

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"**

**CENTRO HOSPITALARIO**



**POLIMORFISMO GENÉTICO DE CCR5, IL-6, IL-10 E INF- $\gamma$  EN  
PACIENTES CUBANOS VIH/SIDA Y EN SUJETOS EXPUESTOS  
NO INFECTADOS. IPK 2018-2019**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias Médicas**

**Daymé Hernández Requejo**

**La Habana, 2024**



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"**

**CENTRO HOSPITALARIO**

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE *CCR5*, *IL-6*, *IL-10* E *INF-γ* EN  
PACIENTES CUBANOS VIH/SIDA Y EN SUJETOS EXPUESTOS  
NO INFECTADOS. IPK 2018-2019**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias Médicas**

**Autor: Daymé Hernández Requejo**

**Tutores: Lic. Yaxisier de Armas Rodríguez. Dr. C.**

**Lic. Enrique Iglesias Pérez. Dr. C.**

**La Habana, 2024**

## **DEDICATORIA**

*A mi Madre*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por su dedicación y amor

A mi esposo por su presencia y amor

A mis tutores y amigos Yaxsier y Kike por sus conocimientos, dedicación y amistad

Al profe Héctor Díaz por su ayuda incondicional

A Charito por su amistad y ayuda incondicional

A Cristina por su amistad y colaboración

A Leidys por su amistad y colaboración

A mi amiga Xonia por sus consejos

A mis compañeros de trabajo y amigos que me apoyaron en la realización de este trabajo

A los pacientes

Al IPK por darme la oportunidad

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**ARV:** Antirretrovirales

**B2M:**  $\beta$  2 microglobulina

**CCR2:** receptor de quimiocina tipo CC 2

**CCR3:** receptor de quimiocina tipo CC 3

**CCR5:** receptor de quimiocina tipo CC 5

**CCR8:** receptor de quimiocina tipo CC 8

**CCR9:** receptor de quimiocina tipo CC 9

**CD4:** cumulo de diferenciación 4

**CD45RA:** cumulo de diferenciación antígeno leucocitario común isoforma A en células T vírgenes

**CD45RO:** cumulo de diferenciación antígeno leucocitario común sin isoforma A en células T memoria

**Cp/ $\mu$ L:** copias de ARN viral/ $\mu$ L

**CTL:** Linfocitos T citotóxicos

**CV:** Carga Viral

**CXCR4:** receptor de quimiocina tipo CXC 4

**CX<sub>3</sub>CR1:** receptor de quimiocinas tipo CX<sub>3</sub>C 1

**EDTA:** Ácido Etilen Diamino Tetra sódico

**ELISA:** Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas

**Env:** proteína de Envoltura VIH

**EHW:** Equilibrio de Hardy-Weinberg

**FRCs:** forma recombinante circulantes

**Gag:** proteína grupo antígeno específico del VIH

**gp:** Glicoproteína

**HAART:** Del inglés terapia antirretroviral de alta eficacia

**HHA:** Hospital Hermanos Amejeiras

**HLA:** Antígeno leucocitario humano

**HLA-DR:** Antígeno leucocitario humano isotipo DR

**IL-2:** Interleucina 2

**IL- 6:** Interleucina 6

**IL-10:** Interleucina 10

**INF-γ:** Interferon γ

**INF-α:** Interferon α

**IPK:** Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

**LTR:** repeticiones terminales largas

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**MIP 1-α o β:** Proteína inflamatoria de macrófago 1α o 1β

**NASBA:** Sistema de amplificación basado en ácidos nucleicos

**NF-κB:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**ONUSIDA:** Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida

**PNO:** Procedimiento normalizado de operaciones

**PcP:** Del inglés Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

**PCR:** Del inglés Reacción en cadena de la polimerasa

**PCR-ARMS:** Sistema refractario de amplificación de mutaciones por PCR

**PCR-RFLP:** Reacción en cadena de la polimerasa de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

**Pol:** enzima Polimerasa

**RANTES:** Regulador de la activación expresado y secretado en células T

**Rev:** Regulador de la expresión viral en el VIH

**SDF-1:** Factor 1 derivado de células del estroma

**Sida:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SIV:** virus de la inmunodeficiencia de simios

**SNC:** sistema nervioso central

**SNP:** Polimorfismo de un solo nucleótido

**TAR:** tratamiento antirretroviral

**Tat:** Transactivador transcripcional del VIH

**TB:** Tuberculosis

**TCR:** receptor de células T

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Hipótesis .....	7
Objetivos .....	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
Novedad Científica.....	8
Valor Práctico.....	9
Valor Teórico.....	9
I. MARCO TEORICO.....	11
1.1 Generalidades de VIH.....	11
1.2 Biología del VIH .....	11
1.3 Origen y tipos de VIH .....	13
1.4 Ciclo replicativo del Virus de la Inmunodeficiencia Humana .....	14
1.5 Historia natural y formas de progresión de la infección.....	17
1.6 Patogénesis e inmunidad de la infección por VIH.....	19
1.7 Tratamiento antirretroviral .....	23
1.8 Situación epidemiológica en Cuba y el mundo .....	25
1.9 Polimorfismo genético y enfermedades infecciosas.....	25
1.9.1 Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP): Generalidades .....	26
1.9.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	27
1.9.3 SNP y VIH.....	28
1.10 Quimiocinas y citocinas. Generalidades .....	29
1.10.1 Polimorfismo genético de quimiocinas y citocinas y VIH .....	30
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
2.1 Diseño de la investigación .....	36
2.2 Definición del universo de estudio.....	36

2.3 Criterios de inclusión y exclusión .....	37
2.3.1 Criterios de inclusión para el grupo de pacientes seropositivos a VIH-1.....	37
2.3.2 Criterios de inclusión para el grupo de sujetos seronegativos a VIH-1 .....	37
2.3.3 Criterios de exclusión para ambos grupos.....	37
2.3.4 Criterios de salida para ambos grupos .....	37
2.4 Instrumentos de recolección de datos.....	37
2.5 Consideraciones éticas .....	38
2.6 Diagnóstico de VIH .....	38
2.7 Toma y preparación de muestra .....	39
2.8 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica .....	39
2.9 Procedimientos moleculares .....	39
2.9.1 Extracción de ADN.....	39
2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa .....	40
2.9.3 Iniciadores .....	40
2.10 Detección de los productos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa .....	43
2.10.1 Polimorfismo del gen <i>ccr5</i> (rs333) .....	43
2.10.2 Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del gen 174G/C de <i>IL-6</i> (rs1800795) .....	44
2.10.3 Polimorfismos del gen -1082 A/G de la citocina <i>IL-10</i> (rs1800896) 44	
2.10.4 Polimorfismos del gen +874 T/A de la citocina INF-γ (rs2430561) . 44	
2.11 Procedimientos inmunológicos y virológicos .....	44
2.11.1 Estudios Inmunológicos: Determinación de células CD3+, CD4+, CD8+, NK y marcadores de activación inmune crónica.....	44
2.11.2 Estudios virológicos: Determinación de la Carga viral plasmática de VIH-1+ .....	45
2.12 Análisis estadístico.....	46

III. RESULTADOS .....	50
3.1 Caracterización clínica y demográfica de los pacientes estudiados.....	50
3.2 Polimorfismos genéticos de los correceptores y los genes de citocinas en pacientes VIH/sida y en sujetos expuestos no infectados. ....	55
3.3 Relación de los polimorfismos genéticos con marcadores inmunológicos y virológicos de progresión en pacientes VIH/sida y tiempo de exposición al VIH en sujetos expuestos no infectados. ....	63
3.4 Relación de los polimorfismos genéticos con las enfermedades oportunistas en pacientes VIH/sida.....	66
IV. DISCUSIÓN .....	70
4.1 Caracterización clínica y demográfica de los pacientes estudiados.....	70
4.2 Identificación de los polimorfismos genéticos de los correceptores y los genes de citocinas en pacientes VIH/sida y en sujetos expuestos no infectados.....	74
4.3 Relación de los polimorfismos genéticos con marcadores inmunológicos y virológicos de progresión en pacientes VIH/sida. y tiempo de exposición al VIH en sujetos expuestos no infectados .....	79
4.4 Relación de los polimorfismos genéticos con las enfermedades oportunistas en pacientes VIH/sida.....	82
CONCLUSIONES.....	90
RECOMENDACIONES .....	92
BIBLIOGRAFÍA .....	93
ANEXOS.....	110

## SÍNTESIS

Los estudios genéticos han demostrado asociaciones de varios polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) con diferentes tasas de progresión y variación en la susceptibilidad a la infección por VIH. Este estudio tuvo como objetivo estimar la frecuencia de los polimorfismos *ccr5*<sup>Δ32</sup>, *IL-6-174G/C*, *IFN-γ+874T/A* e *IL-10-1082A/G* en pacientes cubanos infectados por VIH y pacientes expuestos no infectados para evaluar su influencia sobre el riesgo y la progresión de la enfermedad. Se realizó un estudio descriptivo transversal en 120 sujetos atendidos en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” y el Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Amejeiras entre junio de 2018 y diciembre de 2019. La amplificación de los fragmentos de los genes *ccr5*, *IL-6*, *IFN-γ* e *IL-10* se realizó mediante PCR seguida por el análisis de PCR-RFLP utilizando la enzima Nla III para la *IL-6*. La ARMS-PCR se utilizó en el caso de los genes *IFN-γ* e *IL-10*. Se constató predominio de pacientes blancos, entre 20-29 años en ambos grupos. Las distribuciones alélicas y genotípicas de los genes *ccr5*, *IL-6*, *IFN-γ* e *IL-10* no difirieron significativamente entre los grupos estudiados. Los recuentos celulares no difirieron significativamente entre los genotipos de los genes *ccr5*, *IL-6*, *IFN-γ* e *IL-10*. Solo el genotipo *IL-6 GG* se asoció con valores más altos de carga viral. Se sugiere el papel del polimorfismo genético homocigótico *GG* de *IL-6* en la epidemia cubana de VIH/sida, asociado con niveles elevados de carga viral en el grupo de pacientes VIH-1+ y con mayor tiempo de exposición al VIH-1 en el grupo de pacientes expuestos no infectados. Se exponen las primeras evidencias que relacionan los polimorfismos genéticos con las enfermedades oportunistas, principalmente la combinación de SNP *ccr5*<sup>wt</sup>, *IL-6 GC*, *IL-10 GA*, *INF-γ TA*.

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la respuesta inmune a la infección por el VIH se ha estudiado ampliamente desde su descubrimiento en 1983 (1). Aunque el intento de desarrollar una vacuna profiláctica o terapéutica ha sido infructuoso, este esfuerzo global ha generado una valiosa información sobre la biología del VIH en lo que se refiere al descubrimiento viral, la influencia de la variabilidad genética del huésped en el desarrollo de la enfermedad y la respuesta antiviral específica celular y humoral (2). En la actualidad parte de las investigaciones que se desarrollan a nivel global, se enfocan en entender qué provoca una respuesta inmune exitosa en un subconjunto pequeño de personas que son muy resistentes a desarrollar el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) y cómo se puede utilizar este conocimiento para mejorar la inmunoterapia y desarrollar vacunas efectivas (3). Más de 40 millones de personas en el mundo están infectadas con el VIH agente causal del sida (4). Los primeros casos de sida se describieron en la década de los 80 en hombres que tienen sexo con hombres que presentaban enfermedades oportunistas especialmente, Neumonía Por *Pneumocystis jirovecii* y sarcoma de Kaposi (5, 6).

El sida es una enfermedad del sistema inmunológico que debilita al sistema inmune innato y adquirido del huésped (7). Esta infección afecta virtualmente todos los componentes del sistema inmune y principalmente a algunos de sus elementos más importantes, el linfocito T CD4, los macrófagos y las células dendríticas (7, 8). Los defectos más prominentes aparecen en la inmunidad celular y pueden atribuirse a varios mecanismos, como efectos citopáticos

directos e indirectos del virus. La muerte de los linfocitos T CD4+ se asocia a la producción de virus en las células infectadas y es una causa importante de la reducción del número de estas células, especialmente en la fase aguda de la infección (8). Mientras que las células T CD8+ específicas de VIH controlan el virus durante la infección aguda, su potencial citotóxico disminuye a medida que la enfermedad progresiona y esto no le permite ejercer una respuesta antiviral efectiva. Los defectos intrínsecos de las células T CD4+ y las células T CD8+ durante la infección por VIH también pueden contribuir al proceso patogénico (9).

La activación crónica del sistema inmune es una característica distintiva de la infección por el VIH, y el equilibrio entre esta y la replicación viral es fundamental en el proceso de inmunopatogénesis de esta enfermedad. La activación inmune potencia la replicación del VIH, lo que a su vez aumenta la activación del sistema inmune (10).

La patogénesis de la enfermedad inducida por VIH es compleja y multifactorial. Despues de la infección primaria se desencadena una replicación diseminada de virus en los órganos linfoideos. Una robusta respuesta inmune celular usualmente inhibe la replicación viral en las primeras semanas, pero el virus escapa de la respuesta inmune, produciendo una infección crónica y persistente, llevando al avance clínico de la enfermedad con una mortalidad notablemente alta en un período de aproximadamente 10 años (11).

La introducción de la terapia antirretroviral de alta eficacia (HAART, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de la enfermedad por VIH ha tenido un impacto sobre la historia natural de la infección con un aumento de la

supervivencia de los pacientes y una disminución de las enfermedades oportunistas (12).

Alrededor de 2 millones de personas se infectan con el virus cada año y la pandemia continúa cobrando un alto costo en vidas y afectando las finanzas de los países más pobres, a pesar de tres décadas de conocimiento e investigación sobre la patogénesis de la enfermedad. Los mecanismos por los cuales el VIH causa sida son multifactoriales y no están totalmente dilucidados, esta es la razón principal por la cual el sida no ha podido ser erradicado del mundo (13).

La variabilidad de respuesta a la infección por VIH se debe a las complejas interacciones entre el virus, el hospedero y el ambiente (14). Múltiples estudios longitudinales han proporcionado amplia evidencia de la variabilidad de la evolución de la infección por VIH (14-16). Algunos individuos progresan a sida dentro del año de la seroconversión, mientras otros pueden controlar el virus sin tratamiento por más de dos décadas. Una pequeña proporción de individuos es resistente a la infección por VIH, incluso en exposiciones repetidas (16).

El estudio del polimorfismo genético del hospedero en la patogenia de la infección por VIH es de gran importancia y se han alcanzado notables avances en la última década, en parte debido al desarrollo de las técnicas de biología molecular. Definir los factores genéticos que influyen en la respuesta al VIH puede ser útil para predecir la progresión de la enfermedad, entender la patogenia y desarrollar estrategias terapéuticas y de vacunas (16).

Los polimorfismos de nucleótidos simples (SNP, siglas en inglés) son variantes de un solo nucleótido, generalmente bialélicos y representan los polimorfismos

más abundantes del genoma humano (se encuentran cada 200 a 500 pb). Los SNP median la expresión de mediadores inflamatorios como las citocinas y receptores de quimiocinas (14, 17).

En el contexto de VIH, los estudios genéticos de cohorte han mostrado asociaciones de varios SNP con las diferentes variaciones de progresión y de susceptibilidad a la infección en las poblaciones estudiadas (15, 18). Los receptores de quimiocinas, las citocinas y las variaciones de los antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés) tienen gran influencia en la susceptibilidad, desarrollo y progresión del VIH-1 (19).

Se describe que el receptor de quimiocinas CCR5 influye significativamente en la replicación y progresión de la enfermedad, lo que explica el 20 % de la variabilidad genética de esta enfermedad (19). Se han identificado diferentes variantes genéticas como modificadoras de la evolución de la enfermedad incluyendo  $ccr5^{-\Delta 32}$  (deleción de 32-pb introduciendo una parada prematura en el codón), variantes promotoras en  $ccr5$  y variantes en el ligando del CCR5 (CCL5) (20,21). La variante homocigótica  $ccr5^{\Delta 32/\Delta 32}$  y el complejo heterocigótico con otras mutaciones raras de aminoácidos, en su mayoría, son resistentes a la infección por VIH (21, 22).

La infección y la replicación del VIH *in vivo* e *in vitro* está bajo una continua regulación de una compleja red de citocinas producidas por una variedad de células. Estos efectos de las citocinas sobre el VIH pueden ser inhibitorios o estimulatorios (23). Un equilibrio entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias juega el principal rol en la activación inmune sistémica y en la progresión de la enfermedad por VIH (24). Las citocinas activadoras de la replicación del VIH son las citocinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$ , IL-1b e IL-6. La

infección por VIH eleva la producción de TNF- $\alpha$  *in vitro*, aumentando la replicación del virus (25). Por otro lado, INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , e IL-16 inhiben la replicación viral. Otras citocinas como IL-2, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , e INF- $\gamma$ , tienen efectos duales, suprimen o inducen la replicación viral (23). Monitorear los diferentes polimorfismos de citocinas y la relación con sus niveles durante la progresión de la infección, puede ser crucial para el manejo de la enfermedad (24). Los perfiles inmunogenéticos que se han descrito mayormente asociados con la susceptibilidad y la evolución de la infección, son los SNP de los genes de citocinas que regulan la respuesta inmune como TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-10, e IL-6 (16, 17, 26).

