfocitos T CD4+ variables) y 33 individuos se encontraban bajo TAR de larga duración (LdTAR, por más de dos años) con carga viral indetectable (< 40 copias de RNA del VIH-1/mL) y conteo de linfocitos T CD4+ variables. De estos últimos, 18 estaban bajo un esquema a base de un INNTR y dos INTRs (Efavirenz/Tenofovir/Emtricitabina: EFV/TDF/FTC) y 15 bajo un esquema a base de un inhibidor de proteasa (IPs) (Lopinavir o Atazanavir: LPV o ATV) potenciados con Ritonavir y dos INTRs (n= 7; LPV/r/TDF/FTC y n=8; ATV/r/TDF/FTC).

Además, de manera longitudinal, a 9 de los 29 individuos infectados con VIH vírgenes a TAR, se les dio seguimiento a los 6 (n=9), 12 (n=6), 18 (n=4) y 24 meses

(n=1) después de iniciar el TAR basado en un esquema de un INNTR y dos INTRs (Efavirenz/Tenofovir/Emtricitabina: EFV/TDF/FTC).

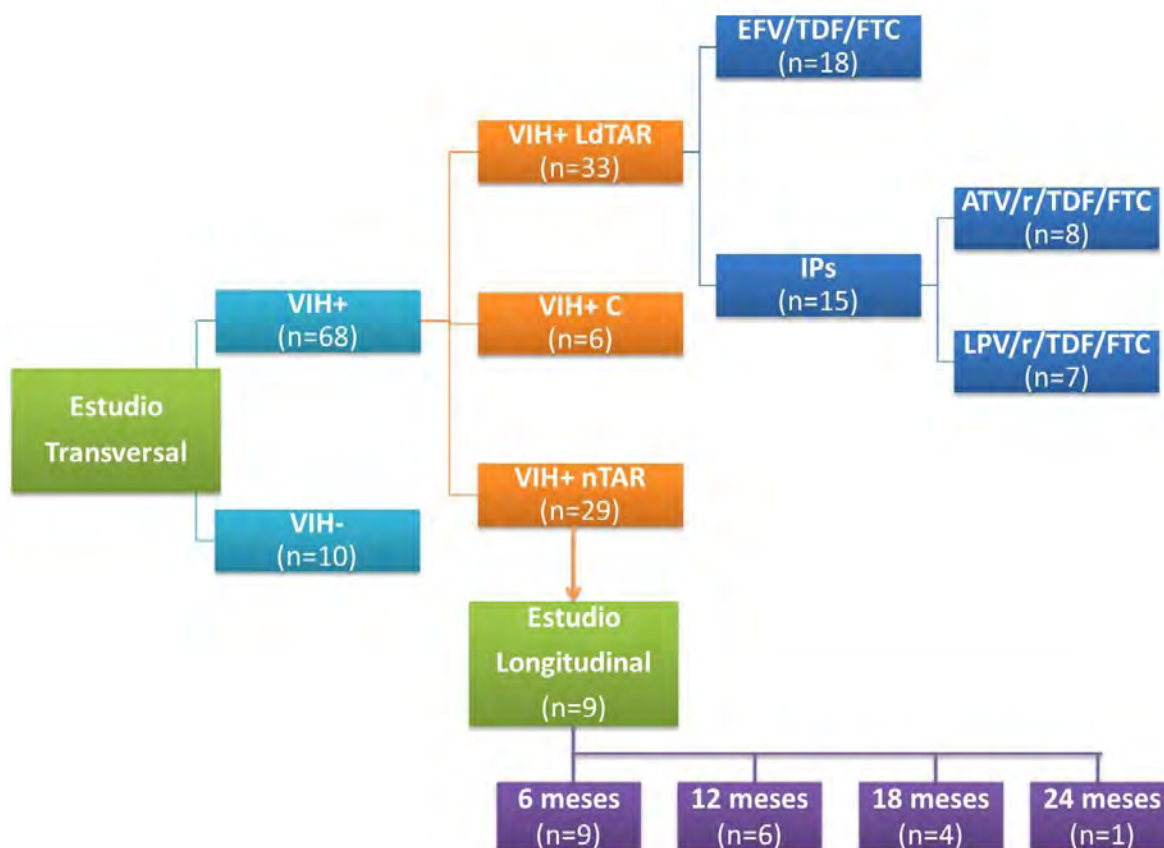


Figura 11. Diseño del Estudio

2. Recolección de plasma de sangre periférica

De cada individuo se obtuvo una muestra de sangre periférica recolectada en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (6 tubos de 6mL, en total 36mL). La muestra de sangre fue procesada inmediatamente para obtener el plasma por centrifugación (3,000 rpm por 10 min). Alícuotas de 1 mL de plasma fueron inmediatamente almacenadas a -80°C hasta su posterior procesamiento.

3. Extracción de DNA de muestras de plasma

La extracción del DNA total a partir de 400 µL de plasma se realizó mediante el uso del kit de reactivos QIAamp[®]DNA/Blood Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA), siguiendo

las recomendaciones del fabricante. En breve, se incubó el plasma con dos enzimas (proteasa y proteinasa k) y una solución de lisis (Buffer AL) a 56°C por 10 min. Se agregó etanol al 100% y se incubó por un minuto a temperatura ambiente, esto con la finalidad de precipitar el DNA presente en la muestra. Luego, la mezcla anterior se colocó en una columna con membranas de sílice, a la cual se adsorbe el DNA. La membrana fue lavada dos veces con distintas soluciones amortiguadoras (Buffer AW1 y AW2) para descartar posibles contaminantes residuales. Finalmente, el DNA se eluyó en 100 µL de una solución de baja fuerza iónica (Buffer AE) y se guardó a -20°C. Un control negativo de extracción se realizó en paralelo con 400 µL de Buffer AE en lugar de plasma.

4. Precipitación de DNA

Una vez extraído el DNA, este fue concentrado mediante su precipitación usando acetato de sodio (NaOAc) a 0.3 M y etanol frío (4°C) al 100% por una hora a -20°C. Después de centrifugar, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Por último, el DNA fue resuspendido en 20 µL de H₂O y guardado a -20°C.

5. Cuantificación del DNA extraído

Se determinó la concentración del DNA extraído mediante fluorimetría empleando el equipo Qubit[®] 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Además, se evaluó la pureza de DNA por la relación entre la absorbancia de ácidos (260/280), lo que nos indica que el DNA se encuentra libre de proteínas. Para esto se empleó un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

6. Cuantificación del gen del DNA ribosomal 16S (16S rDNA) por PCR en tiempo real

Para cuantificar la carga total bacteriana se empleó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real o cuantitativa (qPCR), mediante la detección y cuantificación del gen del DNA ribosomal bacteriano 16S (16S rDNA).

Para lograr mayor especificidad se ocupó una sonda de hidrólisis de tipo "Taqman", que consiste en una secuencia específica (≈ 100 pares de bases) y complementaria al gen de interés, en este caso, al gen 16S rDNA. Dicha sonda se encuentra etiquetada con un marcador reportero unido a su extremo 5' (6 FAM™ dye) y un inhibidor de fluorescencia (NFQ) en el extremo 3' de la sonda (3'TAMRA dye) [1].

En breve, se describe la química de la sonda Taqman; cuando se encuentra intacta y alineada a su blanco, no emite fluorescencia debido a que el inhibidor NQF absorbe esta misma por su cercanía. Cuando inicia el ciclo de extensión, la polimerasa degrada la sonda por su actividad de exonucleasa 5'-3', lo que permite la liberación del "marcador reportero". El inhibidor NQF ya no puede absorber la fluorescencia emitida por el marcador reportero y esta puede ser detectada por el láser del equipo de qPCR. Esto se repite a cada ciclo por 45 ciclos (Figura 12).

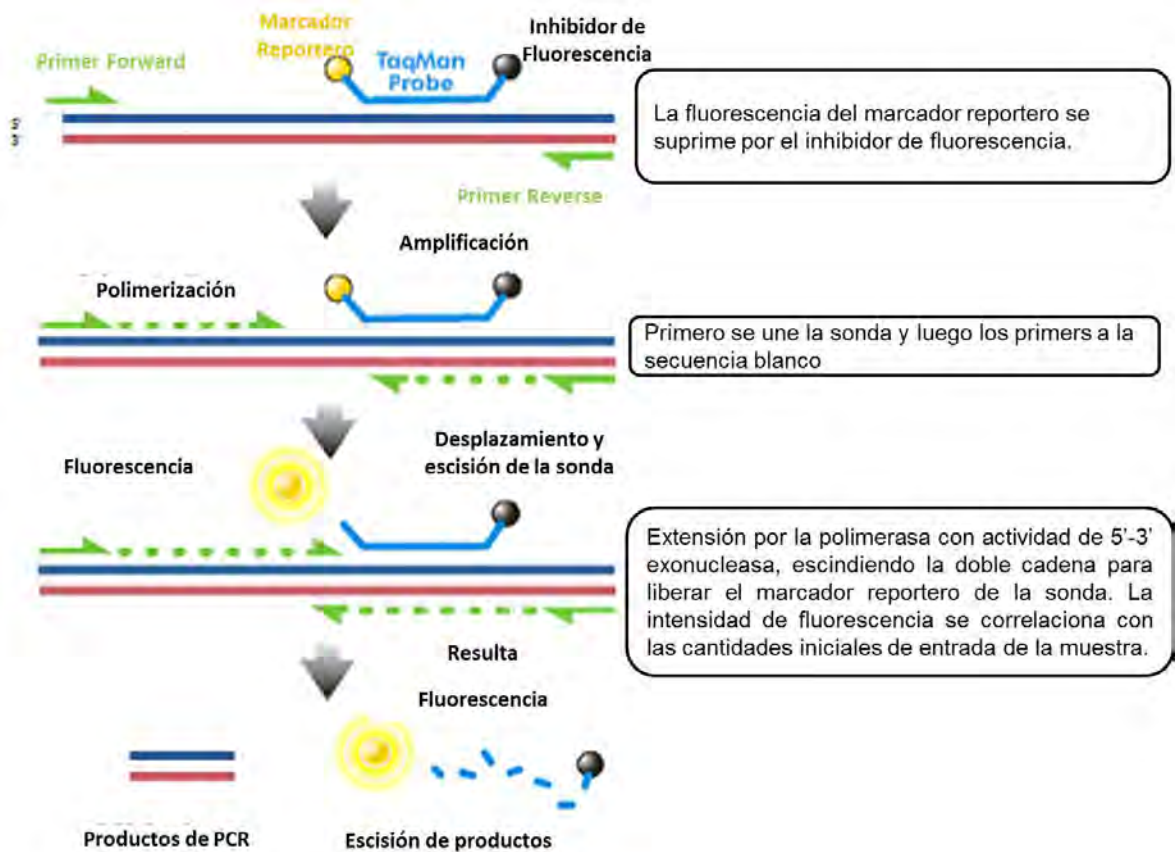


Figura 12. Funcionamiento de la Sonda tipo "Taqman". Adaptado de [1]

6.1 Condiciones de PCR en tiempo real

La sonda y los primers empleados fueron previamente publicados [67] y sus respectivas secuencias se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de los primers y la sonda empleadas en la amplificación del gen 16S rDNA mediante qPCR.

| Reactivo | Secuencia |
|-------------------------|--|
| Forward Primer (16S-F1) | 5'-CGA AAG CGT GGG GAG CAA A-3' |
| Reverse Primer (16S-R1) | 5'-GTT CGT ACT CCC CAG GCG G-3' |
| TaqMan MGB 16S-P1 | 5'- 6FAM -ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA- TAMRA -3' |

La amplificación se realizó en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) bajo condiciones previamente publicadas [67] y se muestran en la Figura 13.

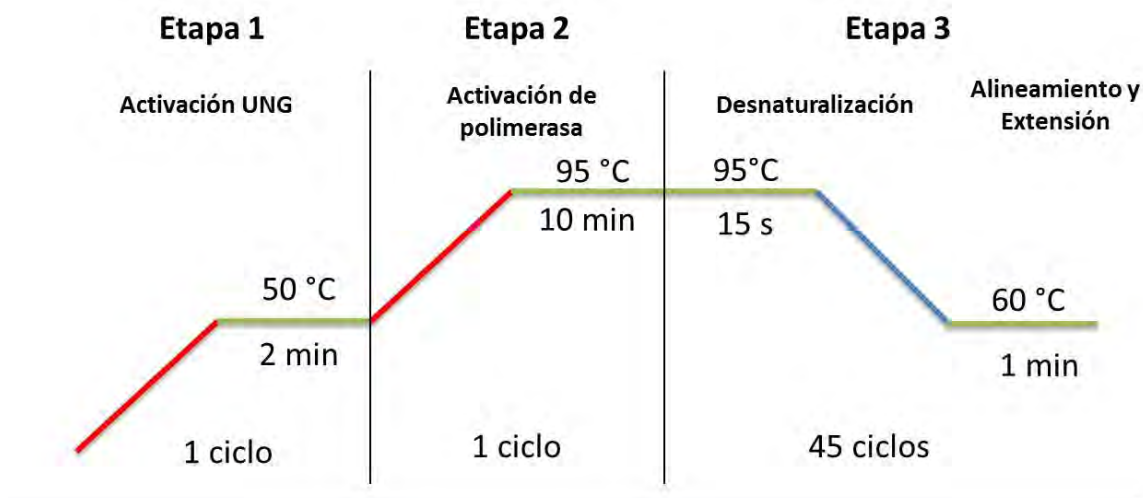


Figura 13. Condiciones de la PCR en tiempo real para la amplificación del gen 16S rDNA. UNG: uracilo-N-glicosilasa que elimina las trazas de DNA de doble cadena.

Se emplearon placas de 96 pozos (Applied Biosystems), cada muestra se hizo por cuadruplicado.

La mezcla de reacción por pozo se encuentra en la Tabla 5. En cada placa, se usó como control negativo de amplificación el Buffer AE y H₂O, ya que fueron empleados para eluir y resuspender el DNA extraído.

Tabla 5. Reactivos empleados en la qPCR por muestra.

| Reactivo | Volumen por pozo (µl) |
|--|------------------------------|
| TaqMan® Universal Master Mix con UNG 2x | 15 |
| Forward Primer (16S-F1) (10 µM) | 1 |
| Reverse Primer (16S-R1) (10 µM) | 1 |
| TaqMan MGB 16S-P1 (5 µM) | 1 |
| H₂O libre de DNA | 9.5 |
| Templado de DNA (20 ng/µL) | 2.5 |
| Volumen Total | 30 |

6.2 Generación de la Curva Estándar

Para generar una curva estándar para este estudio se hicieron 8 diluciones seriales estándar (Std1-Std8) (Figura 14) a partir de DNA extraído de una muestra de heces en buffer de elución (Buffer AE, Kit de extracción) y H₂O. Se usó muestra de heces de un paciente VIH+, ya que esta contenía el gen de interés (16S rDNA). El DNA fue extraído mediante el Kit QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA). La concentración de la solución stock de DNA de heces fue 87.1×10^6 pg/mL. La curva estándar se generó entonces de un rango de 8.71×10^6 (Std1) a 111 pg/mL (Std8) y las concentraciones de las disoluciones estándar se encuentran en la Tabla 6.