La mayoría de los estudios están enfocados a identificar diferentes fenotipos de susceptibilidad a la infección que incluyan población general y grupos de riesgo expuestos no infectados, así como marcadores de progresión de la enfermedad incluidos carga viral, el rango de disminución de linfocitos T CD4+ y el tiempo de desarrollo de sida (16, 17). Esta aceptado que una minoría de personas son resistentes a la infección por VIH. Sin embargo, la delección homocigótica  $ccr5^{\Delta 32}$  es el único genotipo consistentemente identificado que confiere protección contra la infección por VIH. Otras variantes han sido propuestas que confieren similar protección contra la infección, pero los resultados no se han podido replicar en otros estudios u otras variantes de genes han sido identificadas. Estos datos sugieren que existen otros efectos genéticos que protegen contra la infección que son de menor penetrancia, frecuencia o son interacciones más complejas entre dos o más variantes genéticas (21).

Estimando la herencia total de la progresión de la enfermedad y entendiendo como puede ser la distribución a través de las diferentes clases de variantes

genéticas, tales como SNP, variantes raras y variantes del número de copias, se podrá informar que tipo de estudio tendrán el mayor impacto (20).

Con respecto a las investigaciones sobre SNP y VIH en Cuba, en la literatura revisada se recoge el estudio de Hernández y colaboradores en 2024 que tuvo como objetivo estimar la frecuencia de los polimorfismos  $ccr5^{\Delta 32}$ , IL-6-174G/C, IFN-  $\gamma$ +874T/A e IL-10-1082A/G en pacientes cubanos infectados por VIH y un grupo de parejas serodiscordantes para evaluar su influencia sobre el riesgo y la progresión de la enfermedad. Anteriormente en 2021 y 2023 respectivamente, este grupo de investigadores analizaron el polimorfismo genético del correceptor CCR5 en pacientes VIH menores y mayores de 50 años. También se realizó en 2003 una tesis de maestría sobre la presencia del polimorfismo del correceptor CCR5 en pacientes VIH de reciente diagnóstico y de más de 10 años de evolución. No se encontró polimorfismo homocigótico  $\Delta 32$  y el polimorfismo heterocigótico  $\Delta 32$  estuvo entre un 8 % y 10 % en las diferentes investigaciones realizadas (27-30).

La mayoría de los estudios coincide en que la variabilidad interindividual en la susceptibilidad a la infección por VIH, la transmisión, la progresión de la enfermedad y la respuesta a la terapia antirretroviral puede ser atribuida a determinantes del huésped y a la variabilidad de múltiples genes. Un mejor entendimiento de la base genética e inmunológica de la resistencia natural a la infección puede tener importantes implicaciones en el desarrollo de nuevas terapias y vacunas (3).

En Cuba no se han realizado amplios estudios de polimorfismo genético en pacientes VIH/sida y en personas expuestas al VIH-1 no infectadas por lo que esta investigación contribuirá al conocimiento de la patogénesis de la

enfermedad en el país. Además, podría contribuir a que se implementen protocolos de manejo de los pacientes que impacten en un manejo del paciente más personalizado para su diagnóstico clínico, en la progresión de la enfermedad, y la aparición de enfermedades oportunistas. Esta información puede ayudar a las autoridades de salud a implementar estrategias más efectivas en aras de minimizar la morbilidad, mortalidad y costos de las terapias antirretrovirales en pacientes VIH/sida, así como mejorar la calidad de vida de esta población.

## **Hipótesis**

El polimorfismo genético del correceptor *CCR5* y de los genes de citocinas *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ*, de modo individual o por su interacción, influyen en la evolución de la enfermedad en pacientes cubanos VIH/sida y en la trasmisión viral en sujetos expuestos no infectados.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Caracterizar el polimorfismo genético del correceptor *CCR5* y de los genes de citocinas *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ* en pacientes cubanos VIH/sida y sujetos expuestos no infectados.

### **Objetivos Específicos**

1. Describir algunas variables demográficas y de laboratorio de los pacientes VIH/sida y sujetos expuestos no infectados.

2. Identificar el polimorfismo genético del correceptor *CCR5* y los genes de citocinas *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ* en pacientes VIH/sida y sujetos expuestos no infectados.
3. Determinar la relación de los polimorfismos genéticos con marcadores inmunológicos y virológicos de progresión en pacientes VIH/sida y tiempo de exposición al VIH en sujetos expuestos no infectados.
4. Identificar la asociación de los polimorfismos genéticos estudiados con las enfermedades oportunistas en pacientes VIH/sida.

### **Novedad Científica**

Este trabajo es el primer estudio en Cuba que describe el polimorfismo del correceptor *CCR5* y tres genes de citocinas y su papel en la patogenia de la infección por VIH en la población cubana y en parejas expuestas no infectadas. Las distribuciones alélicas y genotípicas de los genes *CCR5*, *IL-6*, *INF-γ* e *IL-10* no difieren significativamente entre los grupos estudiados.

Se sugiere el papel del polimorfismo genético homocigótico *GG* de *IL-6* en la epidemia cubana de VIH/sida, asociado con niveles elevados de carga viral en el grupo de pacientes VIH-1+ y con mayor tiempo de exposición al VIH-1 en el grupo de sujetos expuestos no infectados.

La combinación de SNP *CCR5<sup>wt</sup>*, *IL-6 GC*, *IL-10 GA*, *INF-γ TA* mostró un aumento de la presencia de enfermedades oportunistas. Proporcionando las primeras evidencias en Cuba que relaciona los polimorfismos genéticos con las enfermedades oportunistas.

Esta investigación brinda nuevos conocimientos sobre la patogenia de la infección por VIH en un grupo de la población cubana VIH y parejas expuestas

no infectadas, con lo cual se podrían implementar nuevas estrategias para minimizar la morbilidad, mortalidad y costos de las terapias antirretrovirales en pacientes VIH/sida.

### **Valor Práctico**

Los resultados obtenidos permitieron la introducción en el laboratorio clínico del IPK de diferentes técnicas de biología molecular para determinar polimorfismos genéticos de interés para la enfermedad del VIH/sida como son: correceptor ccr5 y de las citocinas IL-6, IL-10 e INF- $\gamma$ . Estos resultados son válidos y extrapolables a otros grupos poblacionales para este tipo de estudio.

### **Valor Teórico**

Los resultados obtenidos en este trabajo como valor teórico general contribuyen al conocimiento de la patogénesis de VIH en la población seropositiva nacional cuyo origen genético es muy diverso. De la misma manera, por primera vez se obtiene información sobre el polimorfismo genético del correceptor ccr5 y tres genes de citocinas en los pacientes VIH/sida y en sujetos expuestos no infectados. Por último, se aportan elementos sobre la influencia de los polimorfismos genéticos en la progresión y evolución de la enfermedad por VIH.

# **MARCO TEÓRICO**

## **I. MARCO TEORICO**

### **1.1 Generalidades de VIH**

Han transcurrido cuatro décadas desde el descubrimiento del VIH y más de dos décadas del comienzo de tratamiento antirretroviral, sin embargo, la infección por el VIH sigue siendo un importante problema de salud pública mundial. Aunque han sido numerosos los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la infección por el VIH, todavía no existe un tratamiento curativo (1).

La susceptibilidad de VIH y la progresión de la enfermedad muestran un grado sustancial de heterogeneidad individual, la mayoría puede conferirse a la variación genética del huésped. El número de factores del huésped identificados en la infección por VIH es aún pequeño y sólo explica el 15–20 % de la variabilidad genética observada y la mayoría es atribuible a HLA. La identificación de genes que afectan la susceptibilidad y resistencia a la infección es clave para entender las interacciones VIH-huésped y para el desarrollo de terapias y vacunas (31).

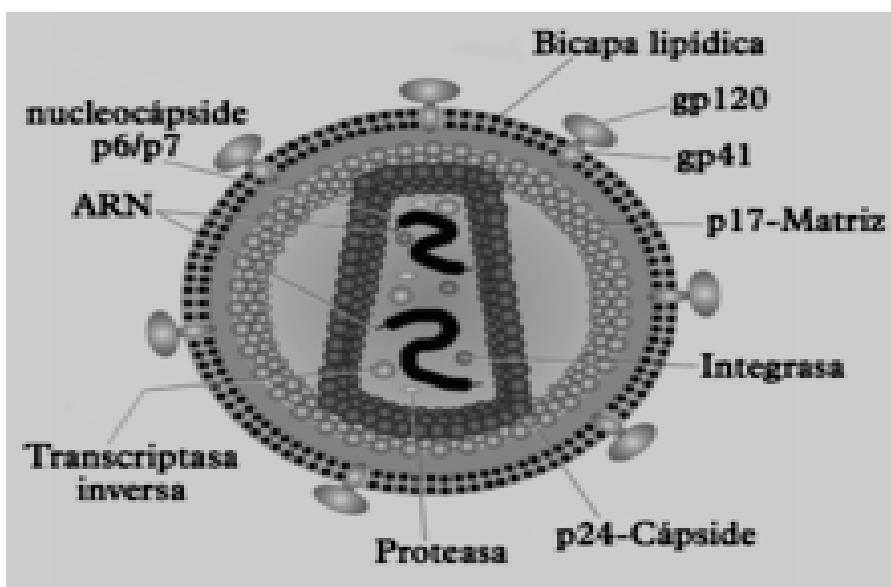
### **1.2 Biología del VIH**

El VIH es el agente etiológico del sida. Pertenece a una gran familia de lentivirus de ácido ribonucleico (ARN) que se caracteriza por su asociación con estados de inmunosupresión y diferentes períodos de incubación después de la infección, antes de que las manifestaciones de la enfermedad se hagan aparentes (32).

Se han identificado dos tipos muy estrechamente relacionados de VIH designados VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es la causa más frecuente de sida. El VIH-

2 que difiere en su estructura genómica y antigenicidad, causa una forma de sida con una progresión más lenta que la enfermedad ligada al VIH-1 (33).

El VIH-1 identificado en 1983, consiste, en su forma madura, de un núcleo que contiene el genoma viral constituido por dos segmentos cortos de ARN de aproximadamente 9 200 nucleótidos y las enzimas reverso transcriptasa, proteasa, ribonucleasa e integrasa, todo rodeado de una envoltura externa lipídica derivada de la célula hospedera. Esta envoltura tiene 72 proyecciones superficiales, y contiene las glicoproteínas gp120 y gp41 (34) (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática del VIH-1 (35).

**Fuente:** modificado de [www.web.books.com/Infections/AIDS\\_HIV.htm](http://www.web.books.com/Infections/AIDS_HIV.htm).

El genoma de todos los retrovirus está integrado por tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. Estos codifican las proteínas internas, las enzimas y las proteínas de la envoltura, respectivamente. Las secuencias *gag* codifican las proteínas estructurales del núcleo; las *env*, las glicoproteínas gp120 y gp41; mientras que las secuencias *pol* codifican las enzimas reverso transcriptasa, integrasa y proteasa virales (35). (Figura 1).

Durante la infección de la célula, y como consecuencia de la transcripción inversa, se origina la doble cadena viral de ADN, flanqueada a ambos lados por secuencias repetitivas largas terminales de R, denominadas repeticiones terminales largas (del inglés LTR). Estas secuencias juegan un papel muy importante en la inserción del ADN viral al ADN celular, así como en el control de la transcripción (35). Además de estos genes típicos de retrovirus, existen otros seis genes reguladores, los llamados *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*, cuyos productos regulan de diversas formas la reproducción viral (34, 35).

### 1.3 Origen y tipos de VIH

El sida fue diagnosticado y reconocido como una nueva enfermedad en 1981, en los EE. UU, con el descubrimiento subsecuente de VIH-1 como el agente causal, en 1983. El VIH surgió de las transmisiones zoonóticas entre especies, del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) de los monos a los grandes monos y finalmente a los humanos (36).

Los dos tipos de VIH identificados hasta la fecha, VIH-1 y VIH-2, presentan similar morfología, tropismo, y vías de transmisión (5,6).

El VIH-1 es el responsable de más del 95 % de las infecciones a nivel mundial. Teniendo en cuenta las diferentes variantes de VIH-1 es clasificado en cuatro grupos: **major** (M), **non-outlier** (N), **outlier** (O), y P. El grupo M de VIH-1 es la variante predominante de las infecciones a nivel mundial, más del 90 % y por consiguiente de la epidemia global VIH/sida. El grupo M puede ser clasificado en nueve subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, y K). Los virus que pertenecen a los otros tres grupos son endémicos en ciertos países africanos y causan menos infecciones (36).

El subtipo globalmente dominante de VIH-1 es el subtipo C corresponde con casi el 50 % de infecciones a nivel mundial y se concentra en Sudáfrica e India.

El subtipo B de VIH-1 es dominante en América, Europa Occidental y Australia corresponde al 10 % de las infecciones globales (37, 38).

Dos o más de estos subtipos pueden recombinar su material genético para generar el mosaico variado conocido como forma recombinante circulantes (FRCs); alrededor de 97 FRC se han reportado (37). CRF 19 es una forma recombinante predominante en Cuba con 24,1 % de nuevos pacientes infectados con esta variante (39, 40).

Al contrario de VIH-1, VIH-2 es principalmente endémico en África Oriental, aunque el virus se ha extendido a otras partes de mundo en la última década. Aproximadamente 1 a 2 millones de personas están infectadas con VIH-2 (37, 38).

#### **1.4 Ciclo replicativo del Virus de Inmunodeficiencia Humana**

Las partículas virales que inician la infección se encuentran en la sangre, el semen y la leche materna de un individuo y se introducen en otro individuo por contacto sexual, a través de una punción con agujas contaminadas o por transmisión vertical de madre a hijo (41).

La infección por VIH tiene lugar principalmente a través de las mucosas. El virus puede entrar a la lámina propia conducido por células dendríticas, epiteliales y células M (42).

El VIH infecta principalmente células que expresan moléculas CD4. Aunque varios tipos celulares pueden expresar este receptor, los linfocitos T CD4+ juegan un papel crucial en la infección por VIH. Otras células susceptibles a la

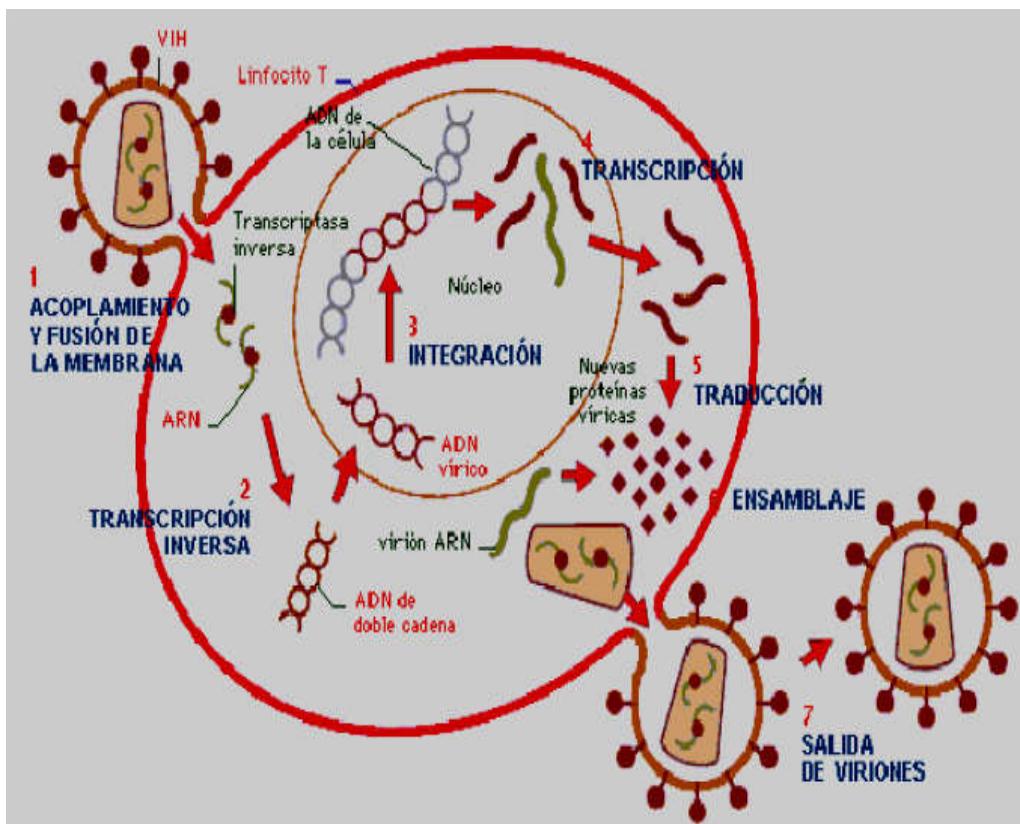
infección son, monocitos, macrófagos, células naturales asesinas (del inglés Natural Killer NK), células dendríticas, células gliales en el cerebro (43).

La infección por el VIH se inicia cuando la glicoproteína de la envoltura gp120 de una partícula viral se une a la molécula CD4 y a un correceptor que es miembro de la familia de receptores de quimoquinas. CCR5 sirve como correceptor para la entrada de VIH-1 a macrófagos mientras que CXCR4 se relaciona con la entrada del virus a células T (20).

Los principales correceptores del VIH-1 que determina el tropismo viral son CCR5 y CXCR4, que pertenecen a la familia de receptores de quimiocinas CC y CXC respectivamente. Los ligandos naturales de CCR5 son las quimiocinas Regulador de la activación expresado y secretado en células T (del inglés *Regulated on Activation Normal T cells Expressed and Secreted* (RANTES o CCL-5) y la Proteína inflamatoria de macrófago 1 $\alpha$  o 1 $\beta$  (del inglés *Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$*  (MIP 1- $\alpha$  o CCL-3) y 1- $\beta$  (MIP 1- $\beta$  o CCL-4). El único ligando natural conocido de CXCR4 es Factor 1 derivado de células del estroma (del Inglés *Stromal Cells Derived Factor 1* (SDF-1 o CXCL-12). Existen otras moléculas que también pueden actuar como correceptores, aunque de manera menos eficaz que los anteriores. Algunas de estas moléculas son otros receptores de quimiocinas: receptor de quimiocinas CC tipo 3, 2, 8 respectivamente (CCR3, CCR2, CCR8), receptor de quimiocinas CX<sub>3</sub>C tipo 1 (CX<sub>3</sub>CR1) o receptor e quimiocina CC tipo 9 (CCR9) (44, 45).