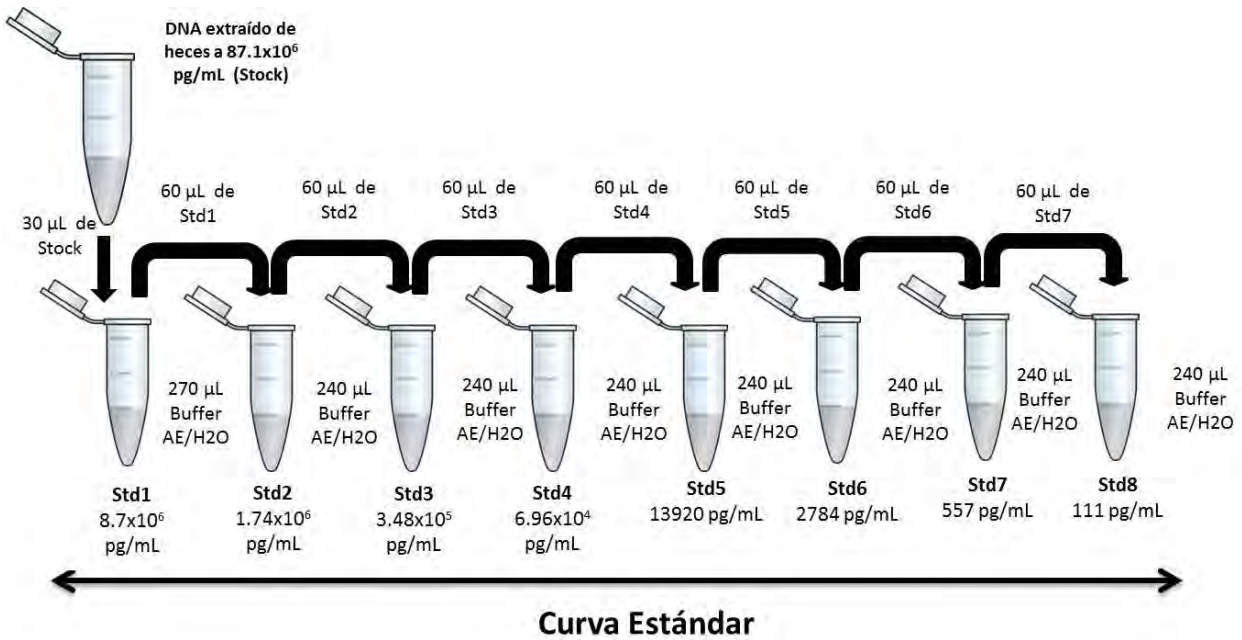


Figura 14. Generación de la curva estándar a partir de una muestra (heces) que contenía el gen 16S rDNA seguido de diluciones seriales.

Tabla 6. Concentraciones de las diluciones estándar e intervalo de la curva estándar.

| Estándares (Std) | Gen 16S rDNA (pg/mL) |
|---------------------|-------------------------|
| Std1 | 8700000 |
| Std2 | 1740000 |
| Std3 | 348000 |
| Std4 | 69600 |
| Std5 | 13920 |
| Std6 | 2784 |
| Std7 | 557 |
| Std8 | 111 |

El software del equipo de qPCR arroja varios gráficos, uno de ellos es el de “Rn vs Número de ciclo” (Figura 15), en este se observa que en el “eje y” se encuentra el “valor Rn” el cual es la fluorescencia normalizada detectada por el láser del equipo de PCR en tiempo real cuando se da la amplificación del gen de interés. En el “eje x” se encuentran el número de ciclos de la PCR en tiempo real. Al ciclo en el cual la señal de fluorescencia es significativa con respecto al control interno de amplificación se le conoce como valor C_T , o bien, “cycle threshold” (ciclo umbral) por sus iniciales en inglés, este valor numérico lo arroja el software del equipo e indica el ciclo a partir del cual se da una señal de amplificación significativa.

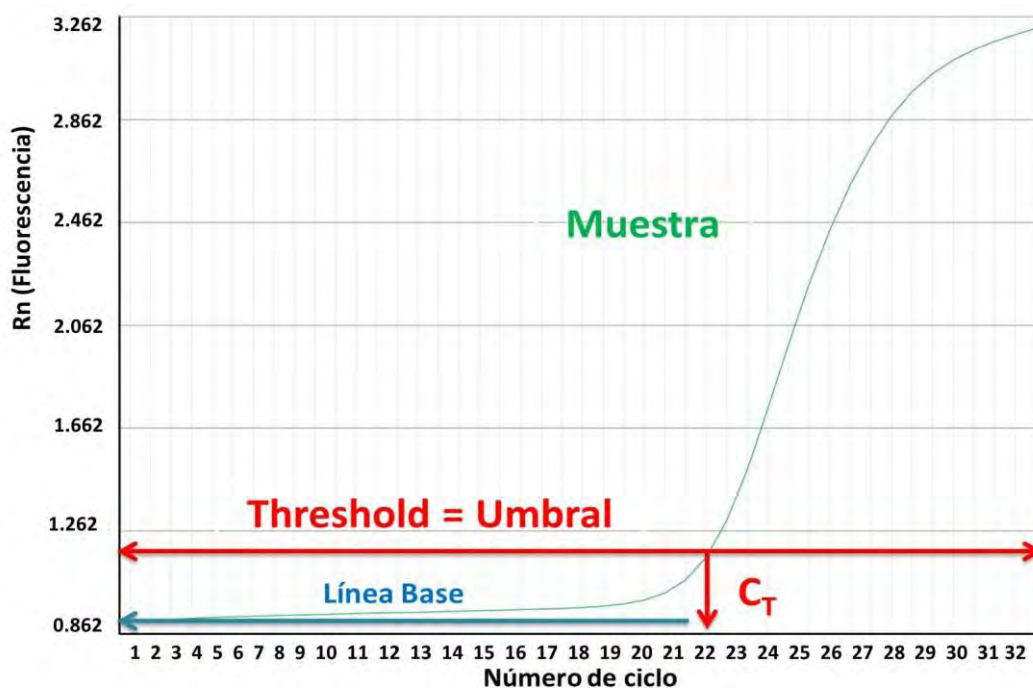


Figura 15. Gráfico “Rn vs Número de ciclo” arrojado por el software del equipo de qPCR.

La disolución estándar 1 (Std1) es la más concentrada y presenta un C_T bajo, ya que entre mayor cantidad del componente a detectar tenga la muestra, este será cuantificado primero, es decir, a un C_T menor. En contraste, la disolución estándar 8 (Std8) es la más diluida por lo que tiene un C_T mayor.

6.3 Estandarización de la PCR en tiempo real

Para estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del gen 16S rDNA, se tomó como parámetro el valor C_T de los controles negativos de amplificación, el Buffer AE y H_2O , ya que hemos determinado que ese valor sería reportado como límite de detección positivo. Se evaluó sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y repetibilidad de la técnica. Para determinar la sensibilidad y especificidad del ensayo, se tomaron en cuenta los valores de C_T del Buffer AE y H_2O , ya que son los controles negativos de amplificación. Se determinó la repetibilidad del ensayo, comparando los C_T de 4 placas idénticas realizadas en días distintos con las diluciones estándar (Std1-Std8). La reproducibilidad se determinó comparando los C_T de dos placas idénticas, una realizada por mí y otra por la tutora en días distintos usando los mismos reactivos y la curva estándar (Std1-Std8).

6.4 Cuantificación del gen 16S rDNA en la cohorte de estudio

Una vez estandarizada la técnica de PCR en tiempo real, se procedió a cuantificar las muestras de la cohorte de estudio por cuadruplicado.

7. Cuantificación de marcadores de translocación microbiana (CD14s) y de daño al epitelio intestinal (I-FABP)

El ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) fue empleado para determinar las moléculas CD14 soluble (CD14s, R&D Quantikine® DC140, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) e I-FABP (Proteína de unión a ácidos grasos en intestino, HK406-02, Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, las muestras de plasma fueron descongeladas a temperatura ambiente (25°C), se centrifugaron a 1500 rpm por 15 minutos y por último fueron diluidas (sCD14 1: 200, I-FABP 1: 2). Las muestras y los estándares de cada kit se midieron por duplicado. El valor promedio se utilizó como referencia. Las placas de ELISA se leyeron en el equipo ELx808 absorbance microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). La cuantificación fue realizada por la Dra. Olivia Briceño, Investigadora del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Los

resultados de dichas cuantificaciones fueron proporcionados por la Dra. Briceño para fines de correlacionar los datos obtenidos del gen 16 rDNA con esos marcadores.

8. Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones entre los grupos de estudio, para el conteo de Linfocitos T CD4+, T CD8+, razón de linfocitos T CD4+/T CD8+, recobro de linfocitos CD4+, carga viral, para la cuantificación de los marcadores de translocación microbiana, gen 16S rDNA y CD14s, y de daño al epitelio intestinal, I-FABP, mediante pruebas no paramétricas. Para comparar los grupos de estudio de la cohorte transversal se empleó la prueba U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis (seguida de una prueba de Dunn para múltiples comparaciones). En el caso del estudio longitudinal se empleó la prueba estadística no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon. Las correlaciones entre los varios marcadores se realizaron mediante el uso de la prueba no paramétrica de Spearman. Todos los análisis estadísticos se hicieron mediante el uso del software GraphPad PRISM 6 empleando un nivel de confianza del 95%. [55]

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

1. PCR en tiempo real: Estandarización y Generación de la Curva Estándar

Para emplear cualquier técnica en un laboratorio se requiere su previa estandarización. Por esta razón, se evaluaron tres parámetros: sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad para la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16S rDNA. Primeramente, se evaluó sensibilidad de la técnica, es decir, hasta qué valor de C_T se podría cuantificar de manera confiable el gen 16S rDNA, para lo cual se tomaron en cuenta los valores de C_T del Buffer AE y H_2O , al graficarlos (enmarcados en el rectángulo color azul de la Figura 16) no se encontró diferencia significativa en la dispersión de los datos. De este modo, se estableció el límite de detección ($C_T=36$) de la técnica qPCR para la cuantificación del gen 16S rDNA, es decir, todo aquello que se detecte con un valor C_T superior a 36 no es significativamente cuantificable como gen 16S rDNA. Se estimó también la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica, ya que las muestras se cuantificarían en distintas placas y días. En la misma Figura 16, se muestran los valores de C_T por cada dilución estándar (Std1-Std8) de las cuatro placas idénticas realizadas por mí en días distintos (repetibilidad). Además, en la Tabla 7 se muestra el promedio y desviación estándar (SD) de los C_T por cada dilución estándar (Std1-Std8) de los cuatro días en que se realizaron las cuantificaciones. Se pudo determinar que la variación entre los datos no fue significativa ($p>0.99$), lo que nos indica que la técnica es reproducible.

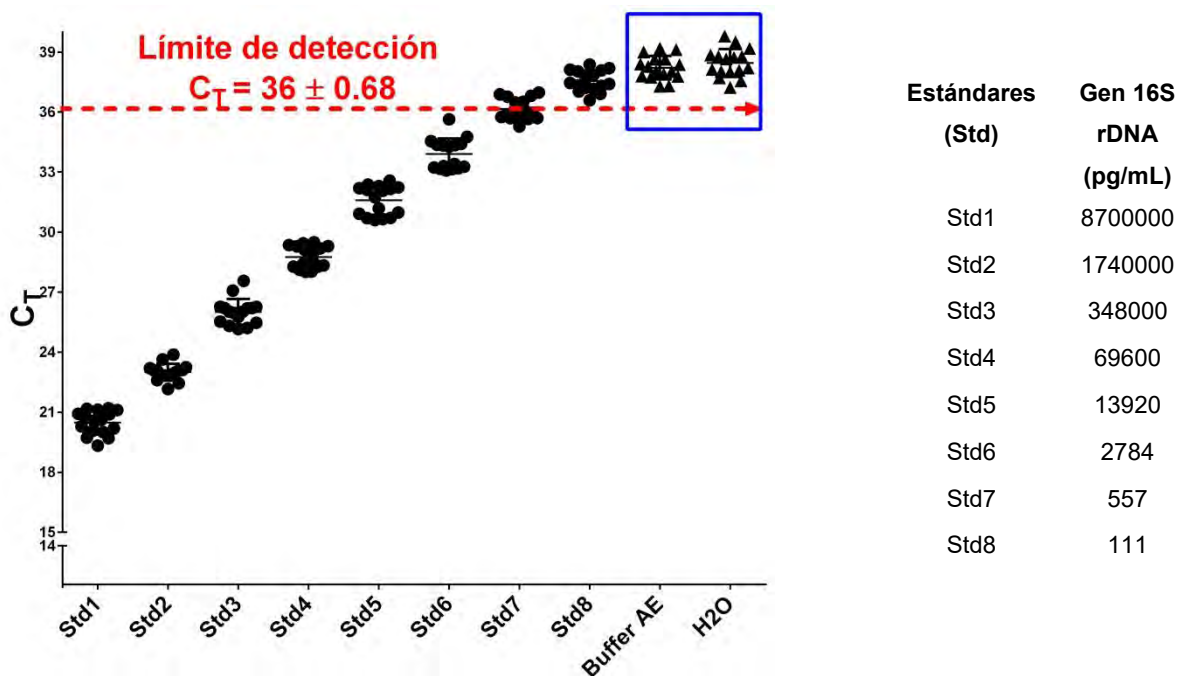


Figura 16. Sensibilidad y repetibilidad de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16SrDNA.

Tabla 7. Repetibilidad de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16SrDNA. Se observa el promedio y la desviación estándar (SD) de los valores C_T de las diluciones estándar (Std1-Std8) de los cuatro días en que se realizó la placa.

| | DÍA 1 (Placa 1) | | DÍA 2 (Placa 2) | | DÍA 3 (Placa 3) | | DÍA 4 (Placa 4) | | <i>p</i> |
|-------------|-----------------|---------|-----------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|----------------|
| | Promedio | SD | Promedio | SD | Promedio | SD | Promedio | SD | |
| Std1 | 20.89 | 0.1981 | 20.05 | 0.2605 | 21.06 | 0.2262 | 20.93 | 0.5289 | <i>p</i> >0.99 |
| Std2 | 23.05 | 0.2168 | 22.52 | 0.2881 | 23.42 | 0.4023 | 23.02 | 0.1103 | <i>p</i> >0.99 |
| Std3 | 25.69 | 0.229 | 25.47 | 0.4919 | 26.19 | 0.1165 | 26.72 | 0.7294 | <i>p</i> >0.99 |
| Std4 | 28.19 | 0.1467 | 28.3 | 0.1949 | 29.24 | 0.1043 | 29.28 | 0.2766 | <i>p</i> >0.99 |
| Std5 | 31.79 | 0.2689 | 31.09 | 0.4541 | 32.28 | 0.2007 | 32.23 | 0.141 | <i>p</i> >0.99 |
| Std6 | 33.21 | 0.04652 | 33.24 | 0.1442 | 34.66 | 0.6557 | 34.52 | 0.1871 | <i>p</i> >0.99 |
| Std7 | 35.83 | 0.186 | 35.66 | 0.2573 | 36.54 | 0.4093 | 36.59 | 0.3944 | <i>p</i> >0.99 |
| Std8 | 37.59 | 0.2379 | 37 | 0.2863 | 37.15 | 0.1514 | 37.46 | 0.5357 | <i>p</i> >0.99 |

La reproducibilidad se determinó comparando los C_T de dos placas idénticas, una realizada por mí (MCT) y otra por la tutora (SPC) en días distintos con las diluciones estándar (Std1-Std8). Se compararon los valores de C_T de ambas placas (Figura 17), y se determinó que la técnica es reproducible ya que no existió diferencia significativa entre la dispersión de los datos de ambas placas ($P > 0.7608$).

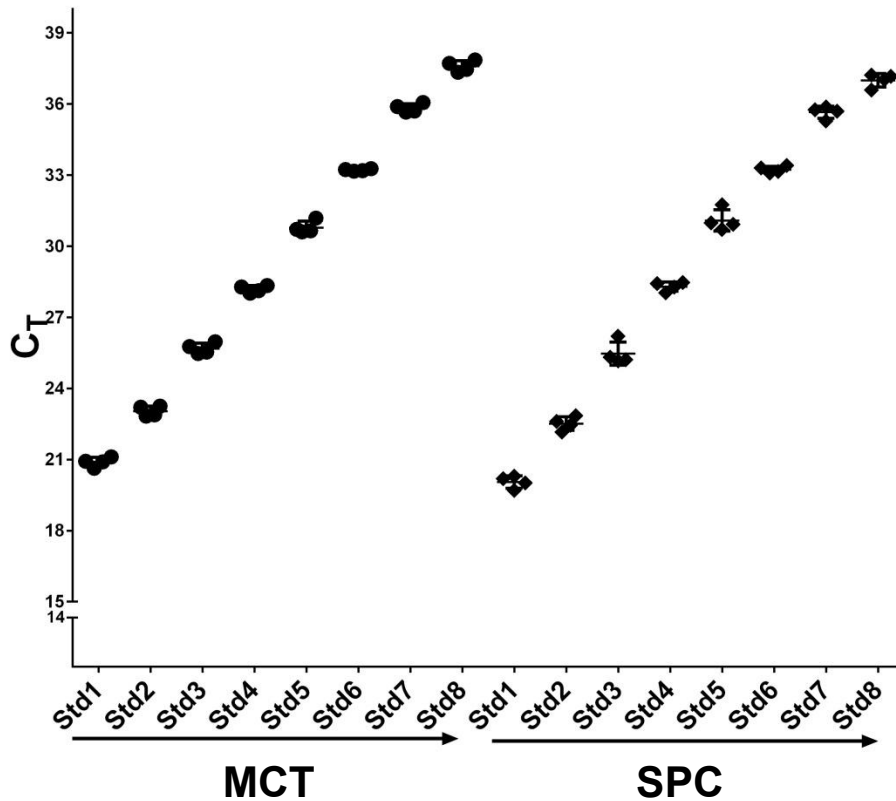


Figura 17. Reproducibilidad de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16S rDNA.