La unión de la glicoproteína gp120 de la envoltura del VIH a la molécula CD4 de la célula diana ocurre de forma secuencial. Esta unión induce el cambio de conformación de gp120 que promueve la unión al receptor de quimiocinas; a continuación, cambia la conformación de gp 41 y expone el péptido de fusión,

que se inserta en la membrana de la célula diana. Este péptido contiene residuos aminoacídicos hidrófobos que promueven su inserción en la bicapa lipídica de la membrana plasmática de la célula hospedera, por lo que quedan fusionadas las membranas viral y celular. Los pasos siguientes son: entrada al citoplasma del genoma viral, síntesis de ADN proviral mediada por la transcriptasa inversa, integración del provirus en el genoma celular, activación de la célula por citocinas, transcripción del genoma del VIH, transporte del ARN procesado al citoplasma, síntesis de proteínas virales, ensamblaje de la estructura del núcleo del virión y expresión de gp120/gp41 en la superficie celular; finalmente, la gemación del virión maduro(16, 34). (Figura 2)



**Figura 2.** Etapas del ciclo replicativo del VIH.

Fuente: modificado de [www.web.books.com/Infections/AIDS\\_HIV.htm](http://www.web.books.com/Infections/AIDS_HIV.htm).

## 1.5 Historia natural y formas de progresión de la infección

La infección por el VIH causa sida porque la respuesta inmune del huésped no es capaz de erradicar la infección y el virus destruye el sistema inmune. La infección inicial con el VIH puede ser asintomática o presentarse con manifestaciones clínicas inespecíficas comunes a muchas infecciones virales como: fiebre, mialgias, adenopatías, que remiten en corto plazo (20).

En la evolución natural de la infección, sigue un período de duración variable, entre 2 y 10 años, en el que el infectado es portador asintomático y puede trasmitir la infección. Después de este período puede desarrollar linfadenopatías generalizadas, pero el sistema inmune sigue siendo competente y controla la mayoría de las infecciones del huésped (41).

Un pequeño porcentaje de individuos infectados (5-10 %) continúan asintomático después de 10 años de infección, son los conocidos como progresores lentos o con sobrevida prolongada (46). Otros pacientes, evolucionan a la enfermedad en 2 o 3 años que son los progresores rápidos presentan directamente las manifestaciones clínicas de sida que se caracterizan por presentar alguna de las enfermedades marcadoras de sida o por presentar niveles de células T CD4 menor de 200 cel/ $\mu$ l independientemente de que tenga o no enfermedad marcadora (46).

El desarrollo de infecciones oportunistas se correlaciona con la pérdida de linfocitos T CD4. El pronóstico es variable; la edad, la vía de transmisión y la forma de presentación influyen en la supervivencia. El tratamiento con antirretrovirales ha favorecido la supervivencia de los pacientes con infecciones oportunistas (44).

La mayor parte de las infecciones oportunistas se producen por reactivación de organismos latentes en el huésped y en algunos casos por organismos a los que se está expuesto continuamente; se suelen afectar tres sistemas orgánicos fundamentalmente, el sistema respiratorio, el tubo digestivo y el sistema nervioso (47). Las infecciones en el sida son severas y en general producidas por gérmenes oportunistas, siendo la más frecuente la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (*PcP*) que ocurre en 10 % al 30 % de los adultos con sida (48, 49). Otros agentes infecciosos frecuentes son: *Candida albicans* que suele producir dificultad en la deglución, úlceras esofágicas. La infección por *Citomegalovirus* se asocia a un deterioro importante del sistema inmunológico y puede aparecer cuando existen niveles de linfocitos T CD4 por debajo de 50 cél/ $\mu$ L. *Cryptosporidium* se ha aislado en pacientes con diarreas y pérdida de peso. *Mycobacterium tuberculosis* es una de las causas de muerte en personas afectadas por el VIH que no necesariamente se manifiesta a nivel pulmonar, siendo atacado por esta enfermedad otros órganos extrapulmonares como por ejemplo los ganglios (50). Otras micobacterias se asocian con una alta frecuencia encontrándose dentro de las infecciones bacterianas más comunes entre personas en etapas avanzadas de sida, con un número de células T CD4 inferior a 50cél/ $\mu$ L (50).

El sistema nervioso central (SNC) es otra localización importante de la infección por VIH que da lugar a manifestaciones neurológicas en aproximadamente 50 % de pacientes con sida (51).

## 1.6 Patogénesis e inmunidad de la infección por VIH-1

La infección por VIH es un proceso dinámico que se desarrolla a lo largo del tiempo pasando por distintas etapas con características clínicas e inmunológicas específicas (8, 52).

**Etapa de primoinfección:** ocurre entre las 4-12 primeras semanas y es un periodo en el que comienza a aumentar exponencialmente la replicación del virus, teniendo por tanto una Carga Viral (CV) elevada. Sobre el día 10 comienza a ser detectable en sangre y conforme avanza la diseminación se comienzan a detectar anticuerpos sobre el día 30 alcanzando el punto máximo. Esta etapa puede ser asintomática o sintomática con manifestaciones clínicas parecidas a una mononucleosis infecciosa con fiebre, linfoadenopatías, mialgias o úlceras dolorosas, así como dolores articulares, diminución del apetito, pérdida de peso, caída del cabello, náuseas, vómitos, diarreas, cefaleas, dolor retroocular, entre otras. Estos signos y síntomas se denominan Síndrome Retroviral Agudo.

**Etapa de latencia clínica:** esta etapa transcurre con un descenso mantenido de los linfocitos CD4+ y con un aumento lento de la CV. Su curso se caracteriza por un periodo de tiempo largo, donde el hospedero se convierte en un portador asintomático. En general, transcurre entre un año a ocho años y medio si se cuenta con tratamiento adecuado. Los síntomas aparecen en relación al grado de inmunodeficiencia presente en el hospedero pueden ser síntomas generales, anemia, síntomas respiratorios, digestivos o neurológicos.

**Etapa sida:** es el estadio final de la infección por VIH. Se caracteriza por la marcada disminución de linfocitos T CD4+ por debajo de 200 células/ $\mu$ L. En estas condiciones el sistema inmune no es capaz de hacer frente a la infección,

por lo que aumenta la CV de manera exponencial. De este modo, pueden aparecer enfermedades oportunistas, tumores, síndrome de consunción.

Generalmente se considera que el sida es el resultado de la infección por VIH asociado a la pérdida de células T CD4+. La activación inmune crónica y la infección de diversos subtipos de células T CD4 causan agotamiento inmune y la depleción de las células inmunes que protegen contra las infecciones oportunistas (7, 52, 53).

Las nociones de la disminución y restauración de las células T CD4+ abarca procesos que son muy diferentes en los distintos subconjuntos de células T CD4+ y según su localización en los tejidos (54). Los linfocitos T CD4+ son una población heterogénea que en términos muy generales se puede dividir en función del fenotipo en células *naive* y células de memoria. Las células *naive* expresan el receptor CD45RA, CD62L (L-selectina) y no expresan marcadores de activación celular, mientras que las células de memoria expresan CD45RO y marcadores de activación celular (54).

La expresión de los correceptores del VIH en las células T CD4+ también es diferente en función del fenotipo celular. La expresión del correceptor CCR5 está restringida a las células de memoria. El correceptor CXCR4 se expresa tanto en células *naive* como en células de memoria, siendo la expresión mayor en las células *naive*. Ambos tipos celulares son infectados *in vivo*, sin embargo las células de memoria son las dianas principales del virus. Este subtipo celular presenta una mayor cantidad de provirus y una mayor capacidad de producir virus en cultivo de tejidos tras la activación con interleucina 2 (IL-2) o estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 (54).

Los Linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para VIH son críticos para orquestar la respuesta inmune específica que limita la replicación y expansión del virus durante la infección primaria de VIH (55).

Los CTL a través de su receptor de células T (TCR) reconocen y se unen a pequeños péptidos derivados del VIH, los cuales son derivados del procesamiento en el proteosoma de proteínas virales maduras o de proteínas virales truncadas defectuosas, que son presentadas por moléculas HLA de clase I en la superficie de las células infectadas (55).

Seguido de este contacto directo célula a célula, una sinapsis inmunológica se establece entre los dos tipos celulares que activan una cascada de mecanismos efectores. Estos incluyen la secreción de moléculas efectoras que inducen muerte celular como granzimas, perforinas y ligandos de la superfamilia de receptores de TNF, y la liberación de una variedad de citocinas antivirales y quimiocinas que colectivamente orquestan la lisis de las células infectadas. También se ha reportado que los CTL específicos para VIH controlan la infección por mecanismos no citotóxicos, específicamente la secreción de  $\beta$  quimiocinas que bloquean la infección por VIH en las células dianas de la infección (55).

La activación linfocitaria y la replicación persistente del VIH son una constante desde el inicio de la infección, aún en las etapas asintomáticas. Como resultado de la activación inmunitaria se generan células T activadas que son diana para el virus en sí mismo, y con esto se produce un aumento de la replicación viral. Es decir se genera un circuito de retroalimentación positiva donde la activación inmune potencia la replicación del VIH, lo que a su vez potencia la activación del sistema inmune (56).

Varios indicadores immunofenotípicos y solubles se han usado para cuantificar el nivel de activación de las células T *in vivo*. Los primeros incluyen: CD38, HLA-DR, CD25, CD69, CD70; y solubles como: Proteína C Reactiva,  $\beta$ 2-microglobulina y neopterina (56).

**CD38:** Reinherz y colaboradores identificaron la molécula CD38 en la década de los 80 (57). Es una glicoproteína transmembrana multifuncional de 300 aminoácidos con una masa molar de 42–45 kDa, con un dominio citoplasmático N terminal de 21 aminoácidos, un dominio transmembrana de 21 aminoácidos y 258 aminoácidos con dominios catalíticos y de receptor (58). Participa en la transducción de señales durante la activación celular y su expresión aumenta en las primeras etapas de la misma (59).

Los primeros estudios sugieren que el sello de activación inmune en los pacientes con VIH es el aumento de la expresión de la molécula CD38 en las células T, particularmente las células T CD8 de memoria (60).

Durante la infección temprana la expresión de CD38 es significativamente alta (59). Varios estudios plantean que los pacientes VIH con niveles de células CD4+ normal tienden a desarrollar la fase sida más rápidamente si sus niveles de CD38 son más altos. Mientras que en los pacientes VIH con niveles bajos de células CD4+, su condición puede mantenerse relativamente estable si ellos tienen niveles bajos de expresión de CD38 (61, 59).

**La Proteína C Reactiva** es un marcador inflamatorio inespecífico con una estructura pentamérica que permanece estable durante un largo tiempo (62). Fue descubierta por Tillett y Francis en 1930 fue denominada así porque fue identificada por primera vez como una sustancia en el suero de los pacientes con inflamación aguda que reaccionaba con el polisacárido C de *Streptococcus*

*pneumonia* (63-66). Se sintetiza por el hígado y el endotelio vascular en respuesta a IL-6 liberada por macrófagos y adipocitos (66).

Es codificada por un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 1, compuesto únicamente por 2 exones y 1 intrón, sin embargo, se trata de una región altamente polimórfica, con más de 40 variantes conocidas (63).

Las altas concentraciones de proteína c reactiva se asocian a bajos números de células CD4 y altos niveles de carga viral en los pacientes VIH/sida (66).

Varios estudios reportan una asociación significativa entre las altas concentraciones de Proteína C Reactiva y la rápida progresión a sida y un mayor riesgo de mortalidad (67, 68, 69).

**β 2 Microglobulina (B2M):** fue descrita como un componente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que está ligado con las cadenas pesadas de clase I (70).

Es una molécula de 11.8 kDa y fue aislada por primera vez de la orina de pacientes con proteinuria (71). Cuando la molécula de MHC clase I es degradada, B2M es liberada en el torrente sanguíneo y se elimina completamente por el riñón en los individuos con función renal normal. La concentración de β2-microglobulina en suero aumenta durante la progresión de la infección del VIH (72).

## **1.7 Tratamiento antirretroviral**

Los primeros años de la epidemia del VIH fueron caracterizados, por altos índices de mortalidad. En un principio la única opción para mantener y prolongar la expectativa de vida de los pacientes, era la prevención y el tratamiento de enfermedades oportunistas. En 1987 por primera vez se emplearon tratamientos dirigidos específicamente contra el VIH. Fue durante

estos años, entre 1987 y 1990, que la era con antirretrovirales (ARV) comenzó (73).

En la actualidad todavía no existe tratamiento capaz de eliminar completamente la infección por VIH. Sin embargo, el desarrollo de los fármacos antirretrovirales y la combinación de estos en diferentes esquemas y con diversas pautas ha permitido cambiar radicalmente el curso de la infección en la mayoría de los casos. Convirtiendo una enfermedad mortal a corto plazo, en una condición con manejo crónico y expectativa de vida prolongada (74).

La terapia antirretroviral (TAR), en las combinaciones actuales, suprime la replicación viral hasta el punto de que la CV permanece indetectable, lo cual permite la preservación y la recuperación inmunológica y el aumento de células T CD4+ activadas. Es por eso que, a diferencia de años anteriores, en la actualidad se administra TAR a toda persona con diagnóstico de VIH establecido, con independencia de los valores de CV y CD4 (75).

La prescripción de los ARV ha adquirido gran complejidad por la aparición de diferentes familias, incluyendo más de 40 fármacos y las combinaciones de estos. Esto se debe a una gran variabilidad en cuanto a eficacia, toxicidad, resistencias, barrera genética, tropismo, interacciones y uso en situaciones clínicas especiales. Esta complejidad hace necesaria la elaboración y actualización frecuente de guías y recomendaciones sobre la TAR (75).

El advenimiento de la terapia antirretroviral abrió nuevas perspectivas al manejo de dicha infección, pero los fenómenos de resistencia a los antirretrovirales, los efectos secundarios de los mismos y las variaciones genotípicas del virus nos indican que aún no se ha cerrado este capítulo en la ciencia médica actual (75).

## **1.8 Situación epidemiológica en Cuba y el mundo**

El virus del sida causó la muerte de 36,3 millones de personas desde que fue identificado por primera vez en la década del 1980. El número de personas infectadas con VIH en todo el mundo es de 79,3 millones, según el informe del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida (4).

La prevalencia del VIH en adultos en el Caribe se estima en un 3,0 %. República Dominicana y Haití tienen la tasa más elevada de infecciones (4).

En Cuba hasta el año 2023 se han diagnosticado 41 180 seropositivos al VIH, de ellos el 80 % son hombres y el 20 % son mujeres (76).

## **1.9 Polimorfismo genético y enfermedades infecciosas**

Las enfermedades causadas por agentes infecciosos han ocurrido a lo largo de la historia de los humanos modernos (77). Como resultado de nuestras continuas interacciones con los patógenos, nuestros genomas se han formado a través de los procesos de co-evolución, con los patógenos imponiendo una presión de selección que llevan a la selección de las características del genoma de los ancestros y de los humanos modernos (46). Entender cómo influye la genética humana en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas ofrece la oportunidad para nuevos conocimientos en la patogénesis, nuevos medicamentos potenciales, la estratificación de riesgo, la respuesta a la terapia y la vacunación. Así como, un mayor conocimiento de las diferencias sustanciales en las asociaciones genéticas entre las poblaciones (78).

Las interacciones del hospedero-microorganismo tienen el potencial para producir una respuesta inmune variada y diversa en las diferentes poblaciones estudiadas condicionada por el fondo genético del individuo (79).

La evaluación simultánea de los polimorfismos genéticos del huésped y de los patógenos se utilizó en VIH para revelar la influencia de los genes de HLA y el coreceptor *CCR5*. Considerando cómo el virus muta a lo largo del curso de la infección, es de relevancia considerar como influye el fondo genético del huésped en esta interacción para comprender la patogenia de la infección por VIH (80).

### **1.9.1 Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP): Generalidades**

Los SNP son variantes de un solo nucleótido, generalmente bialélicos y representan los polimorfismos más abundantes del genoma humano (se encuentran cada 200 a 500 pb). Datos del Proyecto 1000 Genomas indican que hay cerca de 11 millones de ellos y cada individuo presenta en promedio tres millones (81). Dada su amplia distribución, los SNP se encuentran en regiones donde hay o no genes. En los primeros se localizan en cualquier parte de su estructura e incluye los promotores, exones e intrones, mientras que los SNP localizados en genes de ARN no codificantes pueden encontrarse en los promotores o en la secuencia no codificante (82). Los SNPs median la expresión de mediadores inflamatorios y receptores de quimiocinas (83).

Los SNPs presentes en el promotor o en regiones codificantes de los genes de citocinas producen alteración de la función transcripcional y diferencias en la secreción de citocinas (84).

Los SNPs se cree que son la fuente principal de variabilidad entre los humanos, sobre todo cuando ellos influyen en la expresión o función del gen dependiendo de la localización en la secuencia del ADN. Se detectan fácilmente y se consideran como uno de los mejores marcadores biológicos de asociación en estudios de casos-controles (85). Se han descrito que los

polimorfismos en genes de citocinas podrían afectar la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (84). Por ejemplo, hay muchos SNPs en genes de citocinas reportados como las posibles causas de resistencia/susceptibilidad a VIH (2, 26, 84, 85).

### 1.9.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

El principio de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. Las frecuencias esperadas (E) se pueden comparar con las observadas (O) utilizando la prueba de  $\chi^2$   $HW = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$ , con 1 grado de libertad. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo (86).

Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de EHW en la muestra de controles (como representantes de la población general). En el caso de que se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación, pues en ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otros. Otras posibilidades son que los individuos no sean independientes (por ej., por consanguinidad) o que se dé una selección de un alelo (por estar asociado con la longevidad). Si se emplea un nivel de significancia de 5 %, por azar puede observarse falta de ajuste a lo esperado, aunque la condición de transmisión de alelos con independencia sea correcta

en la población del estudio. En la muestra de casos es posible que no se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg; ello puede ser indicativo de que el polimorfismo pueda estar asociado con la enfermedad (87, 88).

### 1.9.3 SNP y VIH

Desde los inicios de la pandemia, se puso de manifiesto que el riesgo de adquisición de VIH es muy diferente entre los humanos y que, en los individuos expuestos, una proporción de personas permanece negativa a VIH por largos periodos de tiempo. También se observó diferencias importantes en el curso natural de la infección por VIH (como tiempo entre el diagnóstico del sida y la ocurrencia de infecciones oportunistas o malignas). Todo esto sólo era parcialmente explicado por las variables conocidas como la edad y comorbilidades. Todas estas observaciones clínicas y epidemiológicas hicieron pensar en factores adicionales que modulan la respuesta inmune a VIH, que incluye la variación heredada en los genes y los polimorfismos genéticos de citocinas, quimiocinas y HLA involucrados en la respuesta inmune innata o adquirida contra la infección (8).

El primer gen de restricción asociado a sida en ser descubierto fue *ccr5*<sup>A32</sup> (89). Posteriormente, un número de SNP asociados con VIH fueron identificados dentro de los que se identificaron genes de HLA, genes de quimiocinas y sus receptores involucrados en la entrada del VIH a la célula, como CCR2, CXCR6, RANTES y genes de citocinas como *IL-2*, *IL-10*, *INF-γ*; *TNF-α* (15).

La susceptibilidad de VIH muestra un grado sustancial de heterogeneidad individual, la mayoría conferida a la variación genética del huésped. El número de factores del huésped identificados en la infección por VIH es aún pequeño y sólo explica el 15–20 % de la variabilidad genética observada y la mayoría es

atribuible a HLA. La identificación de genes que afectan la susceptibilidad y resistencia a la infección es clave para entender las interacciones VIH-huésped y para el desarrollo de terapias y vacunas (90).

### **1.10 Quimiocinas y citocinas. Generalidades**

Las quimiocinas son una gran familia de citocinas de masa molecular baja con una estructura homologa que estimulan la quimiotaxis de leucocitos y regulan su migración desde la sangre a los tejidos mediante la activación de las integrinas de leucocitos. Mantienen la organización espacial de diferentes subgrupos de linfocitos y células presentadoras de antígenos dentro de los órganos linfáticos (91).

Los receptores de quimiocinas son proteínas transmembranas que pertenecen a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que son clasificados en cuatro familias distintas (CXC, CC, CX3C, y XC) de acuerdo a la estructura de sus ligandos naturales. Todos los GPCR comparten una estructura molecular común de siete hélices transmembranas y transmite señales de ligandos extracelulares a vías biológicas intracelulares a través de proteínas G heterotriméricas (92).

Las regiones estructurales requeridas para la unión a sus ligandos y la activación del receptor son las que definen a varias quimiocinas. Por ejemplo, en el receptor CCR5 una región adicional llamada segundo lazo extracelular es crucial para la unión a sus ligandos y a la señalización intracelular. En el caso del receptor de quimiocinas CX3C tipo 1 (CX3CR1), los residuos N terminales y el tercer lazo extracelular son necesarios para la unión a sus ligandos y a la señalización intracelular (93).

Las citocinas son moléculas pequeñas de 30 kDa proteicas o glucoproteicas solubles, producidas en forma transitoria por efecto de un estímulo. Los linfocitos T y los macrófagos son las células que producen la mayor diversidad de citocinas. Son los mensajeros moleculares más importantes para regular las funciones biológicas de las células a través de mecanismos autocrinos o paracrinos. Existen aproximadamente 209 citocinas conocidas (94).

Participan, entre otros, en la proliferación y diferenciación celular, la hematopoyesis, la actividad microbicida, la reacción inflamatoria, la respuesta inmune específica y no específica. Regulan la respuesta inmune induciendo o inhibiendo la producción de otras citocinas y sus respectivos receptores, así como activando mecanismos de transducción de señales en células blanco o sobre ellas mismas. Las citocinas son pleiotrópicas y redundantes lo que quiere decir que una citocina puede ejercer una actividad funcional sobre varios tipos celulares y que una determinada función puede ser realizada por diferentes citocinas, respectivamente (90).

En el contexto de VIH-1, los estudios han mostrado asociaciones de varios SNPs con los diferentes niveles de progresión y la variación en la susceptibilidad a la infección que involucra genes que codifican moléculas que participan en el proceso de fusión y penetración viral en la célula del huésped (CCR5, CCR2, RANTES, y SDF-1) y en la regulación de la respuesta inmune (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ ) (8, 93).

### **1.10.1 Polimorfismo genético de quimiocinas, citocinas y VIH**

Es bien conocido el hecho que no todos los individuos infectados por VIH-1 progresan a sida en la misma medida. Aunque los correlatos de protección en estos individuos no se han identificado totalmente, se ha sugerido que factores

genéticos e inmunes del huésped están involucrados (3, 8, 56). En la misma línea, hay otros individuos que, a pesar de exponerse al virus por largos períodos de tiempo, son resistentes a la infección de VIH-1. Los mecanismos que les permiten a estos individuos estar protegidos del virus no están totalmente dilucidados (8).

Se plantea que los receptores de quimiocinas y sus ligandos pueden conferir resistencia a la infección por VIH-1 y/o a la progresión a sida (8), (56). La delección *ccr5*<sup>Δ32</sup> es uno de los polimorfismos del *ccr5* más estudiados. En el estado homocigótico, esta delección confiere una protección casi completa a la infección por VIH-1 y en el estado heterocigótico un retraso de la progresión de la enfermedad en 2 a 4 años (45).

El receptor CCR5 es una proteína con dominio siete hélices transmembrana acoplado a proteína G que se une a sus ligandos para guiar las células inmunes durante la respuesta inflamatoria. Es un receptor proinflamatorio que une a ligandos de quimiocinas motivos C-C tipo 3 (CCL3) como CCL4, CCL5 y CCL8. CCL4 es el ligando específico para CCR5 (90).

El gen *ccr5* está localizado en el cromosoma 3p21, descubierto en 1996 (89). Forma grupo con otro de los genes de receptores de quimiocinas como el *ccr2* con el que comparte alrededor de 71 % de homología de secuencia. Se expresa en linfocito T, monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras. Formado por 352 residuos aminoácidos con una masa molar de alrededor de 40,6 kDa. CCR5 es el correceptor para la entrada del VIH a las células. Los SNP de *ccr5* pueden alterar la susceptibilidad de las personas a la infección por VIH y a la progresión de la enfermedad (91).

Los SNP presentes en el promotor o en regiones codificantes de los genes de citocinas producen alteraciones en la función transcripcional y en la secreción de citocinas (84).

El gen que codifica la *IL-10* se localiza en el cromosoma 1q31-32 y comprende 5 exones. La región promotora contiene varios SNPs que influyen en la expresión y funcionalidad de la IL-10. Los más conocidos son: -1082 G/A (rs1800896), 819 C/T (rs1800871), -592 C/A (rs1800872). IL-10 es una citocina inmunosupresora que juega un papel importante en la desregulación inmune asociada al VIH. Algunos SNP de IL-10 se asocian con diferencias en la producción de IL-10 y aumento en la disfunción inmune en los pacientes VIH infectados (95).

El IFN- $\gamma$  es una citocina pleiotrópica producida por los linfocitos T CD4+ del tipo Th1, T CD8+ y células NK. La producción de IFN- $\gamma$  se produce como consecuencia inmediata de la activación de la respuesta inmune específica y se estimula por IL-2 e IL-12. IFN- $\gamma$  es el más potente activador de los macrófagos para eliminar microorganismos fagocitados y células tumorales (96). El gen de *INF- $\gamma$*  se localiza en el cromosoma 12 (12q14) y tiene cuatro exones que miden 6 kb. Las variaciones interindividuales en la producción de INF- $\gamma$  se deben a la contribución genética de los polimorfismos dentro del promotor o las regiones codificantes (84). Un SNP localizado en la posición +874 A>T (rs2430561) del primer intrón del gen de *INF- $\gamma$*  comprende el sitio obligatorio de unión para el factor de la transcripción NFkB que influye en la expresión del gen y la secreción de la citocina que tiene un impacto significativo en el resultado de infección por VIH (97). Varios polimorfismos en la región del

promotor de *IFN-γ*, en la posición +874, influyen en la susceptibilidad y la severidad de la infección por VIH (97-99).

La IL-6 es una glicoproteína secretada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Localizada en el cromosoma 7. Participa en la regulación de la reacción de la fase aguda hepática, en la regulación del equilibrio entre células T efectora y reguladora y en la regulación metabólica. Estimula la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos y contribuye a los efectos sistémicos de la inflamación y la respuesta febril junto a IL-1 y TNF-α (99).

Se han descrito varios polimorfismos en el gen de *IL-6*, entre los cuales están los SNP -174G/C, +1753C/G, +2954 G/C. El SNP -174G/C, ubicado dentro de la región promotora, ha sido el más estudiado en pacientes VIH (21, 100).

No solo los factores del huésped, sino los factores virales influyen en la patogenia y por lo tanto en la progresión de la infección. El desarrollo de la enfermedad posiblemente se determina por el fino balance entre la habilidad del virus de replicar y la habilidad del huésped de generar una respuesta inmune adecuada (100).

El efecto del fondo genético del huésped puede ser exacerbado o disminuido dependiendo de las condiciones medioambientales a que el individuo está expuesto (21). Todos estos factores ayudan a explicar por qué muchos de los efectos ejercidos por los SNP en una enfermedad dada son específicos a una cierta población, un grupo étnico, o el individuo (100).

Los factores genéticos que contribuyen a la predisposición o a la progresión del VIH/sida probablemente implican una interacción entre múltiples alelos de genes localizados en diferentes cromosomas (69, 101). En consecuencia, en

lugar de limitarnos a realizar un estudio de asociación de polimorfismos para un solo gen, optamos por investigar la importancia funcional de la relación entre cuatro polimorfismos de un solo nucleótido localizados en los genes *ccr5*, *IL-6*, *IFN-γ* e *IL-10* y la progresión o la predisposición de la enfermedad en una cohorte de pacientes cubanos con VIH/sida y sujetos expuestos no infectados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Diseño de la investigación**

Se realizó un estudio observacional prospectivo de corte transversal en el periodo de junio de 2018 a diciembre de 2019. En el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” y el Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Amejeiras.

### **2.2 Definición del universo de estudio**

Se tomó como universo todos los pacientes diagnosticados con VIH/sida que fueron atendidos en las consultas de Infectología del IPK y el Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Amejeiras, en el periodo comprendido entre junio de 2018 a diciembre de 2019.

La muestra estuvo constituida por de 120 pacientes distribuidos en dos grupos. Un grupo de 61 pacientes seropositivos a VIH-1 con tratamiento antirretroviral. El otro grupo conformado por 59 sujetos expuestos no infectados, parejas de pacientes VIH-1 positivos, seronegativos a VIH-1. En su mayoría gestantes, atendidas en la consulta de Infectología del Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Amejeiras, que da seguimiento provincial durante la gestación a parejas serodiscordantes.

En el momento de inclusión en el estudio se les realizó prueba rápida de VIH, según recomendaciones del fabricante (estuche SD BIOLINE HIV-1/2 3.0, SD Standard Diagnosis, INC, República de Corea). Estuvieron expuestas al VIH-1 por más de 2 años.

Por definición, una pareja VIH serodiscordante (“SDC” por sus siglas en inglés) es una pareja donde un compañero es VIH-positivo y el otro es VIH-negativo (8).

## **2.3 Criterios de inclusión y exclusión**

### **2.3.1 Criterios de inclusión para el grupo de pacientes seropositivos a VIH-1**

- Diagnóstico de VIH/sida, confirmado con caso índice asignado.
- Con actitud psíquica e intelectual adecuada.
- Pacientes con tratamiento antirretroviral.
- Pacientes de más de 19 años de edad.

### **2.3.2 Criterios de inclusión para el grupo de sujetos seronegativos a VIH-1**

- Pacientes no infectados expuestos más de un año, parejas de pacientes seropositivos a VIH-1, que fueron seronegativos a VIH-1.
- Pacientes de más de 19 años de edad.
- Con actitud psíquica e intelectual adecuada.

### **2.3.3 Criterios de exclusión para ambos grupos**

- Pacientes en aislamiento.
- Pacientes con enfermedades infecciosas agudas activas en el periodo de estudio.

### **2.3.4 Criterios de salida para ambos grupos**

- Fallecidos antes de la toma de la muestra.
- Solicitud o abandono voluntario del paciente.

## **2.4 Instrumentos de recolección de datos**

El único instrumento a utilizar para la recolección de los datos será el Anexo 1, que contiene los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio necesarios para realizar el análisis propuesto en los objetivos del presente estudio, realizado en el momento de la consulta.

## **2.5 Consideraciones éticas**

El estudio fue llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por los comités de ética de la investigación del IPK (CEI-IPK 63-18) y el HHA (CEI-HHA 27-18), respectivamente. La misma se realizó en base al estudio minucioso de los cuestionarios de los médicos, teniendo como premisa el respeto a la no violación de los postulados o principios bioéticos, medida tomada para asegurar confidencialidad y seguridad de la información. Consideramos de relevancia la investigación, así como la relación riesgos/beneficios de este estudio para la comunidad involucrada.

La investigación se realizó de acuerdo a cuatro principios básicos: la beneficencia, la no maleficencia, el respeto a la persona y la justicia. Considerando las normas éticas institucionales y regionales de la medicina moderna.

Se detalló de forma clara y concisa los procedimientos que se practicaron, así como, el conjunto de ventajas que proporciona la aplicación de este estudio. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes en la investigación. (Anexo 2)

## **2.6 Diagnóstico de VIH**

Los pacientes fueron diagnosticados y confirmados previamente como sujetos VIH positivos con caso índice asignado. Las parejas de pacientes VIH-1, expuestos no infectados, en el momento de inclusión en el estudio se les realizó Prueba rápida de VIH para confirmar su condición serológica, de la firma SD BIOLINE HIV-1/2 3.0 fabricado en la República de Corea por SD Standard Diagnosis, INC.

## **2.7 Toma y preparación de muestra**

Se realizaron extracciones de sangre mediante punción venosa del antebrazo, previa desinfección local del área, se colectaron 20 mL de sangre total con anticoagulante EDTA, se utilizaron 10 mL para el aislamiento de células mononucleares periféricas para posterior extracción del ADN, se utilizaron 100  $\mu$ L para la detección de células CD4+ por Citometría de flujo, el resto del plasma obtenido por centrifugación a 252 g, por 10 minutos, a temperatura de 20<sup>0</sup>C, se guardó a 4<sup>0</sup>C para la detección de la carga viral y marcadores inmunológicos.

## **2.8 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

Este procedimiento se realizó según Procesos Normalizado de Operación (PNO) de la sección de Inmunología del Laboratorio diagnóstico clínico del IPK. (28). Para la obtención del anillo leucocitario se centrifugó la sangre tratada con anticoagulante EDTA en Ficoll-paque Plus (Sigma-Aldrich, EUA). Este gradiente de densidad con Ficoll produjo la formación de capas celulares. Los linfocitos se localizaron en la interface entre el plasma y el Ficoll. Los linfocitos fueron recogidos y lavados para eliminar las plaquetas y el Ficoll.

## **2.9 Procedimientos moleculares**

Todo el procedimiento molecular se describe a continuación para cada gen analizado.

### **2.9.1 Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN de los linfocitos mediante el estuche comercial de Qiagen DNeasy ® Blood & Tissue (Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. A 200  $\mu$ L de la muestra se le añadió 200  $\mu$ L de solución amortiguadora de lisis (ATL) y 20  $\mu$ L de proteinasa K, posteriormente

se homogenizó la muestra. Seguidamente, el homogenizado se incubó por una hora y media a 56°C de temperatura, realizándose agitando fuertemente la muestra (vórtex) periódicos cada 20 minutos. A la muestra, se le añadió 200 µL de solución amortiguadora de lisis (AL) y se incubó a 70°C durante 10 minutos. Luego, se le añadieron 200 µL de etanol absoluto a la muestra, se homogenizó por un minuto el contenido, el cual se colocó en una columna de extracción (QIAGEN) con su correspondiente colector (tubo Eppendorf ® 2 mL). Se centrifugó la mezcla resultante a 7168 g por 1 minuto, a temperatura de 20° C. Se desechó el eluato obtenido en el colector. Posteriormente, se adicionó 500 µL de solución amortiguadora de lavado 1 (AW 1). Se centrifugó la mezcla resultante a 7168 g por 1 minuto, a temperatura de 20° C. Se desechó el eluato obtenido en el colector. La columna se colocó en un colector nuevo, se le añadió 500 µL de solución amortiguadora de lavado tipo 2 (AW2). El contenido se centrifugó a 21952 g por 3 minutos a temperatura de 20° C. Se adicionó 120 µL de tampón de elución (AE). Se incubó por 1 min. Finalmente, se obtuvo el ADN por centrifugación de la columna a 7168 g por 1 minuto, a temperatura de 20° C. El ADN se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa**

Al ADN obtenido se le realizó la PCR para amplificar los genes *ccr5*, *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ*.