Una vez estandarizada la técnica de qPCR, se utilizó dicha curva estándar (Figura 18) con la finalidad de interpolar muestras de interés en dicha curva, para obtener así la concentración de las mismas.

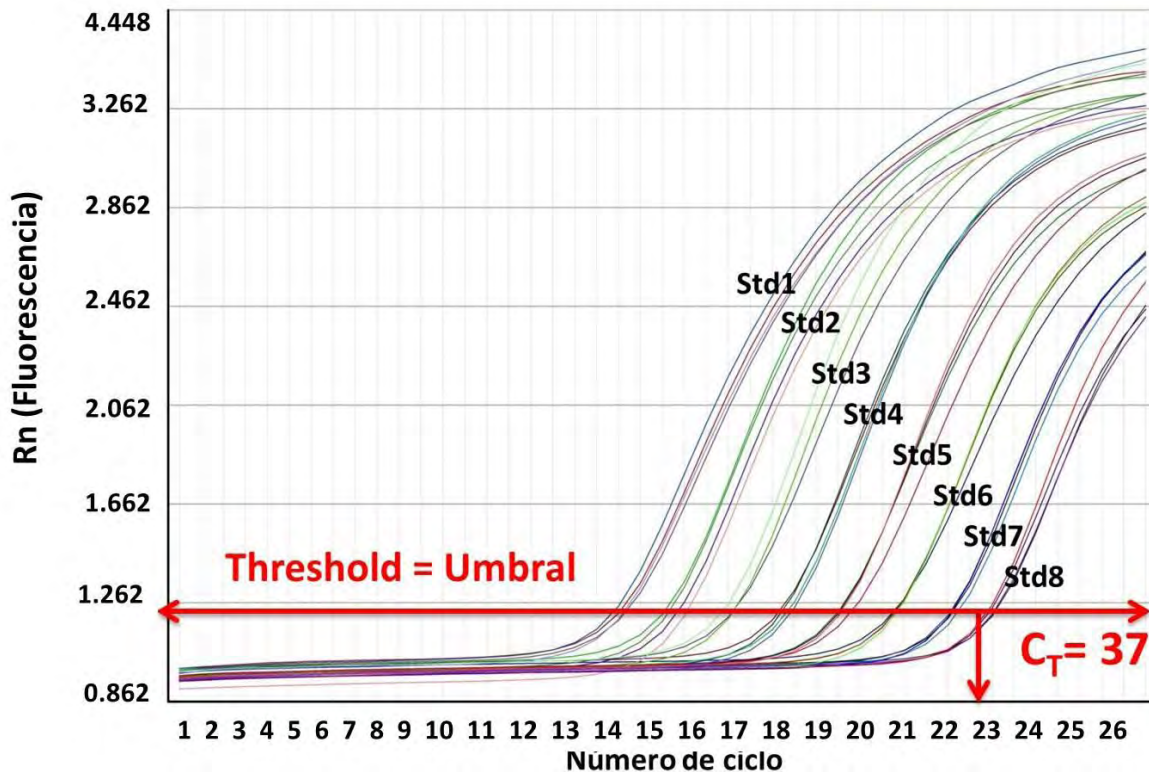


Figura 18. Curva estándar utilizada para cuantificar el gen 16S rDNA en muestras de plasma. Se muestra el gráfico “Valor Rn vs Número de ciclos” arrojado por el software del equipo de qPCR, en el que se observa la curva estándar utilizada para cuantificar el gen 16S rDNA en muestras de plasma.

2. Características clínicas de la cohorte de estudio

2.1 Características de la cohorte transversal

Esta cohorte se compone de 4 grupos de estudio: VIH- (n=10; promedio de conteo de linfocitos T CD4+ = 1017 ± 249.3), VIH+C (n=6; promedio de conteo de linfocitos T CD4+ = 859.5 ± 298.3 ; carga viral = 130.7 ± 159.2), VIH+ nTAR (n=29; promedio de conteo de linfocitos T CD4+ = 406.5 ± 181.9 ; carga viral = $146,300 \pm 261728$) y LdTAR (n=33; promedio de conteo de linfocitos T CD4+ = 536 ± 266.6 ; carga viral indetectable:

<40 copias de RNA del VIH-1/mL). Las características de esta cohorte de estudio se encuentran en la Tabla 8, en donde se muestra el conteo de linfocitos T CD4+, T CD8+, la razón de linfocitos T CD4+/ T CD8+ y la carga viral.

En el grupo de individuos que se encuentran en TAR de larga duración (LdTAR), 18 estaban bajo el esquema de Efavirenz/Tenofovir/Emtricitabina (EFV/TDF/FTC; promedio de conteo de linfocitos T CD4+ = 489.6 ± 254.7) y 15 bajo el esquema de inhibidores de proteasa (IPs: Lopinavir o Atazanavir) potenciados con Ritonavir (promedio de conteo de linfocitos T CD4+ = 591.7 ± 278.5). Ambos con carga viral indetectable (<40 copias de RNA del VIH-1/mL), cuyas características se encuentran en las tablas 8 y 9.

Con la finalidad de explorar el comportamiento clínico en la infección por VIH con o sin TAR en los grupos de estudio, se compararon entre sí, los marcadores clínicos por excelencia, es decir, el conteo de CD4+ y carga viral. Como se esperaba, se encontró que el conteo de linfocitos T CD4+ fue significativamente menor en la infección por VIH con respecto al grupo control, específicamente, el grupo VIH- fue significativamente mayor con respecto al grupo VIH+ nTAR ($p < 0.0001$) y al grupo VIH+ LdTAR ($p = 0.0014$). En cambio, los individuos VIH+ C presentaron un conteo mayor de linfocitos T CD4+ con respecto al grupo VIH+ nTAR ($p = 0.0107$) (Figura 19A). En cuanto al conteo de linfocitos T CD8+ se encontró que el grupo VIH+ nTAR tenía mayor cantidad respecto a los grupos VIH- ($p = 0.008$) y VIH+ LdTAR ($p = 0.0016$) (Figura 19B), lo cual era de esperarse, ya que en la infección por VIH se incrementa estas células para eliminar al virus.

Por su parte, la razón de linfocitos T CD4+/T CD8+ (cociente de la división del conteo de linfocitos T CD4+ entre el de linfocitos T CD8+) se encontró disminuida en los individuos VIH+ con respecto a los individuos sin VIH (VIH+ nTAR $p < 0.0001$ y VIH+ LdTAR $p = 0.0118$). Además, la razón de linfocitos fue mayor en el grupo VIH+ LdTAR con respecto al grupo VIH+ nTAR ($p = 0.0012$) (Figura 19C).

En cuanto a la carga viral, como se esperaba, se encontró una diferencia significativa en el grupo VIH+ nTAR con respecto a los grupos VIH+ LdTAR ($p < 0.0001$) y a los VIH+ C ($p = 0.0158$) (Figura 19D).

Con la finalidad de conocer el impacto de los distintos regímenes (Efavirenz: EFV/TDF/FTC e inhibidores de proteasa: IP) de tratamiento sobre la actividad inmune en la infección por VIH, se compararon ambos regímenes con el grupo VIH- (Figura 20). Se encontró que el conteo de linfocitos T CD8+ fue mayor en el grupo bajo el régimen de inhibidores de proteasa con respecto al de Efavirenz ($p = 0.0147$) (Figura 20B). Además, como se esperaba, se halló que el conteo de linfocitos T CD4+ fue significativamente mayor en el grupo VIH- que con respecto a los grupos con TAR, Efavirenz ($p = 0.0002$) e inhibidores de proteasa ($p = 0.0135$) (Figura 20A). Asimismo, la razón de linfocitos T CD4+/ T CD8+, se observó una diferencia mayor significativa en los individuos VIH- con respecto a los LdTAR, Efavirenz ($p = 0.0011$) e IP ($p = 0.0003$) (Figura 20C).

Tabla 8. Características clínicas de la cohorte del estudio transversal.

| ESTUDIO TRANSVERSAL | | | | |
|---|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Grupo | VIH- (n=10) | VIH+ nTAR (n=29) | VIH+ LdTAR (n=33) | VIH+ C (n=6) |
| Datos Clínicos | Promedio ± SD (mínimo-máximo) | | | |
| Conteo de Linfocitos T CD4+ (células/ μ L) | 1017 ± 249.3 (617 - 1468) | 406.5 ± 181.9 (81 - 821) | 536 ± 266.6 (235 - 1297) | 859.5 ± 298.3 (482 - 1160) |
| Conteo de Linfocitos T CD8+ (células/ μ L) | 686.9 ± 294.6 (460 - 1404) | 1153 ± 532.3 (57 - 2224) | 725.6 ± 275.6 (219 - 1502) | 1184 ± 633.4 (619 - 2098) |
| Razón de Linfocitos T CD4+/CD8+ | 1.612 ± 0.4957 (0.6873 - 2.544) | 0.9155 ± 2.704 (0.0825 - 1.44) | 0.7746 ± 0.3085 (0.2385 - 1.416) | 0.8342 ± 0.3889 (0.498 - 1.581) |
| Carga Viral (copias RNA VIH- 1/mL) | | 146300 ± 261728 (900 - 1312000) | Indetectable (< 40) | 130.7 ± 159.2 (40 - 447) |

Tabla 9. Características clínicas del grupo bajo TAR de larga duración por régimen.

| ESTUDIO TRANSVERSAL LdTAR | | |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | EFV/TDF/FTC (n=18) | Inhibidores de proteasa (n=15) |
| Datos Clínicos | Promedio ± SD (mínimo-máximo) | |
| Conteo de Linfocitos T CD4+ (células/ μ L) | 489.6 ± 254.7 (235 - 1297) | 591.7 ± 278.5 (240 - 1177) |
| Conteo de Linfocitos T CD8+ (células/ μ L) | 613.6 ± 191.6 (219 - 916) | 860 ± 306 (390 - 1502) |
| Razón de T CD4+/CD8+ | 0.814 ± 0.298 (0.4188 - 1.416) | 0.7272 ± 0.3244 (0.2385 - 1.369) |

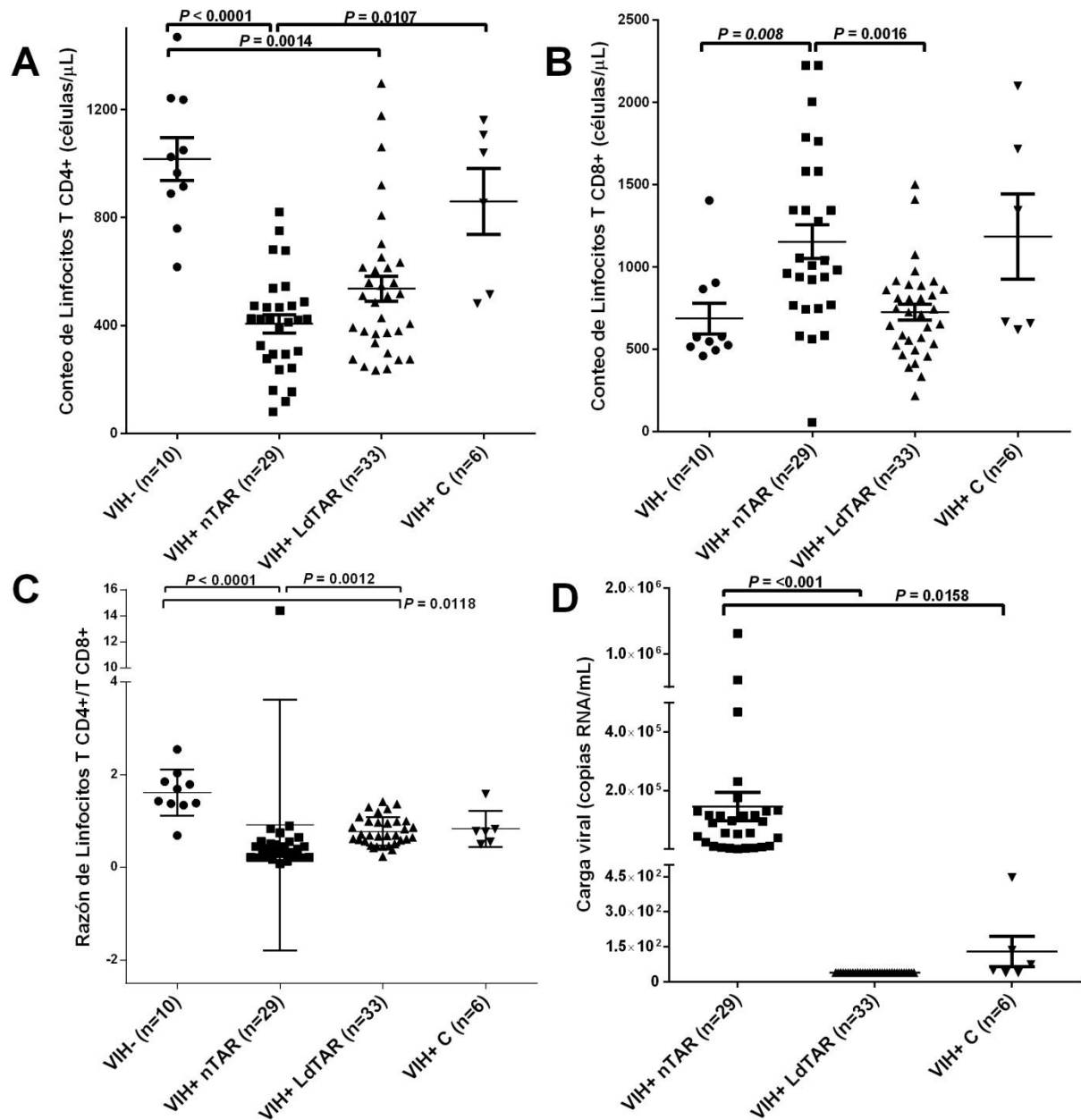


Figura 19. Comparación de los datos clínicos de la cohorte del estudio transversal. Se muestran el conteo de linfocitos T CD4+ (A), T CD8+ (B), razón de linfocitos T CD4+/T CD8 (C) y la carga viral (copias de RNA del VIH-1/mL) (D). Se empleó la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney. Gráficos de tipo “Promedio y desviación estándar (SD)” realizada en el software GraphPad PRISM 6.