### **2.9.3 Iniciadores**

Los iniciadores que se emplearon en la PCR de los genes utilizados en este estudio se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Habana, Cuba) y sus respectivas secuencias se muestran a continuación.

(Tabla 1)

**Tabla 1.** Secuencia de los iniciadores que se utilizaron en la detección del polimorfismo genético del coreceptor *CCR5* y de las citocinas *IL-6*, *IL-10* y *INF-γ* analizado en este estudio.

Para el caso particular de *IL-6* se utilizó la enzima Nla III para la identificación de los fragmentos.

Variantes	Secuencias base	Localización en el genoma
CCR5	5'-GCTCTCTCCCAGGAATCATC-3' 5'-CGAGAGAGGGTCCTAGTAG-3'	-174 (promotor)
IL-6	IL-6F: 5'-AAGGAAGAGTGGTCTGCTTCT-3' IL-6R: 5'-ATCTTGTTGGAGGGTGAGG-3'	-174 G/C (promotor)
IL-10	5'-CAGCCCTTCCATTACTTTC-3' IL-10 G: 5'-TACTAAGGCTTCTTGGGAG-3' IL-10 A: 5'-CTACTAAGGCTTCTTGGGAA-3'	-1082 G promotor -1082 A promotor
INF-γ	5'- TCAACAAAGCTGATACTCCA-3' INF-γ A: 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3 INF-γ T: 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3'	+874 A promotor +874 T promotor

Se utilizó como secuencia diana fragmentos de los genes *CCR5* según lo descrito por Veloso y colaboradores y An P y colaboradores (25, 102). Fragmentos de los genes *IL-6* según lo descrito por Felipe Bonfim y colaboradores (26,103). Fragmentos de los genes *IL-10* e *INF-γ* según lo descrito por Dolores López-Maderuelo y colaboradores (104). (Tablas 1 y 2)

Para todas las reacciones, la mezcla (50 µL) contuvo Tris/HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L, desoxirribonucleótidos (dNTP) 200 mmol/L, iniciadores (tabla 2) 0,5 µmol/L, Taq ADN polimerasa 2 unidades pH 8,3. (Bioline, Londres, Reino Unido) y 5 µL de ADN molde.

**Tabla 2.** Ciclos de amplificación y talla de los fragmentos para cada alelo que se utilizaron en la detección del polimorfismo genético del correceptor *CCR5* y de las citocinas *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ* analizados en este estudio.

Variantes	Ciclos de amplificación	Temperatura de Hibridación	Alelos y fragmentos (pb)
CCR5	94°C por 4 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1,5 min a 72°C, con una extensión final de 7 min a 72 °C	60°C	Deleción Δ32pb 174/142pb
IL-6	95 °C por 5 min, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 59 °C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72 °C	59°C	C:85,84 G:169
IL-10	10 ciclos (95°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos, 62°C por 50 segundos y 72°C por 40 segundos), seguidos de 20 ciclos (95°C por 20 segundos, 62°C por 50 segundos y 72°C por 50 segundos	62°C	G: 550 A: 550
INF-γ	10 ciclos (95°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos, 56°C por 50 segundos y 72°C por 40 segundos), seguidos de 20 ciclos (95°C por 20 segundos, 56°C por 50 segundos y 72°C por 50 segundos	56°C	A: 261 T: 261

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador 3Primer Thermal Cycler (DOT Scientific Inc., EE.UU). Se utilizó un control negativo para cada ensayo en el cual la mezcla de reacción contuvo agua destilada estéril en lugar de ADN molde.

Una vez amplificadas las secuencias de ADN mediante los PCR. Se realizaron las corridas electroforéticas que posteriormente se describen, para comprobar los resultados.

## **2.10 Detección de los productos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa**

Se tomaron 8  $\mu$ L de cada uno de los productos de la reacción de amplificación y se mezclaron con 2  $\mu$ L de tampón estabilizador de muestra 6X (EDTA 500 mM, Glicerol 10 %, azul de bromofenol (0,01 %). Estos productos se detectaron en geles de agarosa al 4 % para el gen *ccr5* y para los genes de *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ* geles de agarosa al 2 % respectivamente, en TBE 0.5 X (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 0,002 M) mediante tinción con bromuro de etidio (10 mg/mL). La corrida se realizó a 100 V durante 30 minutos en cámara electroforética (Mupid® One, BDC, Bélgica), con el empleo del marcador de masa molar PCR 100 bp (Low Ladder, Sigma, EE.UU.), cuyas bandas se encuentra entre 100 y 1000 pares de bases (pb). La visualización de las bandas se realizó por exposición del gel a la luz ultravioleta en un equipo transiluminador (Macrovue 2011, LKB, Suecia).

### **2.10.1 Polimorfismo del gen *ccr5* (rs333)**

El polimorfismo en el gen *ccr5*, conocido como *ccr5* $^{\Delta 32}$ , es debido a una delección de 32 pb por lo que el fragmento del gen resultante amplificado presenta una longitud de 142 pb.

Se consideró genotipo salvaje y se interpretó como un paciente sin presencia de mutación, el PCR que amplificó un fragmento de 174 pb. Se consideró genotipo mutado el PCR que amplificó un fragmento de 142 pb. Según los resultados obtenidos se visualizó homocigótico salvaje (una banda de 174pb)

heterocigóticos (dos bandas presentes 174 pb y 142 pb) y homocigóticos mutados (solo una banda de 142 pb) (25, 102).

#### **2.10.2 Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del gen-174 G/C de *IL-6* (rs1800795)**

El polimorfismo de longitud en el gen *IL-6* se detecta en la posición nucleotídica -174G/C del promotor y los fragmentos generados son C: 85,84 pb, G: 169 pb. Según los resultados se obtuvieron genotipos homocigóticos *IL-6 -174 GG* y CC y genotipo heterocigótico *IL-6 -174 GC*.

#### **2.10.3 Polimorfismos del gen -1082 A/G de la citocina *IL-10* (rs1800896)**

El polimorfismo de longitud en el gen *IL-10* se detecta en la posición nucleotídica -1082A/G del promotor utilizando ARMS-PCR y los fragmentos generados son A y G de 550 pb. Según los resultados se obtuvieron genotipos homocigóticos *IL-10-1082 GG* y *AA* y genotipo heterocigótico *IL-10 -1082 A/G*.

#### **2.10.4 Polimorfismos del gen +874 T/A de la citocina *INF-γ* (rs2430561)**

El polimorfismo de longitud en el gen *INF-γ* se detecta en la posición nucleotídica +874 T/A del primer intrón utilizando ARMS-PCR y los fragmentos generados son T y A de 261 pb. Según los resultados se obtuvieron genotipos homocigóticos *INF-γ +874 AA* y *TT* y genotipo heterocigótico *INF-γ +874 T/A*.

### **2.11 Procedimientos inmunológicos y virológicos**

#### **2.11.1 Estudios Inmunológicos: Determinación de células CD3+, CD4+, CD8+, NK y marcadores de activación inmune crónica**

Se realizó Citometría de flujo para detectar los niveles de células CD3+, CD4+, CD8+, NK, utilizando el Citómetro Cyflow Space (de la firma Partec, Alemania), utilizando los reactivos CD4 easy kit de Partec (Partec, Alemania) CD3FITC,

CD4FITC y CD8FITC (de LABEX, Cuba) CD38PE, CD16FITC, CD56PE, CD3PE y CD8PE de (eBioscience, Alemania) respectivamente (105). Esta técnica se realizó utilizando el procedimiento descrito por Partec (103). El análisis de datos se hizo utilizando el software Flow Max.

Para la determinación de los marcadores solubles de activación inmune crónica Proteína C Reactiva y  $\beta$  2 Microglobulina se realizó por turbidimetría según los procedimientos estándares del equipo del laboratorio Cobas c 311 (de Roche, Alemania).

### **2.11.2 Estudios virológicos: Determinación de la Carga viral plasmática de VIH-1**

Para la determinación de la carga viral se empleó el método NucliSens HIV-1 QT (de la firma Biomérieux, Francia) que es un ensayo de amplificación de ácido nucleico para la determinación cuantitativa del ARN del VIH-1 en plasma humano, que detecta hasta 10 copias de virus. Los reactivos de detección NucliSens HIV-1 QT que se utilizaron en la detección basada en el principio de electro quimioluminiscencia de *amplicones* derivados del ARN del VIH-1 generados por procedimientos de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA). Se añaden unas sondas específicas denominadas balizas moleculares u oligobalizas ( "Molecular beacon" en inglés) que funcionan como oligos para la amplificación y el método permite cuantificar en tiempo real la carga de virus presente en la muestra (106). Esta técnica se realizó mediante el procedimiento descrito por la firma BioMérieux (106).

Para la recolección de las enfermedades oportunistas se revisaron las historias clínicas de los pacientes VIH-1.

## 2.12 Análisis estadístico

Para el almacenamiento de la información se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel. Para el análisis de la misma se utilizó el sistema SPSS para Windows (versión 22.0, Chicago, IL, EE.UU.) y Epidat (versión 9.1). Se calcularon las frecuencias absolutas y relativas como medida de resumen para variables cualitativas y se usaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y D'Agostino-Pearson para evaluar si los datos cumplían la distribución normal.

En el caso de variables cualitativas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para investigar la asociación entre las mismas y la prueba de Fisher si el número de casos era escaso (<5). Mientras que para comparar las variables cuantitativas (edad y número de células CD3+, CD4+ CD8+, NK y CV) se calcularon medias y desviaciones estándar y se utilizaron pruebas paramétricas.

En la investigación se calculó el OR o razón de disparidad "*Odds Ratio*", por las siglas en inglés) como medida de asociación entre las variables analizadas y se estimaron los intervalos de confianza al 95 %.

Se determinó la asociación de los genotipos obtenidos para los genes *ccr5*, *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ* entre los grupos y su combinación con las variables células CD4, CV, tiempo de exposición y enfermedades oportunistas.

Las distribuciones de las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo en los grupos se estimaron por recuento directo y se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher en los casos en que se compararon dos o más características de dos polimorfismos.

El análisis de las proporciones esperadas y observadas para los genotipos y los alelos de todos los polimorfismos estudiados fue realizado a través del

Equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p>0.05$ ), se evaluó mediante la prueba de chi-cuadrado.

La comparación entre genotipos frente al alelo silvestre (wt) teniendo en cuenta los marcadores de progresión del VIH (linfocitos T CD4+ y carga viral) se llevó a cabo mediante la prueba de Mann-Whitney.

En todos los análisis estadísticos se consideró un nivel de significación del 5 % ( $p < 0,05$ ) utilizando el software Epidat versión 9.1 y SPSS 22.0.

# **RESULTADOS**

### **III. RESULTADOS**

#### **3.1 Caracterización clínica y socio demográfico de los pacientes estudiados.**

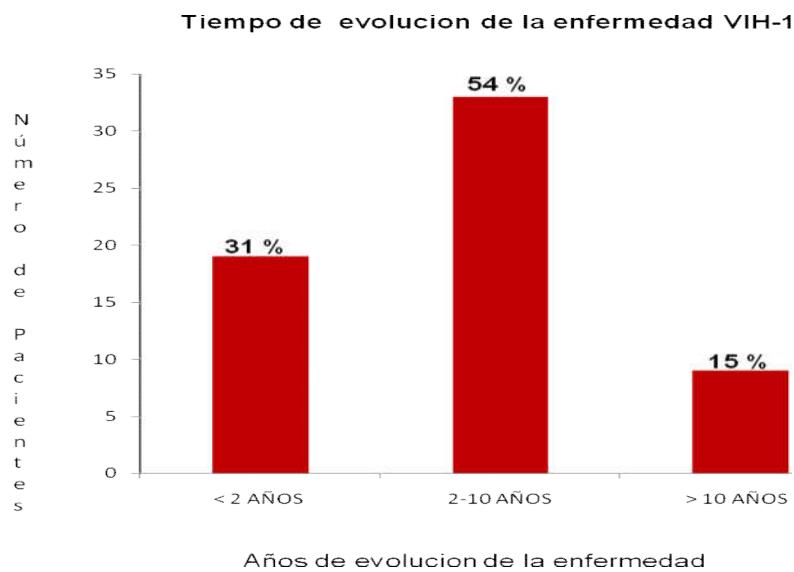
El estudio se conformó con 120 pacientes distribuidos en 2 grupos. Un grupo de 61 pacientes seropositivos a VIH-1 con tratamiento antirretroviral. El otro grupo de 59 sujetos expuestos al VIH-1 no infectados. Las características sociodemográficas de los pacientes estudiados se muestran en la tabla 3, donde se observa que en ambos grupos la edad que predominó fue de 20 a 29 años, con 28 % y 54 % respectivamente. Predominó el color de la piel blanco en ambos grupos con 59 %. En cuanto al género en el grupo de pacientes seropositivos a VIH-1 predominó el sexo masculino con 77 % y en el grupo de sujetos expuestos al VIH-1 no infectados, el sexo femenino con 80 %, con resultados estadísticamente significativos ( $p<0.05$ ).

**Tabla 3.** Características sociodemográficas de ambos grupos de pacientes estudiados en el periodo junio de 2018 a diciembre de 2019.

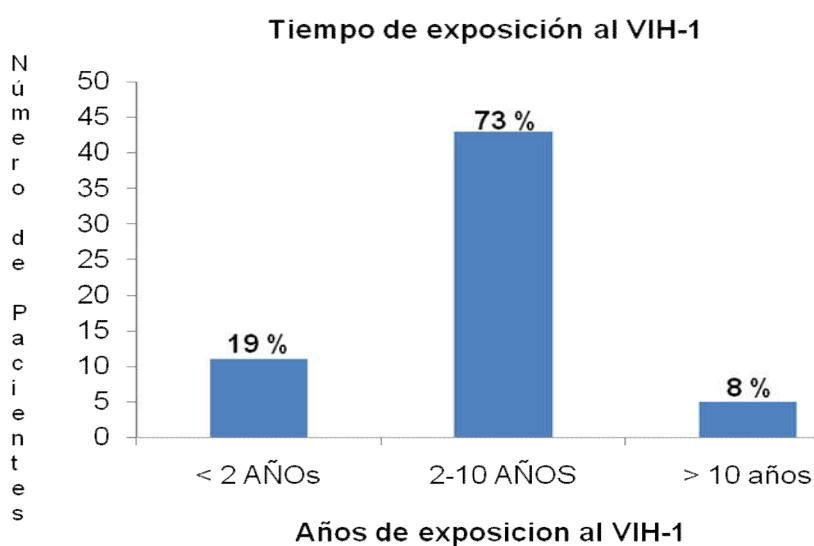
Variables	Pacientes seropositivos VIH-1 n=61		Sujetos Expuestos no infectados n=59		Valor de p
	Número	%	Número	%	
<b>EDAD</b>					
20-29 años	<b>17</b>	<b>28</b>	<b>32</b>	<b>54</b>	<b>0,9999</b>
30-39 años	15	25	15	25	
40-49 años	13	21	7	12	
50-59 años	12	20	4	7	
60 años y mas	4	6	1	2	
<b>GÉNERO</b>					
Femenino	14	23	<b>47</b>	<b>80</b>	<b>0,0001</b>
Masculino	<b>47</b>	<b>77</b>	12	20	
<b>COLOR DE LA PIEL</b>					
Blanca	<b>36</b>	<b>59</b>	<b>35</b>	<b>59</b>	<b>0,1399</b>
Negra	19	31	23	39	
Mestiza	6	10	1	2	

**Fuente:** Encuesta. Historias clínicas

Las figuras 3 y 4 muestran el tiempo de evolución de la enfermedad en pacientes VIH+ y el tiempo de exposición al VIH-1 en los sujetos expuestos no infectados, observándose que 69 % de los pacientes seropositivos a VIH-1 tenían una evolución de la enfermedad de más de dos años. Por otra parte, más de la mitad (73 %) de las personas del estudio que pertenecen al grupo de sujetos expuestos no infectados, se han expuesto al VIH-1 entre 2 y 10 años. Es válido señalar que un 8 % de los sujetos se han expuesto al VIH-1 por más de 10 años sin contagiarse.



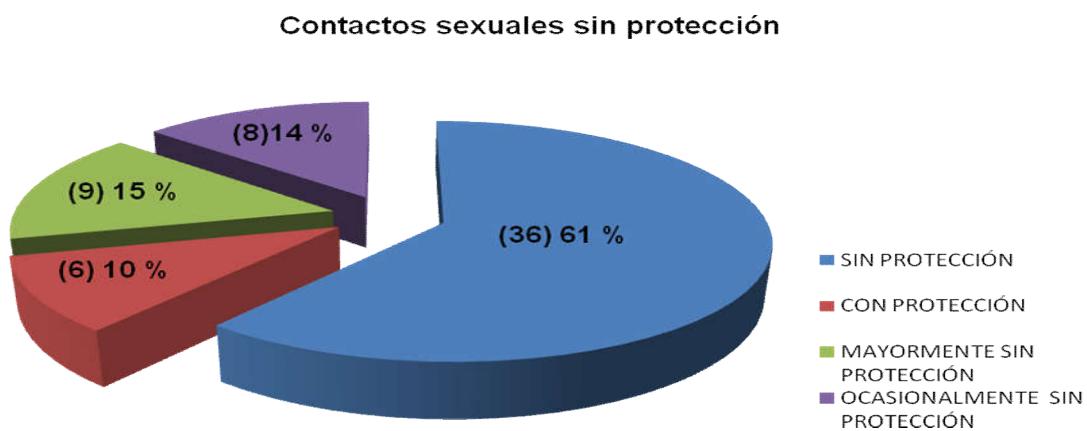
**Figura 3.** Tiempo de evolución de la enfermedad VIH-1 en el grupo de pacientes VIH+. junio 2018-diciembre 2019



**Figura 4.** Tiempo de exposición al VIH-1 en el grupo de sujetos expuestos no infectados. junio 2018-diciembre 2019

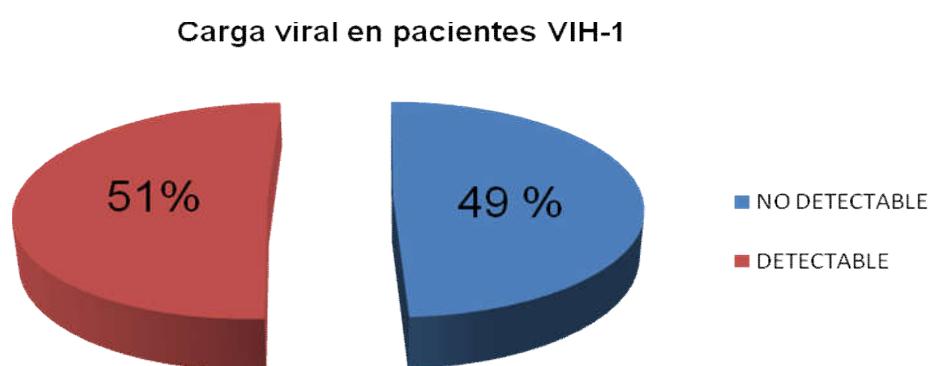
El 61 % de las personas expuestas al VIH-1 no infectadas estudiadas, refieren tener relaciones sexuales sin protección en todas sus relaciones sexuales y

solo el 10 % de las personas estudiadas refiere protegerse en todas sus relaciones sexuales, como se puede observar en la figura 5.



**Figura 5.** Distribución de la frecuencia de contactos según niveles de riesgo a la infección por el VIH-1 en el grupo de sujetos expuestos no infectados junio 2018-diciembre 2019.

En la Figura 6 se observa que del total de pacientes con infección por VIH-1 estudiados, el 51 % poseían una carga viral detectable. De ellos, un 74 % con valores de carga viral por encima de 1000 cp/ $\mu$ L.



**Figura 6.** Resultados de la carga viral determinada en los pacientes seropositivos al VIH-1. junio 2018-diciembre 2019

El análisis de las diferentes variables inmunológicas solo se pudo realizar en 55 pacientes del grupo de pacientes seropositivos al VIH-1 y en 50 pacientes del

grupo de sujetos expuestos no infectados. A continuación, se muestra en la tabla 4 la comparación de medias de células CD3, CD4, CD8 y NK. En el grupo de pacientes seropositivos al VIH-1 la media de células CD4+ estuvo por encima de 300 cél/ $\mu$ L, con 312 cél/ $\mu$ L. Se observó una marcada disminución de células NK 8 cél/ $\mu$ L y un aumento de células CD8+, con diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) con respecto al grupo de sujetos expuestos no infectados que estuvo dentro de valores normales.

El índice CD4/CD8 fue de 0.69 en los pacientes VIH y de 1.21 en los sujetos expuestos no infectados.

**Tabla 4.** Comparación de medias de linfocitos T y NK en ambos grupos de estudio en el periodo junio de 2018 a diciembre de 2019.

Variables	media		IC al 95 % para la diferencia de las medias	Valor de p
	Pacientes seropositivos al VIH-1 n= 55	Sujetos expuestos al VIH-1 no infectados n= 50		
<b>Células CD3+</b>	792	1214	9,65 – 84,96	<b>0,0027</b>
<b>Células CD4+</b>	<b>312</b>	<b>538</b>	11,90 – 17,08	<b>0,0001</b>
<b>Células CD8+</b>	455	446	9,71 – 18,98	<b>0,0025</b>
<b>Células NK</b>	<b>8</b>	<b>58</b>	1,17 – 6,85	<b>0,0001</b>

**Fuente:** Encuesta. Historias clínicas

Al analizar los marcadores de activación inmune crónica en ambos grupos de estudio se observó, en el grupo de pacientes seropositivos al VIH-1 una mayor activación de células CD4/CD38 y células CD8/CD38, así como de los factores

solubles de activación inmune crónica  $\beta 2$  Microglobulina y Proteína C Reactiva respectivamente, con diferencias significativas ( $p<0,05$ ) como se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Comparación de medias de marcadores de activación inmune crónica en ambos grupos de estudio en el periodo junio de 2018 a diciembre de 2019.

<b>Variables</b>	<b>media</b>		<b>IC al 95 % para la diferencia de las medias</b>	<b>p&lt;0.05</b>
	<b>Pacientes</b>	<b>Sujetos</b>		
<b>Seropositivos expuestos al VIH-1</b>				
	<b>n=55</b>	<b>n=50</b>		
<b>CD4/CD38</b>	33	28	1,33 – 4,27	<b>0,0001</b>
<b>CD8/CD38</b>	47	27	2,90 – 9,04	<b>0,0001</b>
<b><math>\beta 2</math> microglobulina</b>	1,92	0,67	0,05 – 0,24	<b>0,0001</b>
<b>Proteína C reactiva</b>	3,94	2,96	0,28 – 0,34	<b>0,0001</b>

**Fuente:** Encuesta. Historias clínicas

#### **4.2 Polimorfismos genéticos de los correceptores y los genes de citocinas en pacientes VIH/sida y en sujetos expuestos no infectados.**

El análisis de las proporciones esperadas y observadas para los genotipos y los alelos de todos los polimorfismos estudiados fue realizado a través del EHW ( $p>0,05$ ). El polimorfismo del correceptor *ccr5* y la citocina *IL-6* estaban en EHW para ambos grupos. El polimorfismo de *IL-10* no estaba en EHW para

los dos grupos. El polimorfismo de *INF-γ* no estaba en EHW en el grupo de pacientes seropositivos al VIH-1. ( Tabla 6)

**Tabla 6.** Análisis de las proporciones esperadas y observadas para los genotipos y los alelos de todos los polimorfismos estudiados.

*ccr5*<sup>A32</sup>. Equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos grupos (p>0.05)

Genotipos	Observados	Esperados
<b>Homocigótico de referencia</b>	55	55,1
<b>Heterocigótico</b>	6	5,7
<b>Variante Homocigótica</b>	0	0,1
<b>Var frecuencia alelo</b>	0,05	61

**Valor de p 0.6862**

Genotipos	Observados	Esperados
<b>Homocigótico de referencia</b>	55	55,1
<b>Heterocigótico</b>	4	3,9
<b>Variante Homocigótica</b>	0	0,1
<b>Var frecuencia alelo</b>	0,03	59

**Valor de p 0.7875**

*IL-6*. Equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos grupos (p>0.05)

Genotipos	Observados	Esperados
<b>Homocigótico de referencia</b>	40	41,8
<b>Heterocigótico</b>	21	17,4

<b>Variante Homocigótica</b>	0	1,8
<b>Var frecuencia alelo</b>	0,17	61

**Valor de p 0.1043**

<b>Genotipos</b>	<b>Observados</b>	<b>Esperados</b>
<b>Homocigótico de referencia</b>	42	41,5
<b>Heterocigótico</b>	15	15,9
<b>Variante Homocigótica</b>	2	1,5
<b>Var frecuencia alelo</b>	0,16	59

**Valor de p 0.6503**

*IL-10. No Equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos grupos (p<0.05)*

<b>Genotipos</b>	<b>Observados</b>	<b>Esperados</b>
<b>Homocigótico de referencia</b>	9	17,9
<b>Heterocigótico</b>	48	30,3
<b>Variante Homocigótica</b>	4	12,9
<b>Var frecuencia alelo</b>	0,46	61

**Valor de p 0.0000**

<b>Genotipos</b>	<b>Observados</b>	<b>Esperados</b>
<b>Homocigótico de referencia</b>	9	16,3
<b>Heterocigótico</b>	44	29,4
<b>Variante Homocigótica</b>	6	13,3

<b>Var frecuencia alelo</b>	0,47	59
-----------------------------	------	----

---

#### **Valor de p 0.0001**

*INF-γ*. No Equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p<0.05$ ) para el grupo VIH+

<b>Genotipos</b>	<b>Observados</b>	<b>Esperados</b>
<b>Homocigótico de referencia</b>	14	19,0
<b>Heterocigótico</b>	40	30,1
<b>Variante Homocigótico</b>	7	12,0
<b>Var frecuencia alelo</b>	0,44	61

---

#### Valor de p 0.0101

*INF-γ*. Equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p<0.05$ ) para el grupo expuestos no infectados

<b>Genotipos</b>	<b>Observados</b>	<b>Esperados</b>
<b>Homocigótico de referencia</b>	11	14,8
<b>Heterocigótico</b>	37	29,5
<b>Variante Homocigótico</b>	11	14,8
<b>Var frecuencia alelo</b>	0,50	59

---

#### **Valor de p 0.050**

En la tabla 7 se muestra la distribución de los polimorfismos genéticos analizados en ambos grupos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) de los diferentes polimorfismos estudiados entre los grupos. No obstante, debemos señalar que el polimorfismo genético del coreceptor *ccr5* que predominó en ambos grupos fue el homocigótico salvaje (wt/wt) con 90 % y 93 % respectivamente, seguido del heterocigótico (wt/Δ32) con 10 % y 7 % respectivamente. No se encontró polimorfismo homocigótico (Δ32/Δ32) en la muestra estudiada. En cuanto al polimorfismo genético de *IL-6*

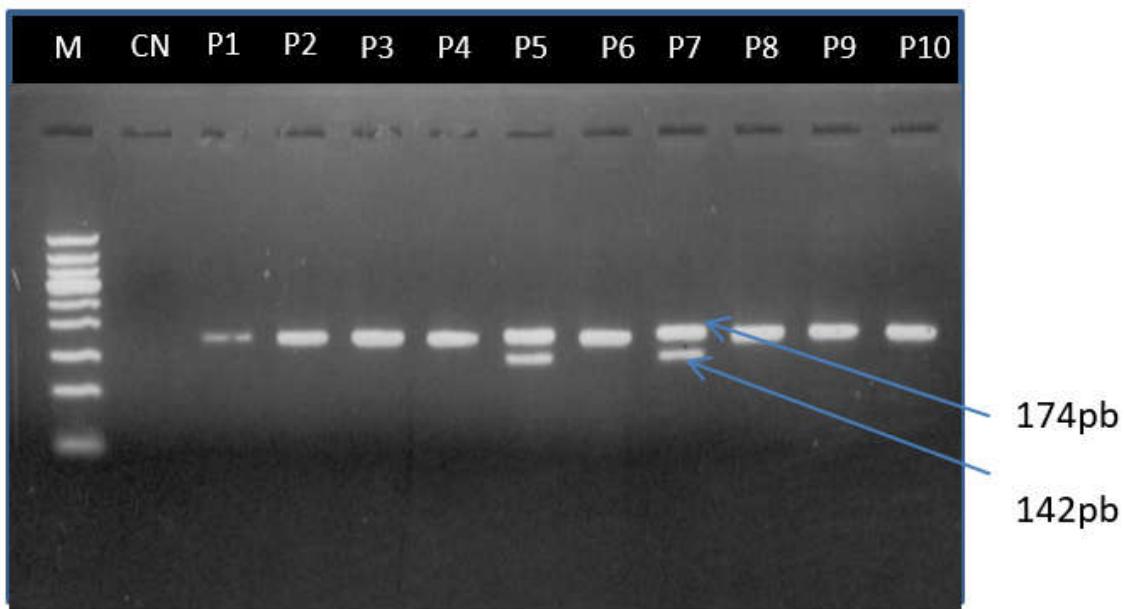
que predominó en ambos grupos fue el homocigótico G/G con 66 % y 71 % respectivamente. Solo se encontró polimorfismo homocigótico C/C en 2 pacientes del grupo de sujetos expuestos al VIH-1 no infectados (3 %). Por otra parte, el polimorfismo genético de *IL-10* que predominó en ambos grupos fue el heterocigótico G/A con 79 % y 75 % respectivamente, seguido del homocigótico A/A con 15 % en ambos grupos. En cuanto al polimorfismo genético de *INF-γ* que predominó en ambos grupos fue el heterocigótico T/A con 66 % y 62 % respectivamente, seguido del homocigótico A/A con 23 % y 19 % respectivamente como se describe en la tabla 7.

**Tabla 7.** Distribución de los polimorfismos genético del correceptor *ccr5* y de las citocinas *IL-6(-174) G/C*, *IL-10 (-1082 G/A)* e *INF-γ(+874) T/A* en los pacientes estudiados en el periodo junio de 2018 a diciembre de 2019.

Polimorfismos Genotipos	Pacientes seropositivos al VIH-1	Sujetos expuestos al VIH-1 no infectados	p	OR 95 % CI
	<b>n= 61</b>	<b>n=59</b>		
<i>ccr5</i> <sup>wt/wt</sup>	<b>55 (90 %)</b>	<b>55 (93 %)</b>	0,7434	0,6667 0,1782-2,494
<i>ccr5</i> <sup>wt/Δ 32</sup>	6 (10 %)	4 (7 %)		
wt	116	114	0,7490	0,6784 (0,1864-2,468)
Δ32	6	4		
<b>Genotipo <i>IL-6</i> G/G</b>	<b>40 (66 %)</b>	<b>42 (71 %)</b>	0,2213	1,4700 (0,6661- 3,2440)
<b>Genotipo G/C</b>	21 (34 %)	15 (26 %)		
<b>Genotipo C/C</b>	0 (0 %)	2 (3 %)		
<b>G</b>	101	99	0,6012	0,8259 (0,4113-1,658)
<b>C</b>	21	17		
<b>Genotipo <i>IL-10</i> A/A</b>	9 (6 %)	9 (10 %)	0,7631	1,5000 (0,3131- 7,1856)
<b>Genotipo G/A</b>	<b>48 (79 %)</b>	<b>44 (75 %)</b>		
<b>Genotipo G/G</b>	4 (15 %)	6 (15 %)		
<b>A</b>	66	62	0,8971	1,065 (0,6409-1,768)
<b>G</b>	56	56		
<b>Genotipo <i>INF-γ</i> A/A</b>	14 (11 %)	11 (19 %)	0,5136	2,0000 (0,5825- 6,8667)
<b>Genotipo T/A</b>	<b>40 (66 %)</b>	<b>37 (62 %)</b>		
<b>Genotipo T/T</b>	7 (23 %)	11 (19 %)		
<b>A</b>	68	59	0,4379	1,259 (0,75786-2,093)
<b>T</b>	54	59		

**Fuente:** Encuesta. Historias clínicas

Las figuras 7, 8, 9 y 10 muestran las electroforesis representativas de la amplificación de los genes *CCR5*, *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ*.



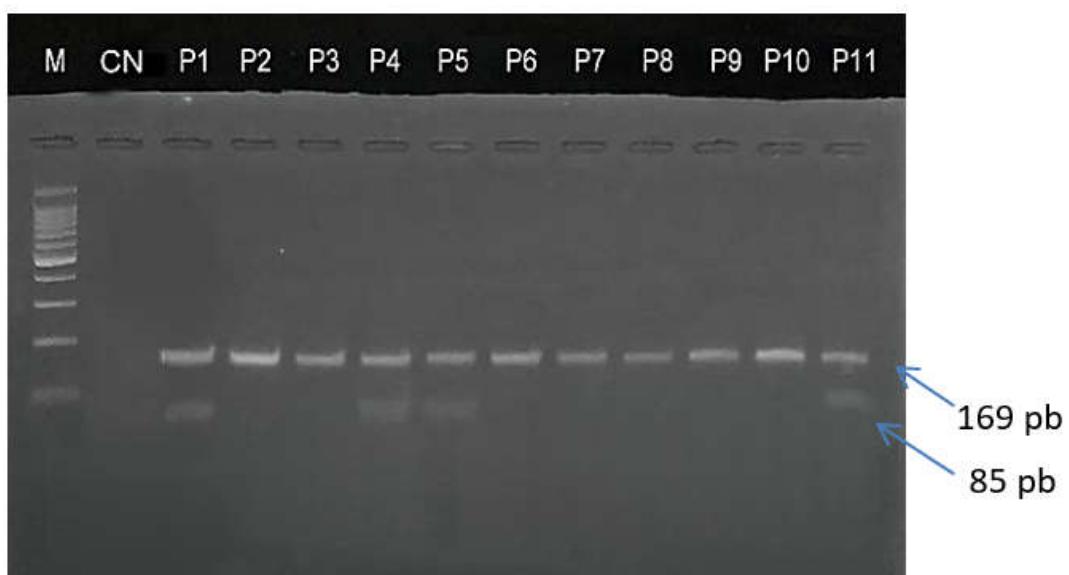
**Figura 7.** Electroforesis representativa de la amplificación del gen *CCR5*.

Gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de Etidio.