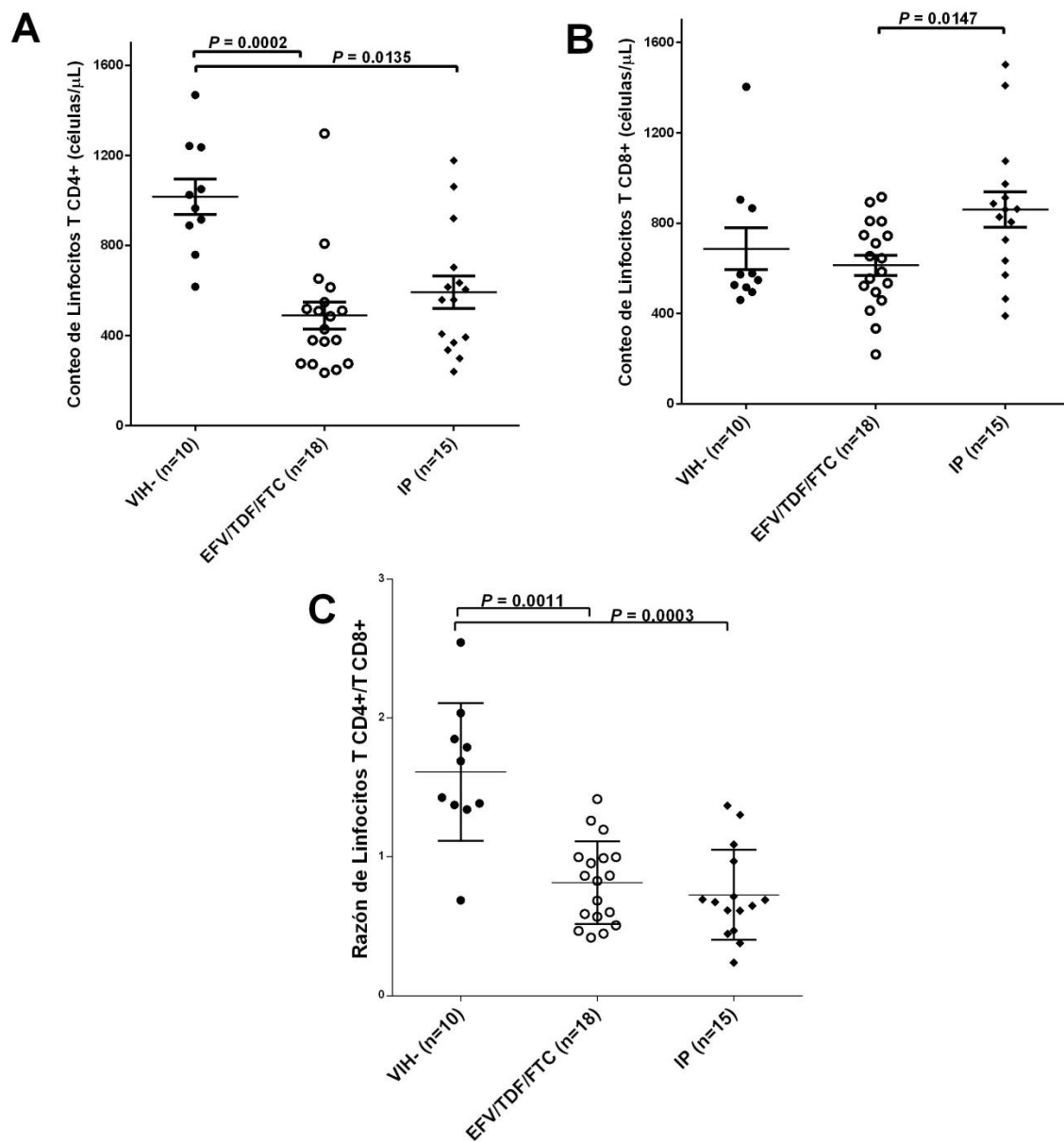


Figura 20. Comparación de los datos clínicos del grupo LdTAR bajo distintos regímenes de TAR (Efavirenz: EFV/TDF/FTC e inhibidores de proteasa: IP). Se muestran el conteo de linfocitos T CD4+ (A), T CD8+ (B), razón de linfocitos T CD4+/T CD8 (C). Se empleó la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney. Gráficos de tipo “Promedio y desviación estándar (SD)” realizada en el software GraphPad PRISM 6.

2.2 Características de la cohorte longitudinal

La cohorte del estudio longitudinal consistió en 9 individuos infectados con VIH vírgenes a TAR que al momento del reclutamiento iniciaron con TAR basado en un esquema de un INNTR y dos INTRs (Efavirenz/Tenofovir/Emtricitabina: EFV/TDF/FTC). Posteriormente, se les dio seguimiento a los 6 (n=9), 12 (n=6), 18 (n=4) y 24 meses (n=1) después de comenzar el TAR. A los 12, 18 y 24 meses se fueron perdiendo individuos, esto debido a que no asistían a su respectiva consulta, por lo que no se les consiguió dar el seguimiento adecuado. Las características clínicas propias de esta cohorte se encuentran en la Tabla 10.

El promedio del conteo de linfocitos T CD4+ al reclutamiento (basal) fue 360.6 ± 152.8 (células/ μ L) (Tabla 10), el cual, a los 6 meses de iniciar con el tratamiento se incrementó de manera significativa ($p = 0.0352$) (Figura 21A). Además, según el promedio del conteo de estos linfocitos, se continuaron incrementando a los 12 y 18 meses de iniciar el TAR. Por el contrario, el conteo de linfocitos CD8+ disminuyó paulatinamente durante los 6, 12, 18 y 24 meses de recibir TAR (Figura 21B y Tabla 10). En tanto a la razón de linfocitos T CD4+/T CD8+, como se esperaba, se incrementó significativamente a los 6 ($p = 0.0039$) y 12 ($p = 0.0313$) meses de comenzar el tratamiento (Figura 21C). El recobro de linfocitos T CD4+ (ganancia o pérdida de linfocitos T CD4+ en un lapso de tiempo) presentó variabilidad según el individuo de acuerdo a sus linfocitos CD4+ basales (Figura 21D). Como era de esperarse, a los 6 meses de tratamiento, la carga viral disminuyó a nivel indetectables y se mantuvo suprimida a los 12, 18 y 24 meses de TAR (Figura 21E).

Tabla 10. Características clínicas de la cohorte del estudio longitudinal.

| ESTUDIO LONGITUDINAL | | | | | |
|---|--|--|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Grupos | VIH+ TAR t=0 (n=9) (Basal) | VIH+ TAR t=6 meses (n=9) | VIH+ TAR t=12 meses(n=6) | VIH+ TAR t=18 meses (n=4) | VIH+ TAR t=24 meses (n=1) |
| Datos Clínicos | Promedio ± SD (mínimo-máximo) | | | | |
| Conteo de Linfocitos T CD4+ (células/μL) | 360.6 ± 152.8 (81 - 538) | 490.9 ± 274.5 (173 - 1075) | 534.8 ± 312.8 (213 -932) | 651 ± 273.6 (317 - 902) | 338 |
| Conteo de Linfocitos T CD8+ (células/μL) | 1347 ± 507.8 (748 - 2224) | 1028 ± 486 (340 - 1719) | 833 ± 385.8 (431 -1452) | 824.33 ± 199.5 (626 - 1051) | 221 |
| Razón de T CD4+/CD8 | 0.2763 ± 0.1196 (0.08245 – 0.4483) | 0.4811 ± 0.1248 (0.2921 – 0.6307) | 0.6212 ± 0.1948 (0.3652 – 0.9262) | 0.7657 ± 0.1924 (0.7657 – 0.9709) | 1.529 |
| Recobro T CD4+ | | 148.5 ± 236.6 (10 – 689) | 237.8 ± 196.7 (40 – 430) | 93.5 ± 14.85 (83 – 104) | 21 |
| Carga Viral (copias RNA VIH-1/mL) | 1106697 ± 143884 (900 – 468675) | 42.89 ± 8.038 (40 - 61) | Indetectable (<40) | Indetectable (<40) | Indetectable (<40) |

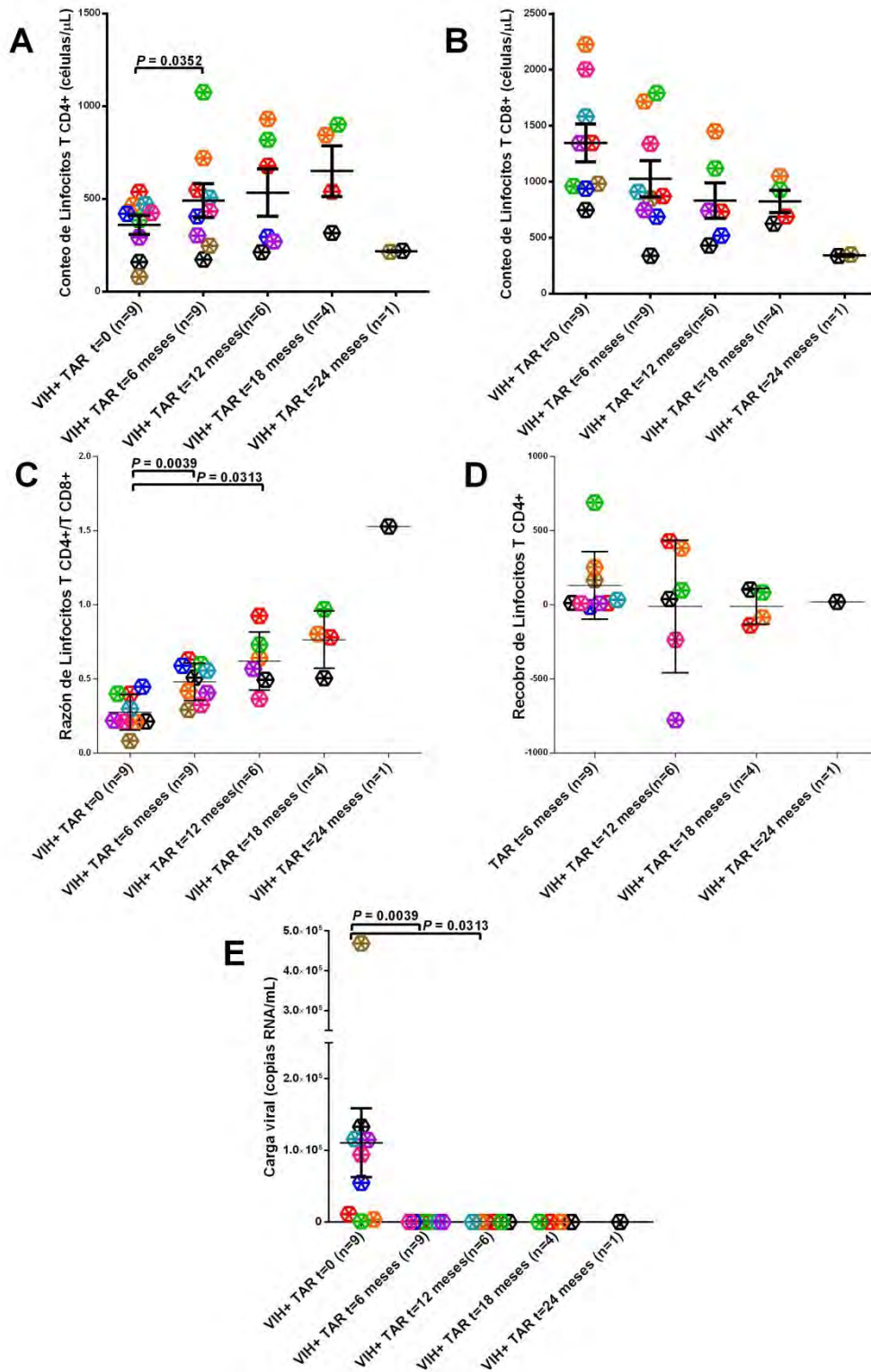


Figura 21. Comparación de datos clínicos de la cohorte del estudio longitudinal. Se muestran el conteo de linfocitos T CD4+ (A), T CD8+ (B),

razón de linfocitos T CD4+/T CD8 (C), recobro de linfocitos T CD4+ (D) y carga viral (copias de RNA del VIH-1/mL) (E), a los tiempos (meses) t=0, t=6, t=12, t=18 y t=24 del uso de TAR en individuos infectados con VIH. Cada color representa a un individuo. Se empleó la prueba estadística no paramétrica “Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon”. Gráficos de tipo “Promedio y desviación estándar (SD)” realizada en el software GraphPad PRISM 6.

2.3 Cuantificación del Gen 16S rDNA en plasma de la cohorte de estudio

Se cuantificó el gen 16S rDNA en plasma en la cohorte de estudio con fines de evaluar la translocación bacteriana en individuos infectados por VIH. Se encontraron niveles mayores del gen en los grupos VIH+ LdTAR ($p = 0.0321$) (Figura 22A) y en el que está bajo el esquema de Efavirenz ($p = 0.0358$) (Figura 22B). En contraste, en el estudio longitudinal, no existieron variaciones significativas en la cuantificación del gen a los distintos meses de seguimiento, lo cual se puede atribuir al bajo número de muestras. Sin embargo, la cantidad del gen tendió a disminuir durante el seguimiento con TAR a los 6, 12, 18 y 24 meses (Figura 22C).

2.4 Cuantificación de CD14s en plasma de la cohorte de estudio

Por lo que respecta al marcador de translocación bacteriana CD14s, se encontró una diferencia significativamente menor en el grupo VIH- con respecto a los grupos VIH+ C ($p = 0.0225$) y VIH+ LdTAR ($p = 0.0348$) (Figura 23A). Además, los individuos bajo el régimen de inhibidores de proteasa presentaron niveles incrementados ($p = 0.0199$) (Figura 23B).

En el estudio longitudinal, se observó un incremento gradual de los niveles de CD14s a partir del inicio de TAR y en los meses subsecuentes de monitoreo (Figura 23C). Por otra parte, como se esperaba, los niveles de CD14s y del gen 16S rDNA presentaron una correlación significativa en la cohorte de estudio ($r = 0.2553$; $p = 0.0089$) (Figura 23D).

2.5 Cuantificación de I-FABP en plasma de la cohorte de estudio

Para evaluar el daño a epitelio intestinal, se midió el marcador I-FABP, encontrándose niveles incrementados en el grupo VIH+ C con respecto a los grupos VIH- ($p = 0.0039$) y VIH+ nTAR ($p = 0.0013$). Además, hubo una diferencia mayor significativa en el grupo VIH+ LdTAR con respecto al grupo VIH+ nTAR ($p = 0.019$) (Figura 24A). También, se cuantificaron niveles mayores en los individuos bajo el régimen de inhibidores de proteasa que en los individuos VIH- ($p = 0.0002$) y bajo el esquema de Efavirenz ($p = 0.0009$) (Figura 24B). Además, los niveles de I-FABP se asociaron con los de CD14s en sujetos con tratamiento de inhibidores de proteasa ($r = 0.4540$; $p = 0.0391$) (Figura 25). Asimismo, se observó un incremento gradual en los niveles de I-FABP a los 6, 12 y 18 meses de comenzar el TAR (Figura 24C). Por otra parte, se asociaron el marcador I-FABP y los niveles del gen 16S rDNA ($r = 0.35$; $p = 0.2809$) pero dicha correlación no fue significativa (Figura 24D).

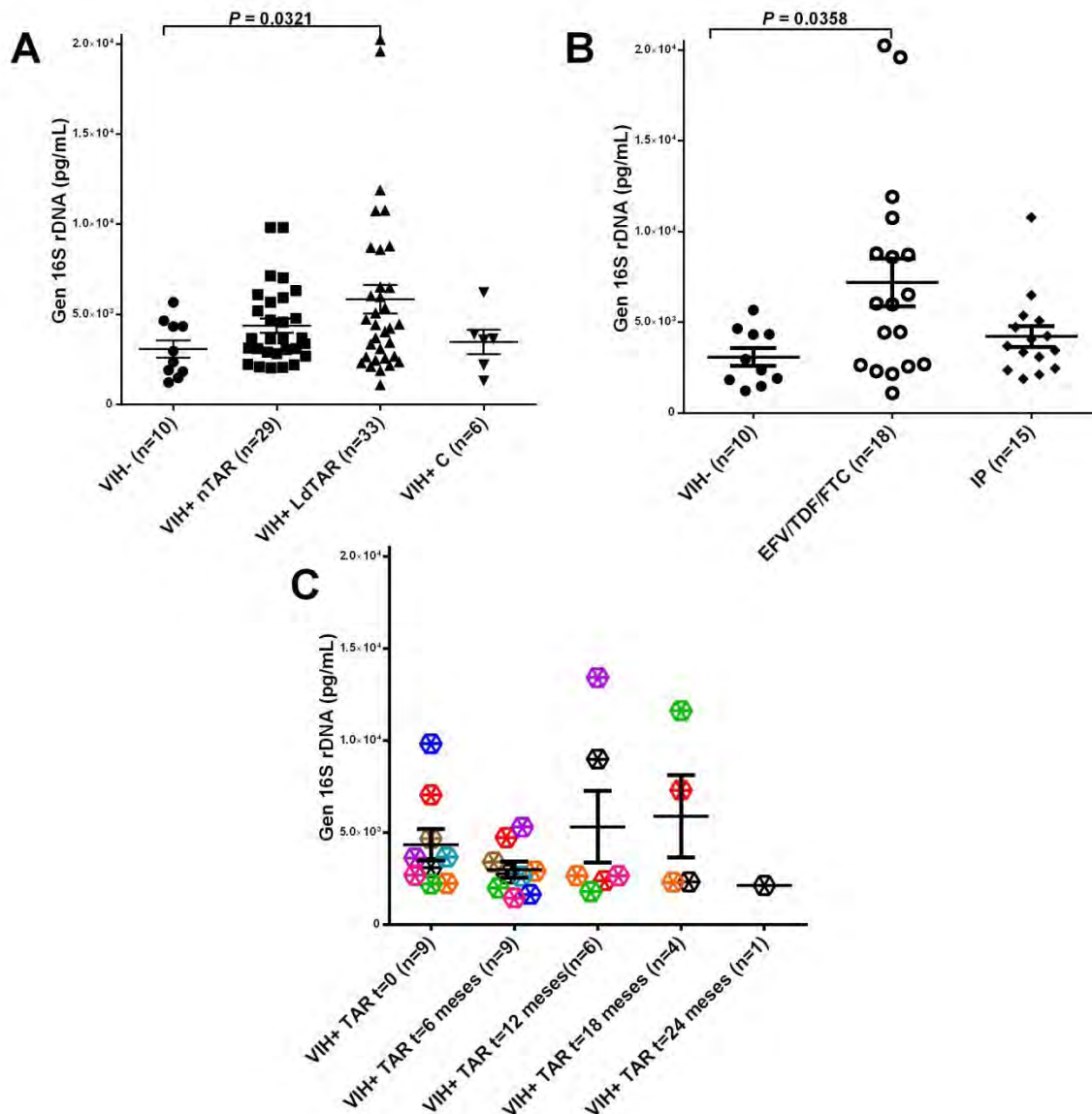


Figura 22. Comparación de la cuantificación del Gen 16S rDNA en la cohorte de estudio (A) transversal, (C) longitudinal (cada color representa a un individuo) y según el régimen de TAR (B). Se emplearon las pruebas estadísticas no paramétricas U de Mann-Whitney (A y B) y prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (C). Gráficos de tipo “Promedio y desviación estándar (SD)” realizada en el software GraphPad PRISM 6.