Carriles: PM, Marcador de masa molar 100 pb; CN, control negativo

P1-P4, P6, P8-P10 muestras de homocigóticos *wt/wt*;

P5 y P7 muestras de heterocigotos *wt/Δ32*.

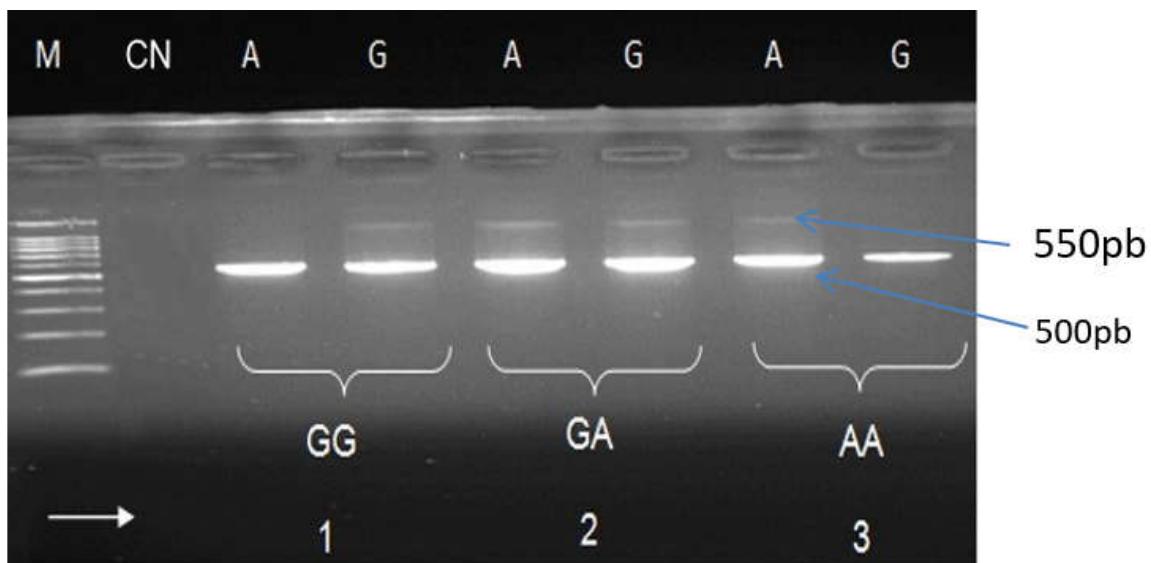


**Figura 8.** Electroforesis representativa de la amplificación del gen *IL-6*.

Gel de agarosa 4 % teñido con Bromuro de Etidio.

Carriles: M, Marcador de masa molar 100 pb;

P1, P4, P5 y 11 la presencia de 2 bandas esto indica variantes heterocigóticas G/C, en el resto se observa la presencia de 1 banda esto indica variantes homocigóticas GG.



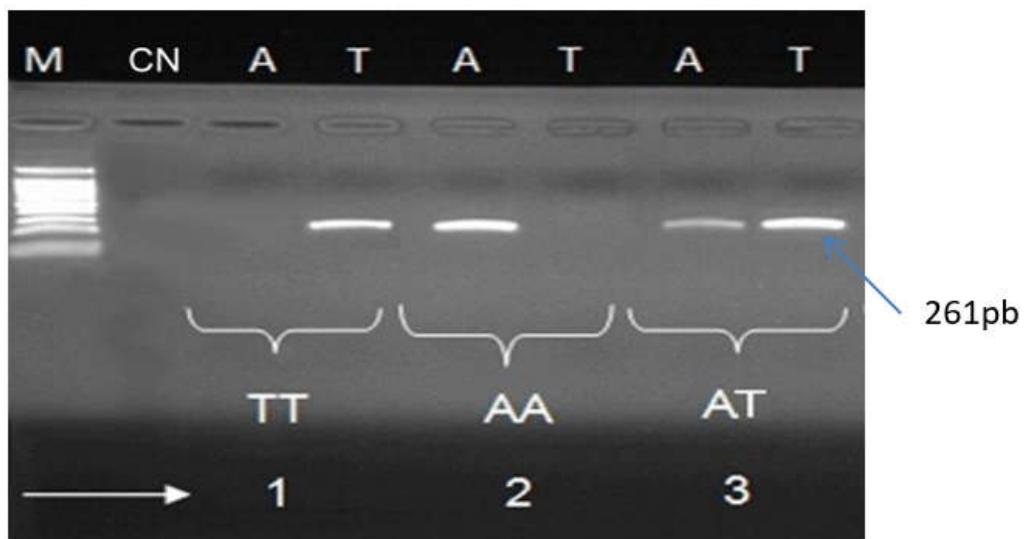
**Figura 9.** Electroforesis representativa de la amplificación del gen *IL-10*. Gel de

agarosa 2 % teñido con Bromuro de Etidio.

M, Marcador de masa molar 100 pb

El polimorfismo de los dos alelos se muestra para los diferentes pacientes

utilizando el Sistema de Mutación Refractario a la Amplificación por PCR



**Figura 10.** Electroforesis representativa de la amplificación del gen *INF-γ*.

Gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de Etilio.

M, Marcador de masa molar 100 pb

El polimorfismo de los dos alelos se muestra para los diferentes pacientes utilizando el Sistema de Mutación Refractario a la Amplificación por PCR.

#### 4.3 Relación de los polimorfismos genéticos con marcadores inmunológicos y virológicos de progresión en pacientes VIH/sida y tiempo de exposición al VIH en sujetos expuestos no infectados.

Se analizó la asociación de los polimorfismos genéticos estudiados con los biomarcadores de progresión de la enfermedad más frecuentes, esto es, los niveles de células CD4+ y carga viral. Se comprobó que los valores de células CD4+ no diferían significativamente ( $p<0,05$ ) entre los genotipos estudiados como se observa en la tabla 8.

**Tabla 8.** Distribución de los polimorfismos genéticos de *ccr5*, *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ* y los niveles de células CD4 en el grupo de pacientes seropositivos al VIH-1. IPK, junio 2018-diciembre 2019.

Genotipos	Niveles de células CD4			Valor de p	
	Pacientes seropositivos al VIH-1				
	< 200cel/µL	n= 55 201-350 cel/µL	>350 cel/µL		
<i>ccr5</i> <i>wt/wt</i>	7 (13 %)	23 (41 %)	19 (35 %)	0,9721	
<i>ccr5</i> <i>wt/Δ32</i>	1 (2 %)	1 (2 %)	4 (7 %)		
<b>Genotipo <i>IL-6</i></b>					
<i>GG</i>	7 (13 %)	15 (27 %)	12 (22 %)	0,2371	
<b>Genotipo <i>IL-6</i></b>					
<i>GC</i>	1 (2 %)	9 (16 %)	11 (20 %)		
<b>Genotipo <i>IL-10</i></b>					
<i>AA</i>	0 (0 %)	4 (7 %)	5 (9 %)		
<b>Genotipo <i>IL-10</i></b>					
<i>GA</i>	6 (11 %)	19 (35 %)	17 (31 %)	0,2147	
<b>Genotipo <i>IL-10</i></b>					
<i>GG</i>	2 (4 %)	1 (2 %)	1 (2 %)		
<b>Genotipo <i>INF-γ</i></b>					
<i>AA</i>	1 (2 %)	6 (11 %)	6 (11 %)		
<b>Genotipo <i>INF-γ</i></b>					
<i>AT</i>	7 (12 %)	13 (24 %)	15 (27 %)	0,8233	
<b>Genotipo <i>INF-γ</i></b>					
<i>TT</i>	0 (0 %)	5 (9 %)	2 (4 %)		

**Fuente:** Encuesta. Historias clínicas

En cuanto al análisis de los polimorfismos genéticos estudiados con los niveles de carga viral, se encontró cierta asociación entre el polimorfismo GG de *IL-6* con valores de carga viral elevados superiores a 5000 cp/µL como se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9.** Distribución de los polimorfismos genéticos de *ccr5*, *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ* y los niveles de carga viral en el grupo de pacientes seropositivos al VIH-1. IPK, junio 2018-diciembre 2019.

Genotipos	Carga Viral		Valor de p
	Pacientes seropositivos al VIH-1	n= 61	
	Detectable	No detectable	
<i>ccr5</i> <i>wt/wt</i>	27 (44 %)	28 (46 %)	<b>0,3516</b>
<i>ccr5</i> <i>wt/Δ32</i>	4 (7 %)	2 (3 %)	
<b>Genotipo <i>IL-6</i> GG</b>	<b>28 (46 %)</b>	12 (20 %)	<b>0,0001</b>
<b>Genotipo <i>IL-6</i> GC</b>	3 (5 %)	18 (29 %)	
<b>Genotipo <i>IL-6</i> CC</b>	0 (0 %)	0 (0 %)	
<b>Genotipo <i>IL-10</i> AA</b>	5 (8 %)	3 (5 %)	<b>0,9755</b>
<b>Genotipo <i>IL-10</i> GA</b>	27 (44 %)	22 (36 %)	
<b>Genotipo <i>IL-10</i> GG</b>	0 (0 %)	4 (7 %)	
<b>Genotipo <i>INF-γ</i> AA</b>	5 (8 %)	9 (14 %)	<b>0,9361</b>
<b>Genotipo <i>INF-γ</i> AT</b>	22 (36 %)	18 (30 %)	
<b>Genotipo <i>INF-γ</i> TT</b>	4 (7 %)	3 (5 %)	

**Fuente:** Encuesta. Historias clínicas

También se analizó la asociación de los polimorfismos genéticos estudiados con el tiempo de exposición al VIH en sujetos expuestos no infectados. Se encontró asociación del polimorfismo homocigótico GG de *IL-6* con el tiempo de exposición al VIH entre dos y diez años, como se observa en la tabla 10.

**Tabla 10.** Distribución de los polimorfismos genéticos de *ccr5*, *IL-6*, *IL-10* e *INF-γ* y el tiempo de exposición al VIH-1 en el grupo de sujetos expuestos, no infectados. IPK, junio 2018-diciembre 2019.

<b>Genotipos</b>	<b>Tiempo de exposición al VIH-1</b>			<b>Valor de p</b>
	<b>&lt; 2 años</b>	<b>2-10 años</b>	<b>&gt;10 años</b>	
<b><i>ccr5</i> <i>wt/wt</i></b>	13 (22 %)	38 (64 %)	4 (7 %)	0,3353
<b><i>ccr5</i> <i>wt/Δ32</i></b>	0 (0 %)	3 (5 %)	1 (2 %)	
<b>Genotipo <i>IL-6 GG</i></b>	10 (17 %)	<b>30 (51 %)</b>	1 (2 %)	<b>0,0001</b>
<b>Genotipo <i>IL-6 GC</i></b>	3 (5 %)	11 (19 %)	2 (3 %)	
<b>Genotipo <i>IL-6 CC</i></b>	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (3 %)	
<b>Genotipo <i>IL-10 AA</i></b>	2 (3 %)	9 (15 %)	2 (3 %)	0,8278
<b>Genotipo <i>IL-10 GA</i></b>	6 (11 %)	32 (54 %)	3 (5 %)	
<b>Genotipo <i>IL-10 GG</i></b>	1 (2 %)	3 (5 %)	1 (2 %)	
<b>Genotipo <i>INF-γ AA</i></b>	5 (8 %)	6 (10 %)	2 (3 %)	0,3388
<b>Genotipo <i>INF-γ AT</i></b>	5 (8 %)	28 (47 %)	8 (14 %)	
<b>Genotipo <i>INF-γ TT</i></b>	1 (2 %)	3 (6 %)	1 (2 %)	

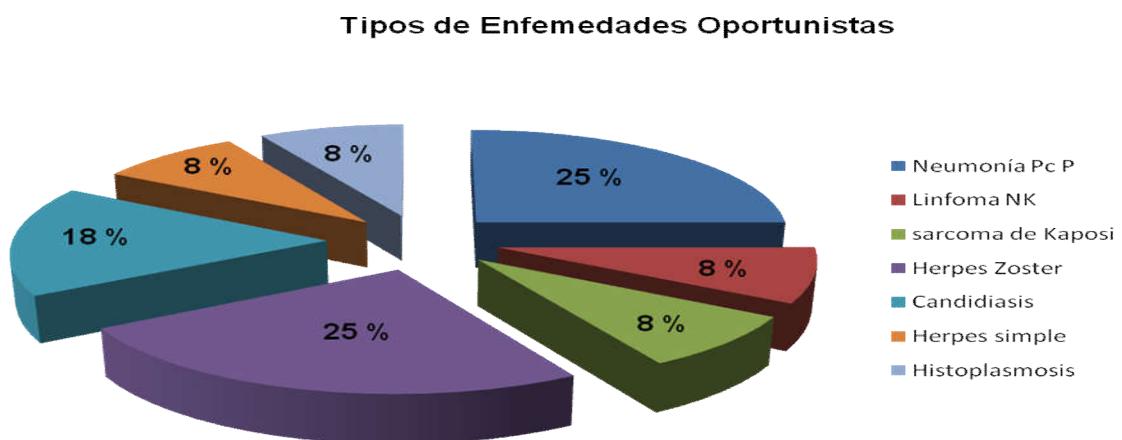
**Fuente:** Encuesta. Historias clínicas

#### **4.4 Relación de los polimorfismos genéticos con las enfermedades oportunistas en pacientes VIH/sida.**

De los pacientes VIH-1 estudiados solo presentaron enfermedades oportunistas 18 % y de ellas predominaron la neumonía PcP, Herpes zoster con 25 % cada una y la candidiasis 18 % como se observa en las figuras 11 y 12 respectivamente.



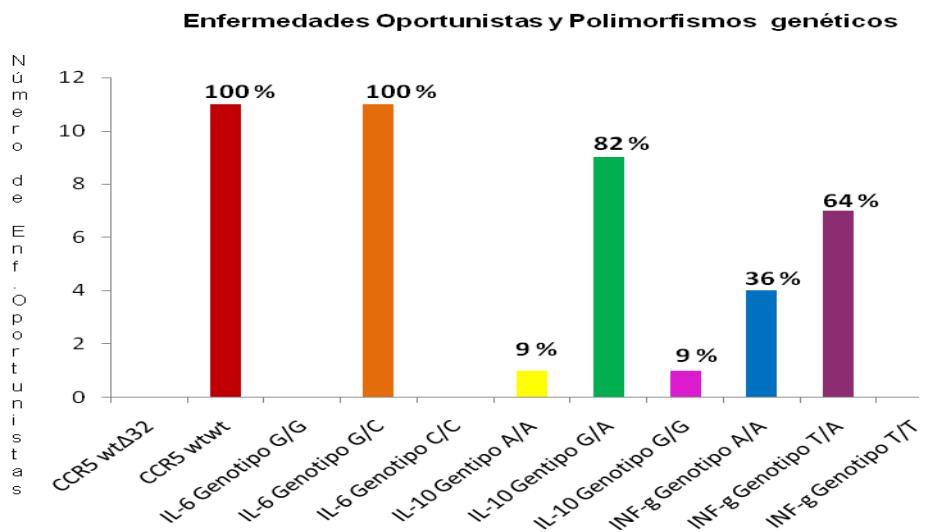
**Figura 11.** Enfermedades Oportunistas en pacientes VIH-1. IPK. junio 2018-diciembre 2019



**Figura 12.** Tipos de Enfermedades Oportunistas en pacientes VIH-1. IPK. Junio 2018-diciembre 2019

El 100 % de los pacientes con genotipo *ccr5* <sup>wt/wt</sup> y genotipo heterocigótico *GC* de *IL-6* presentaron enfermedades oportunistas. El 82 % de los pacientes con genotipo heterocigótico *GA* de *IL-10* presentaron enfermedades oportunistas. El 64 % de los pacientes con genotipo heterocigótico *AT* de *INF-γ*, seguido del 36 % con genotipo *AA* presentaron enfermedades oportunistas, como se aprecia en la figura 13.

La combinación de SNP *ccr5* *wt/wt*, *IL-6* *GC*, *IL-10* *GA* e *INF-γ* *AT* fue la que se asoció con la presencia de más enfermedades oportunistas. El 66 % de los pacientes con ese genotipo presentaron enfermedades oportunistas. (figura 13).



**Figura 13.** Enfermedades oportunistas y polimorfismos genéticos en pacientes VIH-1+. IPK.junio2018-diciembre 2019

# **DISCUSIÓN**

## IV. DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización clínica y demográfica de los pacientes estudiados.

La pandemia de sida ha cobrado más de 30 millones de vidas durante las últimas cuatro décadas. La infección por VIH continúa siendo un problema de salud global, con alrededor de 40 millones de personas seropositivas al virus.

La terapia antirretroviral ha transformado la enfermedad en una condición crónica que permite vivir mucho tiempo con calidad de vida, pero todavía hoy no hay ninguna vacuna eficaz ni cura para la enfermedad (8).

Se estudiaron un total de 120 personas distribuidas en dos grupos, un grupo conformado por pacientes VIH-1 positivo con tratamiento antirretroviral y el otro grupo conformado por sujetos expuestos al VIH-1 no infectados, analizaremos las características demográficas de ambos grupos.

En esta investigación, para ambos grupos, la edad de la mayoría de los sujetos oscilaba entre 20 y 29 años, al igual que los datos publicados por Cobas y colaboradores en 2022 para pacientes con VIH en la ciudad de La Habana (107). Montana en Colombia en 2021 y la investigación realizada en el Caribe en poblaciones claves (hombres que tienen sexo con hombres, mujeres trabajadoras del sexo y personas trans géneros) (108, 109). En cambio, no coincide con los estudios de Hernández y colaboradores realizado en 2015 y Gil en 2019 donde predominaron las edades entre 35 y 49 años, con una media de 49 años en los pacientes cubanos VIH (110, 111). Esto es un reflejo de los diferentes diseños que se utilizan para estudiar la enfermedad, en cuanto a la selección de la población que se analiza.