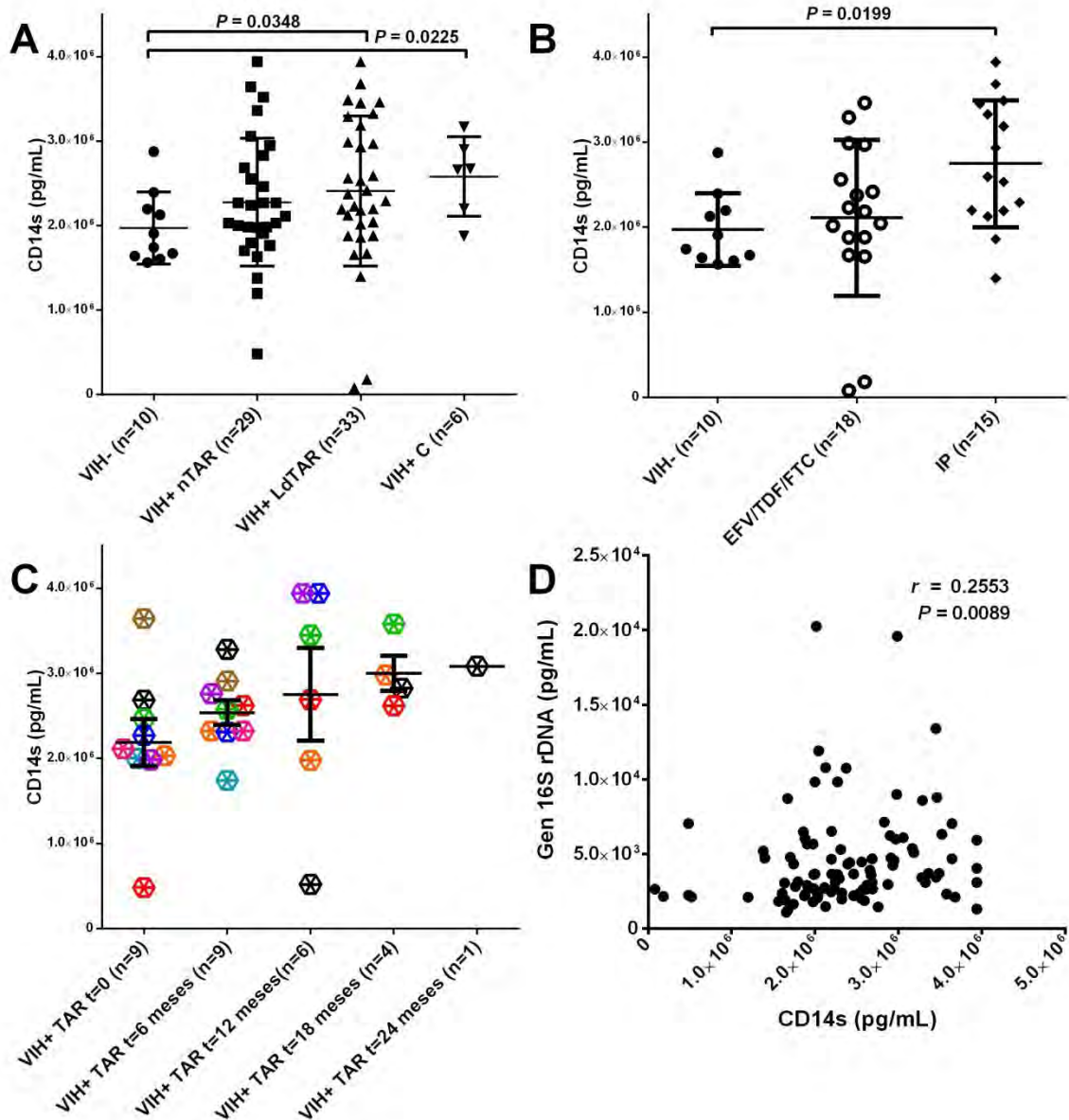


Figura 23. Comparación de la cuantificación de CD14s en la cohorte de estudio (A) transversal, (C) longitudinal (cada color representa a un individuo), (B) según el régimen de TAR y (D) Correlación entre CD14s y el Gen 16S rDNA de la cohorte de estudio. Se emplearon las pruebas estadísticas no paramétricas U de Mann-Whitney (A y B), prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (C) y correlación de Spearman (D). Gráficos de tipo “Promedio y desviación estándar (SD)”(A, B y C) y “Solo puntos” (D) realizada en el software GraphPad PRISM 6.

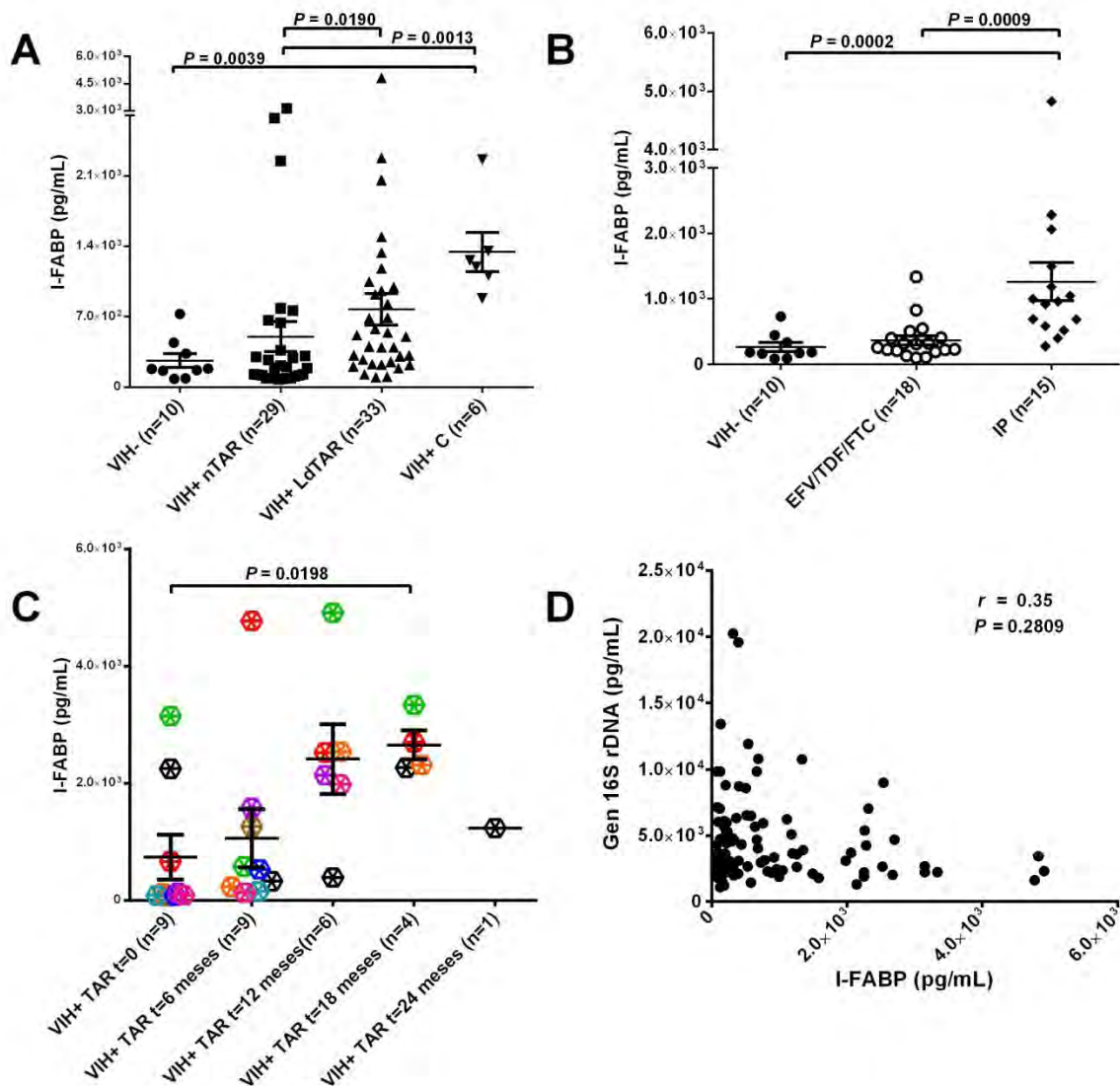


Figura 24. Comparación de la cuantificación de I-FABP, en la cohorte de estudio (A) transversal, (C) longitudinal (cada color representa a un individuo), (B) según el régimen de TAR y (D) Correlación entre I-FABP y el Gen 16S rDNA. Se emplearon las pruebas estadísticas no paramétricas U de Mann-Whitney (A y B), prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (C) y correlación de Spearman (D). Gráficos de tipo “Promedio y desviación estándar (SD)”(A, B y C) y “Solo puntos” (D) realizada en el software GraphPad PRISM 6.

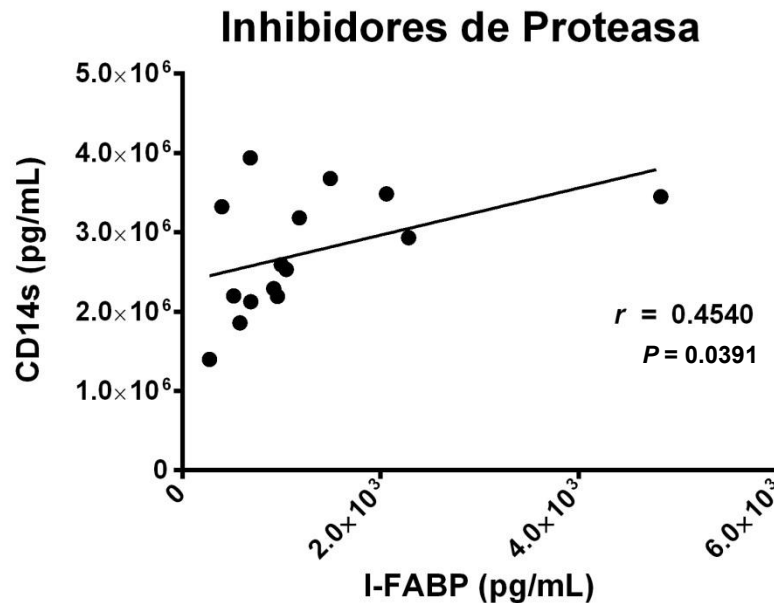


Figura 25. Correlación entre CD14s e I-FABP en individuos bajo el esquema de inhibidores de proteasa. Se empleó la prueba estadística no paramétrica de correlación de Spearman. Gráfico de tipo “Solo puntos” realizada en el software GraphPad PRISM 6.

2.6 Asociación de la recuperación linfocitaria con niveles del Gen 16S rDNA en TAR de larga duración y con el marcador CD14s sin TAR

Para explorar la asociación entre la translocación bacteriana y la recuperación linfocitaria mediante el incremento del recuento de linfocitos T CD4+ en circulación periférica en sujetos con TAR de larga duración, se correlacionaron los niveles del gen 16S rDNA con el conteo de dichos linfocitos. Como se esperaba, al incrementar el número de células CD4+, los niveles del gen 16S disminuyeron ($r = -0.3069$; $p = 0.0429$) (Figura 26A). En contraste, en individuos vírgenes a TAR, se halló una asociación entre el aumento de linfocitos CD4+ con una disminución del marcador CD14s ($r = -0.5310$; $p = 0.003$) (Figura 26B).

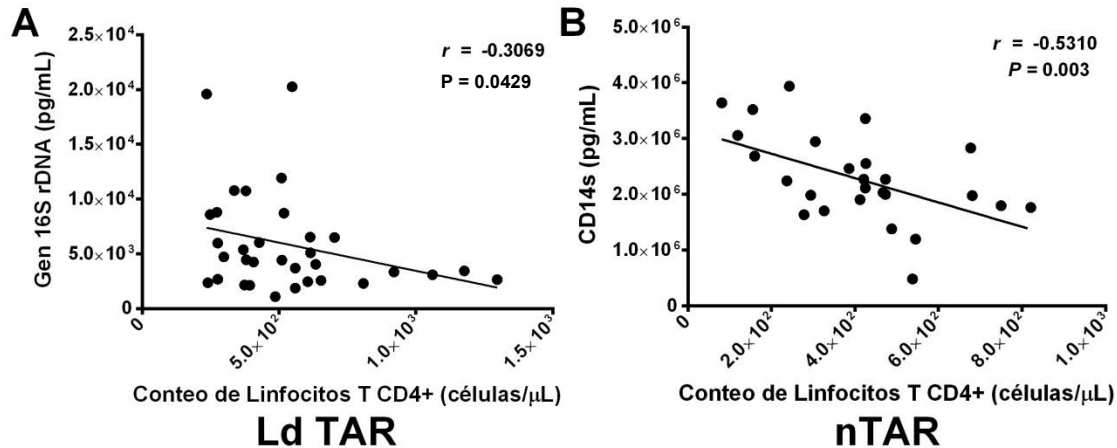


Figura 26. Asociación de la recuperación del conteo de CD4+ con niveles del Gen 16S rDNA en TAR de larga duración (A) y con el marcador CD14s sin TAR (B). Se empleó la prueba estadística no paramétrica de correlación de Spearman. Gráfico de tipo “Solo puntos” realizada en el software GraphPad PRISM 6.

Ya que los individuos controladores se definen por mantener una carga viral menor a 2000 copias de RNA del VIH-1/mL por lo menos 1 año seguido y sin tratamiento, es importante conocer qué asociación existe entre la translocación bacteriana, el sistema inmune y la carga viral en la infección por VIH. Se encontró una relación entre el conteo de linfocitos T CD4+ y el marcador 16S rDNA ($r = -0.54$; $p = 0.029$) (Figura 27A). Además, se halló una correlación entre I-FABP y la carga viral ($r = -0.67$; $p = 0.016$) (Figura 27B). Y por último, se encontró una asociación entre CD14s e I-FABP ($r = 0.6$; $p = 0.024$) (Figura 27C).

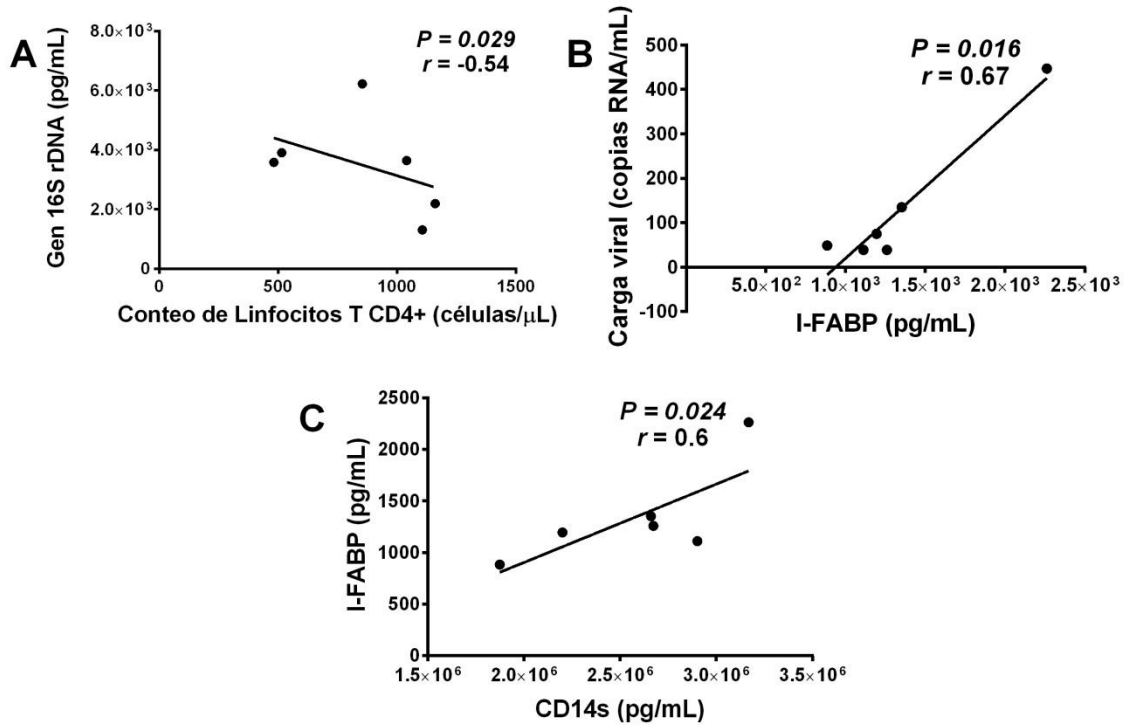


Figura 27. Asociación entre marcadores de translocación bacteriana (C) y el sistema inmune (A), la carga viral e I-FABP (B) en la infección por VIH en individuos controladores. Se empleó la prueba estadística no paramétrica de correlación de Spearman. Gráfico de tipo “Solo puntos” realizada en el software GraphPad PRISM 6.

CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se cuantificó el gen 16S rDNA en plasma de individuos infectados por VIH-1 mediante PCR en tiempo real con la finalidad de coadyuvar en el estudio de la translocación bacteriana en dicha infección con o sin tratamiento. Varios estudios han cuantificado el gen 16S rDNA por PCR en tiempo real (Tabla 3), sin embargo, en su mayoría coinciden en las desventajas de dicha cuantificación, debido a que los kits de extracción de DNA pueden generar resultados de tipo falsos positivos, ya que contienen trazas de DNA bacteriano en los reactivos [60], es por esta razón que dicha técnica se estandarizó para ser empleada de manera rutinaria en el laboratorio.

En este estudio se analizaron distintos grupos de individuos infectados por VIH para observar cómo es que se ve modificada la translocación bacteriana bajo diversas condiciones. Además, se analizaron individuos que usan distintos regímenes de TAR y a los capaces de controlar la infección sin el uso de tratamiento.

La cohorte de estudio fue principalmente constituida por varones adultos jóvenes, lo cual era de esperarse debido a que la epidemia en México está dominada por este grupo [6].

Con respecto a los resultados obtenidos, fue evidente que el uso de TAR induce reconstitución inmune en circulación periférica en personas infectadas con VIH, ya que los individuos con TAR de larga duración presentaron un conteo de linfocitos CD4+ superior a los sujetos vírgenes a tratamiento, esto ha sido reportado [55]. De igual manera, en el estudio longitudinal se observó que al iniciar el TAR el número de estos linfocitos se fue incrementando a lo largo de su seguimiento, lo cual refuerza la idea de dicha reconstitución inmune promovida por el tratamiento [57]. No obstante, los individuos controladores tuvieron aún mayor número de linfocitos T CD4+, lo cual es asociado a que estos sujetos tienen un sistema inmune más eficiente. En contraste, como se ha reportado [55], el número de linfocitos T CD8+ aumentó en la infección, pero

con el uso de TAR estas células disminuyeron considerablemente, aunque no se igualan a los valores encontrados en los individuos sanos.

El incremento en la razón de linfocitos T CD4+/CD8+ también se vio favorecido con el uso de TAR, lo que nos informa acerca de la restauración del sistema inmune en circulación periférica inducida por el tratamiento [57]. Además, como bien es conocido, el uso de TAR llevo a niveles indetectables la carga viral.

Como se ha reportado, la translocación bacteriana en la infección por VIH es uno de las causas de la activación inmune persistente, debido a que la disfunción en la mucosa intestinal permite el paso de productos bacterianos a través del lumen intestinal a la circulación periférica [54, 56]. En la presente investigación se compararon los niveles de marcadores de translocación bacteriana (gen 16S rDNA y CD14s) y de disfunción intestinal (I-FABP) medidos en plasma de sujetos infectados con VIH que reciben o no tratamiento antirretroviral, con la finalidad de informarnos acerca del comportamiento de dicha translocación bacteriana en esta infección.

En investigaciones previas [55, 61, 64], se ha encontrado que los niveles plasmáticos del gen 16S rDNA son significativamente mayores en individuos infectados por VIH que en sujetos no infectados, lo cual también se encontró en la cohorte del presente estudio, no obstante, los individuos bajo TAR de larga duración mostraron aún niveles mayores del gen que los individuos sin tratamiento, además, tres de los 9 individuos del estudio longitudinal presentaron niveles incrementados a los 12 y 18 meses de recibir tratamiento. Lo que en conjunto sugiere que el uso de TAR no normaliza completamente los niveles plasmáticos del gen 16S rDNA, quizá por el daño intestinal irreversible previo a la toma de tratamiento y/o el estilo de vida del sujeto, pues es importante mencionar, que la translocación bacteriana no es un fenómeno restringido a la infección por VIH, ya que se ha reportado en varias enfermedades, tales como, enfermedades inflamatorias del intestino, cardiovasculares, en la infección por virus de la hepatitis C, alcoholismo, entre otras [30-40].

Con respecto al CD14s, debemos recordar que es un marcador de activación de monocitos y macrófagos, por lo que no es un marcador directo y específico de translocación bacteriana *per se*, sin embargo, nos informa acerca de la activación inmune en la infección por VIH. En la cohorte de estudio, se encontraron mayores niveles de CD14s en los sujetos infectados por VIH que en los sanos, además, al iniciar el tratamiento los niveles de CD14s tuvieron tendencia a elevarse a los 6, 12, 18 y 24 meses de recibir TAR, lo cual sugiere que la replicación viral residual conlleva a una activación inmune persistente [69], en particular la de monocitos y macrófagos, por lo que no solo es causa de translocación bacteriana. Para conocer la asociación más directa entre CD14s y translocación bacteriana, se correlacionaron los niveles de este marcador con los del gen 16S rDNA y como era de esperarse, se encontró una relación consistente entre ambos marcadores.

Recientemente, los niveles plasmáticos de I-FABP se ha propuesto como marcador de disfunción intestinal y ya que en la infección por VIH se genera una importante pérdida de células T CD4+ que afecta directamente la mucosa del TGI [54], se midió este marcador en el plasma de la cohorte de estudio para evaluar si el daño a epitelio intestinal se asocia con la translocación bacteriana en la infección por VIH. Según los resultados, en individuos controladores, fue evidente el incremento de I-FABP sobre los demás grupos, además, este marcador presentó asociaciones directamente proporcionales con la carga viral y CD14s, lo cual es razonable, ya que los sujetos controladores mantienen una replicación viral controlada [70], que eventualmente podría generar un continuo y progresivo daño en la mucosa intestinal. Sorprendentemente, los individuos bajo TAR de larga duración presentaron mayores niveles en comparación con los sujetos vírgenes a tratamiento, además, al iniciar el tratamiento los niveles del marcador I-FABP tendieron a elevarse durante los 6, 12, 18 y 24 meses de recibirlo, lo que en conjunto sugiere que el uso de TAR no conduce a la restauración inmune en mucosas, por lo que, el daño al epitelio intestinal sigue siendo importante aún bajo tratamiento, quizá debido a la toxicidad de los antirretrovirales [71]. Por su parte, los niveles de I-FABP no mostraron una

correlación con los del gen 16S rDNA, lo cual difiere con lo reportado sobre que el daño al epitelio podría favorecer la translocación bacteriana en la infección por VIH [53, 54].

En investigaciones anteriores [55], altos niveles del gen 16S rDNA durante el tratamiento antirretroviral se han asociado con un débil aumento en el conteo de linfocitos T CD4+, independientemente de los niveles de RNA viral en plasma, lo cual se relaciona con la baja reconstitución inmune a nivel de mucosas inducida por tratamiento. Al correlacionar el conteo de estos linfocitos con los marcadores de translocación bacteriana (gen 16S rDNA y CD14s), se encontró una relación inversa con los niveles del gen 16S rDNA en individuos con TAR de larga duración, es decir, cuando los niveles de 16S rDNA aumentan, el número de células CD4+ disminuye. En contraste, en individuos sin TAR, se encontró una asociación inversa entre CD14s y el conteo de linfocitos T CD4+. Estos datos sugieren que los altos niveles del CD14s podrían ser causa de la activación inmune generalizada en la infección por VIH sin TAR por causas adicionales a la translocación bacteriana. Asimismo, el nivel de translocación bacteriana residual en individuos bajo TAR podría estar asociado con la restauración inmune [54].

Se ha reportado que al iniciar TAR se pueden padecer diversos efectos secundarios dependiendo del tipo de antirretroviral. Actualmente, Efavirenz es el medicamento de primera elección para el tratamiento de la infección por VIH en México, ya que tiene un costo y efectividad aceptable, además de permitir una adherencia completa por la toma de una tableta al día. No obstante, genera importantes efectos secundarios neuropsiquiátricos, los más frecuentes son reducción en la calidad del sueño, depresión, mareos y ansiedad [68]. Por esta razón, en personas sensibles a Efavirenz, se ha optado por inhibidores de proteasa, que aunque generan severos efectos secundarios a nivel de TGI [72], permiten suprimir eficazmente la replicación viral e incrementar sustancialmente el recuento de linfocitos T CD4+, brindándole al paciente una alternativa

efectiva, aunque con un costo mayor. Efavirenz y los inhibidores de proteasa fueron los dos regímenes de TAR usados por la cohorte del presente estudio.

Con la finalidad de conocer si el tipo de TAR tiene un efecto sobre translocación bacteriana, se cuantificó el gen 16S rDNA, CD14s e I-FABP en individuos con distinto régimen de TAR. Se obtuvieron valores elevados de CD14s e I-FABP en individuos con TAR a base de inhibidores de proteasa [72]. En contraste, los niveles del gen 16S rDNA fueron mayores en los individuos bajo el esquema de Efavirenz. También, se encontró una correlación significativa entre CD14s e I-FABP en individuos bajo IPs, lo que sugiere que este tipo de TAR podría generar un mayor daño en el TGI y por tanto permite la liberación de CD14 en su forma soluble por parte de macrófagos y monocitos en respuesta a la presencia de LPS. Esta correlación no fue significativa con Efavirenz, lo cual propone que el uso de IPs genera un daño sustancial a nivel de TGI, que no se observa en el grupo con Efavirenz.

En conjunto, los datos indican que productos bacterianos, como el gen 16S rDNA, se encuentran en niveles incrementados en el plasma de los individuos infectados por VIH. Además, el uso de TAR, no garantiza restauración inmune en mucosas y por lo tanto, tampoco disminuye la translocación bacteriana.

Es relevante mencionar que existen ciertas limitaciones en este estudio. La primera limitación es el bajo número de muestras de los sujetos VIH- y controladores, debido a la dificultad de su reclutamiento, por lo que se debe considerar la n en los resultados obtenidos. Además, otra limitación del estudio longitudinal fue el bajo número de sujetos reclutados y la pérdida de los mismos a lo largo del seguimiento a los 12, 18 y 24 meses.

Por otro lado, recordemos que la técnica de PCR en tiempo real presenta desventajas debido a que los kits de extracción de DNA pueden generar resultados de tipo falsos positivos, por lo que se sugiere buscar algún kit que elimine cualquier traza de DNA que altere los resultados.

CAPÍTULO IX. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se logró la estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del gen 16S rDNA para su empleo de manera confiable y accesible en laboratorios de investigación con la finalidad de coadyuvar en el estudio de la translocación bacteriana. Particularmente, se encontraron altos niveles de este gen en plasma de sujetos infectados por VIH. Asimismo, se observó que una terapia basada en el uso de inhibidores de proteasa podría incrementar el daño a nivel de TGI y a su vez la translocación bacteriana.

Finalmente, los resultados obtenidos fueron consistentes con el modelo en donde la translocación de productos bacterianos a través del epitelio intestinal dañado juega un papel importante en la patogénesis de la inmunodeficiencia inducida por el VIH. Por lo que, la restauración de las defensas de la mucosa intestinal y de la barrera epitelial intestinal son muy importantes para disminuir la activación inmune crónica y progresión en esta infección generada por la translocación bacteriana. Será importante determinar de qué bacterias provienen esos productos mediante el uso de la secuenciación masiva.

CAPÍTULO X. BIBLIOGRAFÍA

1. *Absolute Quantitation Using Standard Curve Getting Started Guide. Applied Biosystems, 2010.* PN 4347825f.
2. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
3. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.* N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
4. UNAIDS, *Report on the Global AIDS Epidemic 2015.*
5. SIDA, C.N.p.l.p.y.C.d.V., *Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH SIDA. THE GAP REPORT 2015.* [Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2702_GARPR2015guidelines_en.pdf].
6. CENSIDA, *Panorama nacional de la respuesta al VIH.* México, 2015.
7. James J. Szinger, K.Y., Bette T. M. Korber, Christian Brander (et al), *HIV Molecular Immunology 2015.* Los Alamos National Laboratory, 2015. [Disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/contents2015.html>]
8. Douek, D.C., L.J. Picker, and R.A. Koup, *T cell dynamics in HIV-1 infection.* Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 265-304.
9. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(4): p. a007161.
10. FDA, [Disponible en: <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>]. p. Última actualización el 10/08/2015.
11. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights.* Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 279-90.
12. Simon, V. and D.D. Ho, *HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy.* Nat Rev Microbiol, 2003. **1**(3): p. 181-90.
13. Guy-Grand, D. and P. Vassalli, *Gut intraepithelial lymphocyte development.* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 255-9.

14. Veazey, R.S., P.A. Marx, and A.A. Lackner, *The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 626-33.
15. Brenchley, J.M. and D.C. Douek, *HIV infection and the gastrointestinal immune system*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 23-30.
16. Chevalier, M.F., et al., *The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003453.
17. Brenchley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 749-59.
18. Xu, H., X. Wang, and R.S. Veazey, *Mucosal immunology of HIV infection*. Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 10-33.
19. Lerner, P., et al., *The gut mucosal viral reservoir in HIV-infected patients is not the major source of rebound plasma viremia following interruption of highly active antiretroviral therapy*. J Virol, 2011. **85**(10): p. 4772-82.
20. Shacklett, B.L. and P.A. Anton, *HIV Infection and Gut Mucosal Immune Function: Updates on Pathogenesis with Implications for Management and Intervention*. Curr Infect Dis Rep, 2010. **12**(1): p. 19-27.
21. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
22. Turnbaugh, P.J., et al., *Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(16): p. 7503-8.
23. Foxman, B., et al., *Conceptualizing human microbiota: from multicelled organ to ecological community*. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2008: p. 613979.
24. Brenchley, J.M. and D.C. Douek, *Microbial translocation across the GI tract*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 149-73.
25. Kobozev, I., et al., *Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation*. Free Radic Biol Med, 2014. **68**: p. 122-33.
26. Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai, and D.A. Relman, *An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 811-8.

27. Vollaard, E.J. and H.A. Clasener, *Colonization resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(3): p. 409-14.
28. Stecher, B. and W.D. Hardt, *Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(1): p. 82-91.
29. Donaldson, G.P., S.M. Lee, and S.K. Mazmanian, *Gut biogeography of the bacterial microbiota*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(1): p. 20-32.
30. Walker, A.W., et al., *High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 7.
31. Manichanh, C., et al., *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach*. Gut, 2006. **55**(2): p. 205-11.
32. Huffnagle, G.B., *The microbiota and allergies/asthma*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000549.
33. Abrahamsson, T.R., et al., *Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age*. Clin Exp Allergy, 2014. **44**(6): p. 842-50.
34. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
35. Garcovich, M., et al., *Prevention and treatment of hepatic encephalopathy: focusing on gut microbiota*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(46): p. 6693-700.
36. Wu, N., et al., *Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients*. Microb Ecol, 2013. **66**(2): p. 462-70.
37. Larsen, N., et al., *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9085.
38. Lozupone, C.A., et al., *Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(3): p. 329-39.
39. Vazquez-Castellanos, J.F., et al., *Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals*. Mucosal Immunol, 2015. **8**(4): p. 760-72.
40. Vujkovic-Cvijin, I., et al., *Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism*. Sci Transl Med, 2013. **5**(193): p. 193ra91.

41. George, M.D. and D.M. Asmuth, *Mucosal immunity in HIV infection: what can be done to restore gastrointestinal-associated lymphoid tissue function?* Curr Opin Infect Dis, 2014. **27**(3): p. 275-81.
42. Slack, E., et al., *Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism.* Science, 2009. **325**(5940): p. 617-20.
43. Gori, A., et al., *Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(2): p. 757-8.
44. Li, S.X., et al., *Complexities of gut microbiome dysbiosis in the context of HIV infection and antiretroviral therapy.* Clin Pharmacol Ther, 2016.
45. Lozupone, C.A., et al., *HIV-induced alteration in gut microbiota: driving factors, consequences, and effects of antiretroviral therapy.* Gut Microbes, 2014. **5**(4): p. 562-70.
46. McHardy, I.H., et al., *HIV Infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota.* Microbiome, 2013. **1**(1): p. 26.
47. Dillon, S.M., et al., *An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia.* Mucosal Immunol, 2014. **7**(4): p. 983-94.
48. Noguera-Julian, M., et al., *Gut Microbiota Linked to Sexual Preference and HIV Infection.* EBioMedicine, 2016. **5**: p. 135-46.
49. Ellis, C.L., et al., *Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **57**(5): p. 363-70.
50. Burgener, A., I. McGowan, and N.R. Klatt, *HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis.* Curr Opin Immunol, 2015. **36**: p. 22-30.
51. Somsouk, M., et al., *Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection.* AIDS, 2015. **29**(1): p. 43-51.
52. Zevin, A.S., et al., *Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation.* Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(2): p. 182-90.
53. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.* Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.

54. Marchetti, G., C. Tincati, and G. Silvestri, *Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(1): p. 2-18.
55. Jiang, W., et al., *Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection*. J Infect Dis, 2009. **199**(8): p. 1177-85.
56. Klatt, N.R., N.T. Funderburg, and J.M. Brenchley, *Microbial translocation, immune activation, and HIV disease*. Trends Microbiol, 2013. **21**(1): p. 6-13.
57. Hunt, P.W., et al., *T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2003. **187**(10): p. 1534-43.
58. Tincati, C., D.C. Douek, and G. Marchetti, *Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection*. AIDS Res Ther, 2016. **13**: p. 19.
59. Yarza, P., et al., *Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(9): p. 635-45.
60. Mohammadi, T., et al., *Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents*. J Microbiol Methods, 2005. **61**(2): p. 285-8.
61. Kramski, M., et al., *Novel sensitive real-time PCR for quantification of bacterial 16S rRNA genes in plasma of HIV-infected patients as a marker for microbial translocation*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(10): p. 3691-3.
62. Merlini, E., et al., *Sequencing of bacterial microflora in peripheral blood: our experience with HIV-infected patients*. J Vis Exp, 2011(52).
63. Li, S.K., et al., *Detection and identification of plasma bacterial and viral elements in HIV/AIDS patients in comparison to healthy adults*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(11): p. 1126-33.
64. Ferri, E., et al., *Plasma levels of bacterial DNA in HIV infection: the limits of quantitative polymerase chain reaction*. J Infect Dis, 2010. **202**(1): p. 176-7; author reply 178.
65. Klaschik, S., et al., *Real-time PCR for detection and differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(11): p. 4304-7.

66. Nadkarni, M.A., et al., *Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 1): p. 257-66.
67. Bogaert, D., et al., *Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17035.
68. Gaida, R., et al., *A review of trials investigating efavirenz-induced neuropsychiatric side effects and the implications*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2016. **14**(4): p. 377-88.
69. Lichtfuss, Gregor, et al., *Biomarkers of immune dysfunction following combination antiretroviral therapy for HIV infection*. Biomarkers Med, 2011. 5(2): p. 171-186.
70. Hunt, Peter, W., et al., *Relationship between T Cell Activation and CD4+ T Cell Count in HIV-Seropositive Individuals with Undetectable Plasma HIV RNA Levels in the Absence of Therapy*. The Journal of Infectious Diseases, 2008. **197**: p. 126 - 33.
71. Utrillo, L., et al., *Switching antiretroviral regimes for the treatment of HIV: safety implications*. Expert Opin Drug Saf, 2016.
72. Zhou, H. Chapter Six – *HIV Protease Inhibitors Induce Endoplasmic Reticulum Stress and Disrupt Barrier Integrity in Intestinal Epithelial Cells*. Methods in Enzymology, 2011. **490**: p.107–119.

ANEXO 1. PROTOCOLO “B36-12” APROBADO POR EL COMITÉ DE CIENCIAS Y BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS (INER)



DI/CCB/341/12

Dr. Gustavo Reyes Terán
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE CIENCIA Y BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN.
APROBACIÓN.

Título del Proyecto: ESTUDIO GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE INDIVIDUOS MEXICANOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) EN DIFERENTES ETAPAS DE LA INFECCIÓN CON O SIN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL COMPARADO CON INDIVIDUOS NO INFECTADOS.

Código asignado por el Comité: B36-12

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

| | Nº y/o Fecha Versión | Decisión |
|--|-------------------------|----------|
| Protocolo | Versión 1, Octubre 2012 | APROBADO |
| Consentimiento Informado Grupo Control | Versión 1, Octubre 2012 | APROBADO |
| Consentimiento Informado Estudio Transversal | Versión 1, Octubre 2012 | APROBADO |
| Consentimiento Informado Estudio Longitudinal | Versión 1, Octubre 2012 | APROBADO |
| Cuestionario de historia clínica para el protocolo | Versión 1, Octubre 2012 | APROBADO |
| Instrucciones para la toma de muestra de heces | Versión 1, Octubre 2012 | APROBADO |
| Formato Recordatorio de 24 horas | Versión 1, Octubre 2012 | APROBADO |

Este protocolo tiene vigencia de noviembre de 2012 a noviembre 2017.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente

Dra. Rocío Chapela Mendoza
Presidente del Comité

27 de Noviembre de 2012

CALZ. DE TLALPAN 4502, C. P. 14080, MEXICO, D. F. 5487-1700, APDO. POSTAL 22-0672

ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**FORMA DE CONSENTIMIENTO ESCRITO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN DEL INER TITULADO:**

**“ESTUDIO GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE INDIVIDUOS
MEXICANOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) EN
DIFERENTES ETAPAS DE LA INFECCIÓN CON O SIN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL
COMPARADO CON INDIVIDUOS NO INFECTADOS-ESTUDIO TRANSVERSAL”**

PATROCINADOR

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER)

SITIO DE INVESTIGACIÓN

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del Servicio de Infectología para el
Paciente Inmunocomprometido (SIPI), del INER.

INVESTIGADORES RESPONSABLES

Dr. Gustavo Reyes Terán, CIENI, INER
Dr. Santiago Avila Ríos, CIENI, INER
Dra. Sandra Pinto Cardoso, CIENI, INER

DIRECCIÓN

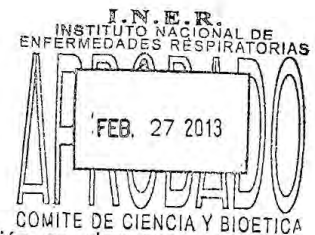
Calzada de Tlalpan 4502
Colonia Sección XVI
CP 14080
México, D. F.
Tels: 5666 7985, 5171 7335, 5171 4735, 5171 4697, 5171 4718

CORREO ELECTRÓNICO

santiago.avila@cieni.org.mx
sandra.pinto@cieni.org.mx

Estimado(a) paciente:

Ésta es una invitación para participar en un proyecto de investigación en el que se estudiará a un grupo de personas con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Su participación es completamente voluntaria y su decisión de participar o no participar no afectará en absoluto la atención que recibirá en el CIENI del INER.





Este estudio se realiza con el apoyo del INER, institución de renombrado prestigio científico en nuestro país. Ninguna empresa farmacéutica ni ninguna otra compañía privada tiene o tendrá participación alguna en esta investigación.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

El intestino humano alberga una comunidad bacteriana muy diversa y compleja. Las comunidades bacterianas del intestino tienen un papel muy importante en el balance entre la salud y enfermedad. Se ha comprobado que el cambio de la composición de las comunidades bacterianas del intestino está asociado con enfermedades tal como la obesidad, síndrome del intestino inflamado y diabetes tipo 1, entre otros. De hecho, el intestino es importante para la replicación del VIH y para la persistencia del virus sobre todo en individuos infectados que se encuentran bajo tratamiento antirretroviral. La infección por VIH está asociada a la presencia de productos bacterianos en la sangre periférica, que contribuyen a la activación del sistema inmune y a la progresión a la enfermedad o SIDA. El origen de la activación crónica del sistema inmunológico es de gran importancia en la lucha contra la infección por VIH. Por lo tanto, estudiar la composición de las comunidades bacterianas intestinales es relevante para definir nuevos blancos terapéuticos en conjunto con otros tratamientos ya establecidos.

OBJETIVO

El presente proyecto tiene como objetivo de analizar el papel de las comunidades bacterianas en la infección por VIH. Particularmente, se propone describir de la composición y la diversidad de las comunidades bacterianas de individuos infectados por VIH.

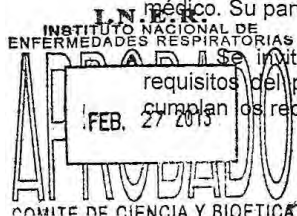
PROCEDIMIENTOS

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque:

1. Es una persona que vive con VIH, que previamente no ha tomado fármacos antirretrovirales y con un conteo de linfocitos T CD4 inferior a 200 células/ μ l
2. Es una persona que vive con VIH, que previamente no ha tomado fármacos antirretrovirales y con un conteo de linfocitos T CD4 superior a 500 células/ μ l
3. Es una persona que vive con VIH, que previamente no ha tomado fármacos antirretrovirales y su carga viral está en niveles indetectables.
4. Es una persona que vive con VIH, que toma fármacos antirretrovirales por lo menos por 1 año completo.

En todos los casos, la decisión sobre el inicio del tratamiento antirretroviral es totalmente independiente de su participación en este estudio y será tomada exclusivamente entre usted y su médico. Su participación en este estudio no influye en la efectividad del tratamiento.

Se invitará a participar en la presente investigación a 30 personas que cumplan los requisitos del punto 1, 30 personas que cumplan los requisitos del punto 2, 30 personas que cumplan los requisitos del punto 3 y 30 personas que cumplan los requisitos del punto 4.



Microbioma intestinal de pacientes infectados por VIH

2/6



Se obtendrán 50 mililitros (8 tubos) de sangre de una vena del brazo en la sesión de toma de muestra y se realizarán las mismas pruebas que a los individuos que viven con VIH y que incluirán una revisión de infectología, nutriología y estudio de densimetría ósea sin cargo alguno, en las mismas instalaciones del CIENI. Además se incluirán estudios de laboratorio clínico sin cargo alguno en las instalaciones del INER. Estos estudios incluyen una biometría hemática, química sanguínea, perfil de lípidos y perfil hepático, sin cargo alguno para usted. Además, se estudiarán las características de las células CD4+ y se cuantificaron los productos microbianos presentes en su sangre como parte de la investigación.

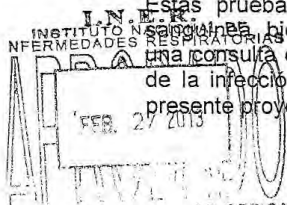
Además, se le pedirá una muestra de heces y se le proporcionará un contenedor de plástico, una bolsa plástica e instrucciones para la toma de muestra de heces. Se le pedirá además llenar un cuestionario de frecuencia de consumo alimenticio, un recordatorio alimenticio de 24hrs (se realizarán tres por participante) y un cuestionario de su historia clínica en presencia de médicos del CIENI, INER. Estos cuestionarios son muy importantes para el estudio ya que la dieta y los antibióticos influyen de manera significativa en la composición de las comunidades microbianas. Parte de la muestra de sangre y de la muestra de heces serán guardadas durante un tiempo indefinido y podrá ser estudiada nuevamente en el futuro en el marco de otros proyectos de investigación sobre la infección por VIH. Si los investigadores responsables de este estudio lo consideran necesario, se le podría citar para una toma de muestra adicional, la cual será completamente voluntaria. Se tomará esta cantidad de sangre debido a que se requiere un número considerable de células para los estudios considerados.

RIESGOS

El procedimiento para la obtención de una muestra de su sangre será realizado por personal calificado, siguiendo todas las precauciones y medidas de higiene necesarias. La extracción de sangre produce dolor y molestias pasajeras en el sitio de punción. En raras ocasiones puede haber infección en el sitio de la punción, la cual sería manejada por el personal médico del CIENI. La cantidad de sangre extraída no representa riesgos para su salud. Si hubiera algún problema relacionado con los procedimientos de este estudio, se dispondrá por cuenta del INER del tratamiento para resolverlo (antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios). El INER no proporcionará compensación por eventos no relacionados con los procedimientos de este estudio. El procedimiento para la obtención de una muestra de heces será realizado por el paciente, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el CIENI.

BENEFICIOS

Usted no obtendrá beneficios económicos por parte del INER al participar en el presente estudio. Sin embargo, la investigación contempla la realización de algunas pruebas de laboratorio que son útiles para su seguimiento clínico, las cuales se realizarán sin costo alguno para usted. Estas pruebas incluyen los estudios de carga viral, conteo de linfocitos T CD4+, química sanguínea, biometría hemática, perfil de lípidos, perfil hepático. Además usted tendrá derecho a una consulta de infectología, consulta de nutriología y densimetría ósea. Un seguimiento regular de la infección por VIH mediante análisis de laboratorio, incluyendo los que se realizan en el presente proyecto de investigación, y consultas médicas periódicas será de gran beneficio para el



Microbioma intestinal de pacientes infectados por VIH

3/6



manejo de la infección y su bienestar. Así mismo, participando en este estudio, usted contribuirá en la obtención de información importante que podría definir nuevas estrategias de tratamiento que podrían mejorar la efectividad del tratamiento ya establecido para el control de la enfermedad por VIH.

OPTATIVIDAD Y LIBERTAD DE RETIRARSE

Su participación en este estudio es **totalmente voluntaria**. Esto implica que usted puede decidir no participar, sin que esto afecte su seguimiento clínico y/o tratamiento en absoluto. Si decide participar, puede retirarse de este estudio en cualquier momento. Cualquiera de estas decisiones será respetada y los beneficios (atención clínica, de laboratorio, etcétera) que usted obtiene como paciente del INER no cambiarán. Su tratamiento y sus relaciones con los médicos y organizadores que participan en esta investigación no se afectarán en ningún momento.

CONFIDENCIALIDAD

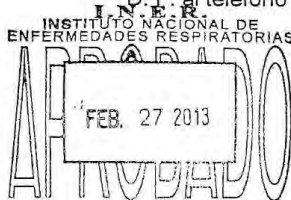
Todas las muestras de heces y de sangre donadas para el presente estudio se manejarán con claves, sin incluir en ningún momento su nombre o datos personales. Los registros médicos donde usted puede ser identificado y el consentimiento informado, autorizado por usted con su firma, podrían ser requeridos y copiados para una inspección de los datos o resultados de los estudios que podría ser realizada por las siguientes instituciones nacionales o extranjeras:

- Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER (México)
- Secretaría de Salud (México)
- Agencias gubernamentales y comités de ética y derechos humanos de otros países

Estas instituciones podrían conocer su identidad, pero **siempre respetarán su privacidad**. Usted no será identificado(a) en ningún caso si los resultados de este estudio de investigación se presentan en reuniones científicas o en publicaciones. Su identidad no formará parte de los resultados de este estudio, a ser publicados en el medio científico y académico especializado.

DUDAS Y COMENTARIOS

Si usted tiene dudas o comentarios sobre su participación en este estudio o sobre el estudio mismo, puede consultar en todo momento a los responsables de este proyecto: Dr. Gustavo Reyes Terán, jefe del CIENI, Dr. Santiago Avila, investigador del CIENI ó Dra. Sandra Pinto Cardoso, investigadora del CIENI en la dirección y teléfonos indicados en la primera página de este documento. Del mismo modo, usted puede optar por dirigirse a la Dra. Rocío Chapela Mendoza, presidenta del Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER, órgano encargado de vigilar la investigación del Instituto, que se encuentra en la Unidad de Investigación del INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP 14080, México D. F. al teléfono 5487 1700 ext 5110 y 5254, o al correo electrónico: ccybiner@yahoo.com.mx





Versión 1



CONSENTIMIENTO

Me han proporcionado la Forma de Consentimiento Informado para participar en el presente proyecto de investigación. Me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio. He hablado directamente con _____, quien ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas respecto a este estudio. Acepto donar 50 mL de mi sangre para que se estudien las células y el virus en ella. Estoy informado de que parte de la muestra de sangre será guardada durante un tiempo indefinido y que podrá ser estudiada nuevamente en el futuro en el marco de otros proyectos de investigación.

Doy mi consentimiento de participación en esta investigación y sé bien que puedo retirarme del estudio en cualquier momento si yo lo deseo. Sé que esto no tendría repercusiones en mi atención como paciente del INER. Al firmar este consentimiento, no renuncio a ninguno de mis derechos legales como paciente en un estudio de investigación.

Nombre y firma del paciente: _____

Fecha: _____

Nombre y firma del testigo 1: _____

Fecha: _____ Relación: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del testigo 1: _____

Fecha: _____ Relación: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del investigador: Dra. Sandra Pinto Cardoso

Fecha: Cardoso



DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE LAS PERSONAS EN EXPERIMENTACIÓN

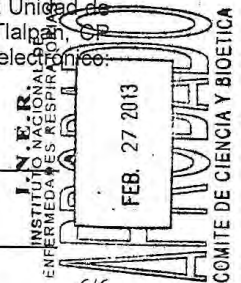
Los derechos que enseguida se describen son los de todas las personas a quienes se les solicita participar en un estudio de investigación:

1. Que me expliquen de qué se trata el estudio y qué están tratando de encontrar. Tengo derecho a saber con todos los detalles los objetivos de investigación.
2. Que me digan exactamente qué me sucederá si participo en un estudio de investigación.
3. Que me expliquen si alguno de los procedimientos, medicamentos o dispositivos que se emplearán en la investigación son diferentes de los que se usan en la práctica médica rutinaria. Si son diferentes, debo saber con exactitud en qué consisten las diferencias.
4. Que me describan con precisión y de manera que yo lo entienda bien, la frecuencia y la importancia de los riesgos a los que seré sometido, así como de los efectos adversos o molestias que puedo tener, relacionados con mi participación en la investigación.
5. Que me digan si yo puedo esperar algún beneficio de mi participación y, si así fuera, cuál sería el beneficio.
6. Que me expliquen otras opciones que yo tengo y cómo esas opciones pueden ser mejores, iguales o peores que las de este estudio.
7. Que me permitan hacer cualquier pregunta que se me ocurra respecto al estudio, antes de dar mi consentimiento para participar y durante el curso del estudio (si decido participar).
8. Que me digan qué tipos de tratamientos están disponibles para mí, en caso de presentarse alguna complicación.
9. Puedo negarme a participar totalmente o, si decido participar, puedo cambiar mi decisión acerca de mi participación después de que haya comenzado el estudio. Esta decisión no afectará mis derechos para recibir la atención médica que yo recibiría si no estuviera en el estudio.
10. Debo recibir una copia del documento o de la forma escrita de mi consentimiento para participar en esta investigación.
11. Nadie puede ni debe presionarme cuando yo esté considerando tomar la decisión de participar o no en el estudio.

Si tengo cualquier pregunta, puedo solicitar al Dr. Gustavo Reyes Terán (Tel. 5666 7985), investigador principal y Jefe del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), o a los co-investigadores del estudio, para que me la resuelvan. Además puedo establecer comunicación con el Comité de Ciencia y Bioética del INER, que se preocupa por la protección de los voluntarios de los proyectos de investigación, con su presidente, Dra. Rocío Chapela Mendoza, que se encuentra en la Unidad de Investigación del INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP 14080, México D. F. al teléfono 5487 1700 ext 5110 y 5254, o al correo electrónico: ccybiner@yahoo.com.mx

Recibí: _____

Fecha: _____





Versión 1



**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**FORMA DE CONSENTIMIENTO ESCRITO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN DEL INER TITULADO:**

**“ESTUDIO GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE INDIVIDUOS
MEXICANOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) EN
DIFERENTES ETAPAS DE LA INFECCIÓN CON O SIN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL
COMPARADO CON INDIVIDUOS NO INFECTADOS-ESTUDIO LONGITUDINAL”**

PATROCINADOR

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER)

SITIO DE INVESTIGACIÓN

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del Servicio de Infectología para el Paciente Inmunocomprometido (SIPI), del INER.

INVESTIGADORES RESPONSABLES

Dr. Gustavo Reyes Terán, CIENI, INER
Dr. Santiago Avila Ríos, CIENI, INER
Dra. Sandra Pinto Cardoso, CIENI, INER

DIRECCIÓN

Calzada de Tlalpan 4502
Colonia Sección XVI
CP 14080
México, D. F.
Tels: 5666 7985, 5171 7335, 5171 4735, 5171 4697, 5171 4718

CORREO ELECTRÓNICO

santiago.avila@cieni.org.mx
sandra.pinto@cieni.org.mx

Estimado(a) paciente:

Ésta es una invitación para participar en un proyecto de investigación en el que se estudiará a un grupo de personas con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Su participación es completamente voluntaria y su decisión de participar o no participar no afectará en absoluto la atención que recibirá en el CIENI del INER.



Versión 1



Este estudio se realiza con el apoyo del INER, institución de renombrado prestigio científico en nuestro país. Ninguna empresa farmacéutica ni ninguna otra compañía privada tiene o tendrá participación alguna en esta investigación.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

El intestino humano alberga una comunidad bacteriana muy diversa y compleja. Las comunidades bacterianas del intestino tienen un papel muy importante en el balance entre la salud y enfermedad. Se ha comprobado que el cambio de la composición de las comunidades bacterianas del intestino está asociado con enfermedades tal como la obesidad, síndrome del intestino inflamado y diabetes tipo 1, entre otros. De hecho, el intestino es importante para la replicación del VIH y para la persistencia del virus sobre todo en individuos infectados que se encuentran bajo tratamiento antirretroviral. La infección por VIH está asociada a la presencia de productos bacterianos en la sangre periférica, que contribuyen a la activación del sistema inmune y a la progresión a la enfermedad o SIDA. El origen de la activación crónica del sistema inmunológico es de gran importancia en la lucha contra la infección por VIH. Por lo tanto, estudiar la composición de las comunidades bacterianas intestinales es relevante para definir nuevos blancos terapéuticos en conjunto con otros tratamientos ya establecidos.

OBJETIVO

El presente proyecto tiene como objetivo de analizar el papel de las comunidades bacterianas intestinales en la infección por VIH. Particularmente, se propone describir la composición y la diversidad de las comunidades bacterianas intestinales de individuos infectados por VIH.

PROCEDIMIENTOS

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque:

1. Es una persona que vive con VIH, que previamente no ha tomado fármacos antirretrovirales

En todos los casos, la decisión sobre el inicio del tratamiento antirretroviral es totalmente independiente de su participación en este estudio y será tomada exclusivamente entre usted y su médico. Su participación en este estudio no influye en la efectividad del tratamiento.

Se invitará a participar en la presente investigación a 30 personas que cumplan los requisitos del punto 1. Se obtendrán 50 mililitros (8 tubos) de sangre de una vena del brazo en cada una de las sesiones de toma de muestra. Esta toma de muestra formará parte de las visitas de seguimiento clínico, a las que usted tiene derecho como participante del proyecto y que incluirán una revisión de infectología, nutriología y estudio de densimetría ósea, sin cargo alguno, en las mismas instalaciones del CIENI. Además se incluirán estudios de laboratorio clínico sin cargo alguno en las instalaciones del INER.



Versión 1



Estos estudios incluyen las pruebas de carga viral para saber cuánto virus hay en su sangre, la prueba de conteo de linfocitos T CD4 para conocer el estado de sus defensas, una biometría hemática, química sanguínea, perfil de lípidos y perfil hepático. Además, se estudiarán las características de las células CD4+ y se cuantificaron los productos microbianos presentes en su sangre como parte de la investigación. Además, se le pedirá una muestra de heces. Se le proporcionará un contenedor de plástico, una bolsa plástica e instrucciones para la toma de muestra de heces. Se le pedirá además llenar un cuestionario de frecuencia de consumo alimenticio, un recordatorio alimenticio de 24hrs (se realizarán tres por participante) y un cuestionario de historia clínica en presencia de médicos del CIENI, INER. Estos cuestionarios son muy importantes para el estudio ya que la dieta y los antibióticos influyen de manera significativa en la composición de las comunidades bacterianas del intestino. Parte de la muestra de sangre y de heces serán guardadas durante un tiempo indefinido y podrán ser estudiadas nuevamente en el futuro en el marco de otros proyectos de investigación sobre la infección por VIH.

Se le citará para una toma de muestra tanto de sangre como de heces, la cual **será completamente voluntaria**, una vez empezado su tratamiento antirretroviral a intervalos de 6 meses por un total de 5 años (en total se realizarán 9 citas) para un seguimiento de larga duración para estudiar los cambios de la composición de las comunidades bacterianas del intestino asociados con el tratamiento antirretroviral.

RIESGOS

El procedimiento para la obtención de una muestra de su sangre será realizado por personal calificado, siguiendo todas las precauciones y medidas de higiene necesarias. La extracción de sangre produce dolor y molestias pasajeras en el sitio de punción. En raras ocasiones puede haber infección en el sitio de la punción, la cual sería manejada por el personal médico del CIENI. La cantidad de sangre extraída no representa riesgos para su salud. Si hubiera algún problema relacionado con los procedimientos de este estudio, se dispondrá por cuenta del INER del tratamiento para resolverlo (antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios). El INER no proporcionará compensación por eventos no relacionados con los procedimientos de este estudio. El procedimiento para la obtención de una muestra de heces será realizado por el paciente, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el CIENI.

BENEFICIOS

Usted no obtendrá beneficios económicos por parte del INER al participar en el presente estudio. Sin embargo, la investigación contempla la realización de algunas pruebas de laboratorio que son útiles para su seguimiento clínico, las cuales se realizarán sin costo alguno para usted. Estas pruebas incluyen los estudios de carga viral, conteo de linfocitos T CD4+, química sanguínea, biometría hemática, perfil de lípidos, perfil hepático. Además usted tendrá derecho a una consulta de Infectología, consulta de nutriología y densimetría ósea por cada cita de toma de muestra. Un seguimiento regular de la infección por VIH mediante análisis de laboratorio, incluyendo los que se realizan en el presente proyecto de investigación, y consultas médicas periódicas será de gran beneficio para el manejo de la infección y su bienestar.



Versión 1



Así mismo, participando en este estudio, usted contribuirá en la obtención de información importante que podría definir nuevas estrategias de tratamiento con que podrían mejorar la efectividad del tratamiento ya establecido para el control de la enfermedad por VIH.

OPTATIVIDAD Y LIBERTAD DE RETIRARSE

Su participación en este estudio es **totalmente voluntaria**. Esto implica que usted puede decidir no participar, sin que esto afecte su seguimiento clínico y/o tratamiento en absoluto. Si decide participar, puede retirarse de este estudio en cualquier momento. Cualquiera de estas decisiones será respetada y los beneficios (atención clínica, de laboratorio, etcétera) que usted obtiene como paciente del INER no cambiarán. Su tratamiento y sus relaciones con los médicos y organizadores que participan en esta investigación no se afectarán en ningún momento.

CONFIDENCIALIDAD

Todas las muestras de heces y de sangre donadas para el presente estudio se manejarán con claves, sin incluir en ningún momento su nombre o datos personales. Los registros médicos donde usted puede ser identificado y el consentimiento informado, autorizado por usted con su firma, podrían ser requeridos y copiados para una inspección de los datos o resultados de los estudios que podría ser realizada por las siguientes instituciones nacionales o extranjeras:

- o Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER (México)
- o Secretaría de Salud (México)
- o Agencias gubernamentales y comités de ética y derechos humanos de otros países

Estas instituciones podrían conocer su identidad, pero **siempre respetarán su privacidad**. Usted no será identificado(a) en ningún caso si los resultados de este estudio de investigación se presentan en reuniones científicas o en publicaciones. Su identidad no formará parte de los resultados de este estudio, a ser publicados en el medio científico y académico especializado.

DUDAS Y COMENTARIOS

Si usted tiene dudas o comentarios sobre su participación en este estudio o sobre el estudio mismo, puede consultar en todo momento a los responsables de este proyecto: Dr. Gustavo Reyes Terán, jefe del CIENI, Dr. Santiago Avila, investigador del CIENI ó Dra. Sandra Pinto Cardoso, investigadora del CIENI en la dirección y teléfonos indicados en la primera página de este documento. Del mismo modo, usted puede optar por dirigirse a la Dra. Rocío Chapela Mendoza, presidenta del Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER, órgano encargado de vigilar la investigación del Instituto, que se encuentra en la Unidad de Investigación del INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP 14080, México D. F. al teléfono 5487 1700 ext 5110 y 5254, o al correo electrónico: ccybiner@yahoo.com.mx



Versión 1



CONSENTIMIENTO

Me han proporcionado la Forma de Consentimiento Informado para participar en el presente proyecto de investigación. Me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio. He hablado directamente con _____, quien ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas respecto a este estudio. Acepto donar 50 mL de mi sangre para que se estudien las células y el virus en ella. Estoy informado de que parte de la muestra de sangre será guardada durante un tiempo indefinido y que podrá ser estudiada nuevamente en el futuro en el marco de otros proyectos de investigación.

Doy mi consentimiento de participación en esta investigación y sé bien que puedo retirarme del estudio en cualquier momento si yo lo deseo. Sé que esto no tendría repercusiones en mi atención como paciente del INER. Al firmar este consentimiento, no renuncio a ninguno de mis derechos legales como paciente en un estudio de investigación.

Nombre y firma del paciente: _____

Fecha: _____

Nombre y firma del testigo 1: _____

Fecha: _____ Relación: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del testigo 1: _____

Fecha: _____ Relación: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del investigador: Dra. Sandra Pinto Cardozo

Fecha: Cardozo



Versión I



DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE LAS PERSONAS EN EXPERIMENTACIÓN

Los derechos que enseguida se describen son los de todas las personas a quienes se les solicita participar en un estudio de investigación:

1. Que me expliquen de qué se trata el estudio y qué están tratando de encontrar. Tengo derecho a saber con todos los detalles los objetivos de investigación.
2. Que me digan exactamente qué me sucederá si participo en un estudio de investigación.
3. Que me expliquen si alguno de los procedimientos, medicamentos o dispositivos que se emplearán en la investigación son diferentes de los que se usan en la práctica médica rutinaria. Si son diferentes, debo saber con exactitud en qué consisten las diferencias.
4. Que me describan con precisión y de manera que yo lo entienda bien, la frecuencia y la importancia de los riesgos a los que seré sometido, así como de los efectos adversos o molestias que puedo tener, relacionados con mi participación en la investigación.
5. Que me digan si yo puedo esperar algún beneficio de mi participación y, si así fuera, cuál sería el beneficio.
6. Que me expliquen otras opciones que yo tengo y cómo esas opciones pueden ser mejores, iguales o peores que las de este estudio.
7. Que me permitan hacer cualquier pregunta que se me ocurra respecto al estudio, antes de dar mi consentimiento para participar y durante el curso del estudio (si decido participar).
8. Que me digan qué tipos de tratamientos están disponibles para mí, en caso de presentarse alguna complicación.
9. Puedo negarme a participar totalmente o, si decido participar, puedo cambiar mi decisión acerca de mi participación después de que haya comenzado el estudio. Esta decisión no afectará mis derechos para recibir la atención médica que yo recibiría si no estuviera en el estudio.
10. Debo recibir una copia del documento o de la forma escrita de mi consentimiento para participar en esta investigación.
11. Nadie puede ni debe presionarme cuando yo esté considerando tomar la decisión de participar o no en el estudio.

Si tengo cualquier pregunta, puedo solicitar al Dr. Gustavo Reyes Terán (Tel. 5666 7985), investigador principal y Jefe del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), o a los co-investigadores del estudio, para que me la resuelvan. Además puedo establecer comunicación con el Comité de Ciencia y Bioética del INER, que se preocupa por la protección de los voluntarios de los proyectos de investigación, con su presidente, Dra. Rocío Chapela Mendoza, que se encuentra en la Unidad de Investigación del INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP 14080, México D. F. al teléfono 5487 1700 ext 5110 y 5254, o al correo electrónico: ccybiner@yahoo.com.mx

Recibí: _____

Fecha: _____