Con respecto al color de la piel, predominaron los pacientes de piel blanca en ambos grupos. Este es el comportamiento de la epidemia en Cuba como

reflejan varias investigaciones. Hernández y colaboradores en 2015 reportan un 78 % de los pacientes con piel blanca (110). Oropesa plantea que desde el comienzo de la epidemia en el país ha existido un predominio de la enfermedad en los pacientes de color de la piel blanca (112). Los resultados de la presente investigación difieren de lo reportado en un investigación a nivel mundial que plantea que el 50 % de los pacientes diagnosticados con VIH fueron afroamericanos y 30 % eran caucásicos (4).

En el grupo de pacientes con VIH predominaba el sexo masculino, como se ha notificado en Cuba desde el inicio de la pandemia (76). El 80 % de los seropositivos detectados desde el inicio de la epidemia hasta el 2023 han sido hombres, de un total de 41 180 seropositivos (76). En el grupo de sujetos expuestos al VIH-1 no infectados la mayoría de los pacientes eran mujeres. Por definición, una pareja VIH serodiscordante es cuando un miembro es una persona VIH-positivo y la otra es VIH-negativo (8). Las cohortes de parejas serodiscordantes pueden ser los grupos más pertinentes para identificar los correlatos de protección que afectan la transmisión sexual teniendo en cuenta que más del 90 % de todas las nuevas infecciones de VIH a nivel mundial se transmiten sexualmente y pocos estudios han evaluado si la concentración genital de VIH-1 se correlaciona con el riesgo de transmisión (113).

En esta investigación el tiempo de Evolución y Exposición de los pacientes al VIH-1 fue entre 2 y 10 años en ambos grupos y lo más importante, en el grupo de sujetos expuestos al VIH-1 no infectados la mayoría refiere tener relaciones sexuales sin protección en todas sus relaciones sexuales. Está demostrado que la adherencia al uso del condón es baja en las parejas serodiscordantes (114, 113).

La mayoría de los pacientes con infección por VIH-1 poseían carga viral detectable, de ellos un 74 % con valores por encima de 1000 cp/ $\mu$ L. La carga viral fue medida al momento del estudio, es probable que por las características de la evolución de la enfermedad estos pacientes hayan tenido rebotes de carga viral en el curso de su enfermedad, como esta descrito en la evolución de la enfermedad por VIH (115, 116). Se plantean que el umbral de carga viral necesario para transmitir el virus puede estar entre 1000 y 1500 cp/ $\mu$ L (117, 115,119). Las cargas virales menores de 200 cp/ $\mu$ L no tienen riesgo de transmisión sexual de VIH (116, 118, 119).

En varios estudios observacionales que involucran parejas heterosexuales existe evidencia de una fuerte asociación entre la carga viral de VIH-1 de una pareja VIH-positivo y el riesgo de transmisión a una pareja VIH-negativo (118, 120-122).

Teniendo en cuenta estos resultados los sujetos seronegativos tenían amplias posibilidades de infectarse pues se han expuesto por largo tiempo, más de dos años y por pacientes que tenían infección crónica bien establecida; por lo que se considera pertinente poder hacer asociaciones entre los polimorfismos estudiados y la susceptibilidad a la infección.

El número de células CD4+ ha sido una herramienta esencial evaluando el estado inmune y el pronóstico de las personas viviendo con VIH (123).

En este estudio encontramos que los sujetos del grupo expuestos al VIH-1 no infectados presentaron niveles normales de las subpoblaciones celulares CD4+ y CD8+, así como de células NK, mientras que el grupo de pacientes con infección por VIH-1 presentó una media de células CD4+ por encima de 300 cel/ $\mu$ L con una marcada disminución de células NK.

Los linfocitos T CD4+ son una de las principales dianas celulares para la infección por el VIH; esta infección conlleva a un agotamiento de esta subpoblación celular, ya sea por un incremento en la destrucción (por mecanismos directos o indirectos), por una disminución en la producción o por redistribución (54). La disminución de las células NK es notable en la infección crónica (124, 125).

Está documentado que los niveles de células CD4 varían con la edad, el sexo, los modelos dietéticos, el origen étnico, genético y los factores medioambientales (126). Es importante el conocimiento del rango de referencia del subconjunto de células T de individuos saludables de cada región en particular. Pues nos permite validar la utilidad del conteo de células CD4 para evaluar la inmunodepresión de los pacientes VIH, teniendo en cuenta los rangos de referencia de los individuos sanos de esa región particular (127).

La activación crónica del sistema inmune es una característica patognomónica de la infección por VIH, siendo uno de los predictores más fuertes de progresión de la enfermedad (34, 61, 128, 129). Esta activación es reconocida como una importante causa del agotamiento de los linfocitos T CD4 + durante la infección por VIH-1 (54). Es por esta razón que en el presente estudio se determinó la frecuencia de células CD4+ y células CD8+ que expresan el marcador de activación CD38 en ambos grupos de pacientes, así como los niveles plasmáticos de  $\beta$ 2 Microglobulina y Proteína C Reactiva.

Se observó una mayor activación inmune crónica en el grupo de pacientes con infección por VIH-1 con respecto al grupo de sujetos expuestos al VIH-1 no infectados, con diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados coinciden con un estudio realizado en 2021 donde observaron que los niveles

de expresión de CD38 en linfocitos T CD4+ de personas VIH negativas fueron inferiores que en individuos VIH+, y que la expresión de estos marcadores se incrementaba en estadios más avanzados de la enfermedad (130) (59, 129).

En cuanto a los marcadores solubles de activación inmune crónica estudiados,  $\beta$ 2 Microglobulina y Proteína C Reactiva, estos resultados coinciden con lo descrito por Shinha y colaboradores que reportan valores más elevados de  $\beta$ 2 Microglobulina en pacientes VIH con tratamiento antirretroviral que en los sujetos seronegativos (65). El estudio de cohorte en pacientes VIH africanos encontró que los niveles de Proteína C Reactiva, estaban muy elevados después del tratamiento antirretroviral cuando se comparó con un grupo de sujetos seronegativos resultados similares a los de esta investigación (129).

En resumen, hemos estudiado una cohorte de pacientes VIH-1 con tratamiento antirretroviral y expuestos no infectados que son los grupos más pertinentes para estudiar la susceptibilidad a la infección y la progresión de la enfermedad.

El grupo de pacientes VIH-1 presentó carga viral detectable por encima de 1000 cp/ $\mu$ L y activación inmune crónica, características de la evolución de la enfermedad. Estos datos los relacionaremos con los polimorfismos genéticos que describiremos.

#### **4.2 Identificación de los polimorfismos genéticos de los correceptores y los genes de citocinas en pacientes VIH/sida y en sujetos expuestos no infectados.**

Los factores genéticos que contribuyen a la predisposición o a la progresión del VIH/sida probablemente implican una interacción entre múltiples alelos de genes localizados en diferentes cromosomas (69) (101). En consecuencia, en lugar de limitarnos a realizar un estudio de asociación de polimorfismos para un

solo gen, optamos por investigar la importancia funcional de la relación entre cuatro SNP localizados en los genes *CCR5*, *IL-6*, *IFN-γ* e *IL-10* y la progresión de la enfermedad.

La frecuencia del polimorfismo *CCR5*<sup>Δ32</sup> es bastante variable. En general, la frecuencia del alelo Δ32 es alta en las poblaciones europeas ( p.ej., el 16 % en Noruega y el 11 % en Alemania) y baja o inexistente en las poblaciones africanas y asiáticas (131, 2). Sin embargo, aunque el alelo Δ32 es más frecuente en las poblaciones europeas, existen excepciones debidas a acontecimientos migratorios. Por ejemplo, la frecuencia del alelo Δ32 es alta en Sudáfrica (13 %) y en Chile (12 %) (131). En Brasil, la frecuencia del alelo en la población general se sitúa en torno al 4-5 %, mientras que en Cuba ronda el 7-8 % (131, 132). Encontramos que la frecuencia del alelo Δ32 en el grupo de pacientes no infectados pero expuestos al VIH-1 era de alrededor del 7 %, y en el grupo de VIH, de alrededor del 10 %, sin diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados no coinciden con lo encontrado en un estudio de cohorte donde se reporta una frecuencia mayor de heterocigóticos 38 % en Caucásicos, 32 % en Afro Americanos y 39 % en población Hispana (90).

Los resultados obtenidos en este estudio con respecto a la ausencia de homocigóticos y la baja presencia de heterocigóticos del polimorfismo *CCR5*<sup>Δ32</sup> concuerda con lo reportado en otros estudios en los que se ha observado que la frecuencia heterocigótica de este alelo es de 6,9 % en población general (85, 133-135). Además, puede sugerir que otros factores genéticos podrían estar participando en la protección contra la infección por el VIH-1. Se puede inferir que debido a la baja incidencia de la infección por VIH en la población cubana aún no se han desarrollado mutaciones protectoras. La participación del alelo

*ccr5*<sup>A32</sup> en forma homocigótica en el proceso de infección con el VIH-1 y en la progresión clínica cuando se presenta en forma heterocigótica, hace necesario diseñar estudios de cohorte que nos permitan valorar su utilidad como marcador pronóstico de progresión en la población cubana.

Los polimorfismos de simple nucleótido del promotor del gen *IL-6* pueden producir variaciones individuales en la expresión, concentración y actividad funcional de esta citoquina y tener un papel crítico en la inmunopatogenia de diversas enfermedades inflamatorias crónicas (136). Uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar el polimorfismo del promotor del gen de la *IL-6*-174 G>C donde se observó un predominio en ambos grupos del genotipo GG, sin diferencias significativas y no se encontró el genotipo CC en los pacientes VIH estudiados. Los estudios genéticos de población han mostrado diferencias étnicas en la frecuencia de los alelos G y C (136-138). Varias investigaciones identificaron las frecuencias del alelo G más altas en poblaciones no caucásicas que en las poblaciones caucásicas (137, 139, 140). Mientras que el alelo C de IL-6 es más raro en la población Afro-Caribeña (5,0 %) que en la población blanca norteamericana (40,3 %) (136). Esta investigación coincide con lo reportado para las poblaciones afrocaribeñas, pues el alelo C se encuentra en una frecuencia muy baja en el grupo de sujetos expuestos no infectados y no se encontró en el grupo de pacientes VIH.

Estos resultados diversos a través de los diferentes estudios se deben a que en las enfermedades infecciosas influyen muchos otros factores como el género, los patógenos, el ambiente.

El polimorfismo del gen de *IL-6* en la región del promotor tiene otros SNPs como -597G/A, -572G/C, -373AnTn. Estos sitios del polimorfismo no regulan la

función del gen independientemente. Por lo que la influencia del desequilibrio de ligamiento debe ser considerado en futuras investigaciones (138, 141, 142, 136).

El polimorfismo SNP del gen de la *IL-10* en la posición 1082 de la región proximal del promotor (rs1800896) está asociado con diferentes niveles de producción de IL-10 a través de los 3 genotipos (-1082 G/G, -1082 G/A, -1082 A/A) (138).

En este estudio, el genotipo de *IL-10* SNP-1082 GA aparecía con la mayor frecuencia, seguido de -1082 AA y GG; lo cual coincide con varios estudios realizados en Asia que también observaron un predominio de estos polimorfismos (143, 144).

Naicker y colaboradores (145) informaron que no se observaban diferencias significativas en la distribución de los genotipos de *IL-10* en la posición -1082 entre los grupos VIH-negativo y VIH-positivo, como ocurre en el presente estudio.

Los resultados de este trabajo que muestran que en ambos grupos de estudio el polimorfismo de *IL-10* no está en equilibrio de Hardy-Weinberg nos permiten inferir que este polimorfismo pudiera tener un papel en la patogénesis de las enfermedades infecciosas. Por lo que sería interesante continuar el análisis en el tiempo de este polimorfismo en la población cubana, en relación con la infección por VIH y otras enfermedades infecciosas en pacientes VIH y no VIH.

La frecuencia del genotipo de *INF-γ+874 A>T* varía ampliamente entre las diferentes etnias (98, 146). El genotipo TT está asociado con incremento en la producción de INF-γ en contraste, con los genotipos AA y TA que se han relacionados con baja producción de IFN-γ (97).

El polimorfismo genético de la citocina IFN- $\gamma$  que predominó en ambos grupos fue el heterocigótico T/A, seguido del homocigótico A/A sin diferencias significativas. Selma y colaboradores (146) encontraron resultados similares a este estudio en los pacientes VIH estudiados. En algunos estudios se ha indicado un riesgo significativamente mayor de infección y de progresión a sida del polimorfismo homocigoto *IFN- $\gamma$ -874A/T* en pacientes infectados por el virus VIH-1, similar a los resultados obtenidos en este estudio (26, 69).

Un predominio diferente a esta investigación encontró Oliveira y colaboradores en su estudio, donde el genotipo TT y el alelo T fueron los que prevalecieron (99).

Todo el análisis anterior nos permite sugerir la necesidad de ampliar el estudio en grupos de riesgo y población general para dilucidar que polimorfismo predomina en la población cubana y cómo influye en la patogenia de la enfermedad.

Hemos encontrado que los polimorfismos de los genes *ccr5* e *IL-6* estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que no fue el caso de la *IL-10* y el *IFN- $\gamma$* . Este resultado podría sugerir la selección del alelo *IL-10* en la población o ser indicativo de que el polimorfismo puede estar asociado con la enfermedad (87).

En el estudio de expresión génica de mapas de haplotipos (HapMap) se demostró que los genes con la mayor variabilidad de expresión dentro de la población están significativamente enriquecidos para la señalización de quimiocinas asociadas a la infección por VIH-1 (147). Esta información es muy importante para futuros estudios en los que estén implicados los genes de las citocinas y la infección por VIH.

Los mecanismos de alteración de la expresión génica asociados a los polimorfismos siguen siendo poco conocidos. Existen pruebas de que los cambios de secuencia en las regiones no codificantes de los genes de las citocinas pueden influir en la producción de los productos correspondientes, debido a su vinculación con otro marcador que afecta directamente a la expresión génica (31). Cuando el objetivo de un estudio es identificar si varios polimorfismos o variantes de genes están relacionados o no con una enfermedad, debe determinarse si los genes están en desequilibrio de ligamiento (DL) (148). Este análisis es fundamental para la investigación sobre la arquitectura genética de rasgos complejos en las enfermedades humanas, así como de la estructura de la población y la dinámica evolutiva. Sin embargo, hasta ahora, los estudios se centraban principalmente en el estado de DL entre variantes genéticas localizadas en el mismo cromosoma (148). En este estudio, los cuatro genes evaluados estaban localizados en cromosomas diferentes por ejemplo *ccr5* (3p21.31), *IL-6* (7p15.3), *IFN-γ* (12q.15) e *IL-10* (1q32.1), por lo que segregan de forma independiente.

El sida es consecuencia de la interacción entre los antecedentes genéticos del individuo y los factores ambientales a los que se enfrenta, donde la interacción entre genes puede desempeñar un papel significativo (69).

#### **4.3 Relación de los polimorfismos genéticos con marcadores inmunológicos y virológicos de progresión en pacientes VIH/sida y con el tiempo de exposición en sujetos expuestos no infectados.**

Se analizó la asociación de los SNP evaluados con los biomarcadores de progresión de la enfermedad más frecuentes, esto es, los niveles de células

CD4+ y la carga viral. Se comprobó que los valores de células CD4+ no diferían significativamente entre los genotipos estudiados, coincidiendo con lo que se había publicado en 2015 por Freitas y colaboradores (26). Aunque esto difiere de lo encontrado por Al-Jabri y Hasson (18) en un estudio de variantes nucleotídicas y haplotipos de *ccr5* en el que se demostró que el haplotipo frecuente HHC se asociaba significativamente con una media más elevada de recuentos de linfocitos T CD4+ entre los pacientes omaníes infectados por VIH-1 ( $p=0,024$ ). En 2017, Joshi y colaboradores demostraron que los polimorfismos del gen *ccr5* se correlacionó con la pérdida de linfocitos T CD4+, lo que probablemente regula la apoptosis de estos linfocitos en los pacientes con VIH (44).

Dos estudios previos no encontraron asociaciones con los diferentes SNP de *IL-10* con los niveles de células CD4+, al igual que ocurría en esta investigación (143, 149).

En este estudio se ha encontrado cierta asociación entre el polimorfismo GG de *IL-6* con valores de carga viral elevados superiores a 5000 cp/ $\mu$ L. Anteriormente, Borges y colaboradores (150) habían demostrado que la replicación del VIH se asociaba a un aumento significativo de los niveles de IL-6. Aparentemente se producía un efecto dosis-respuesta con diferencias cada vez mayores en la secreción de IL-6 y niveles plasmáticos de ARN del VIH más elevados. En otro estudio, Sherman y colaboradores (66) encontraron 40 variantes asociadas con los niveles de IL-6 en el grupo transétnico. Estos autores identificaron que el aumento del nivel de IL-6 podría ser el resultado de un aumento en los niveles de su receptor soluble (sIL-6R), ya que la unión de la IL-6 al sIL-6R protegería a la interleucina de su degradación. Cuando la IL-6 se

une al sIL-6R, se desencadenará la vía de transseñalización, que es la responsable de la acción proinflamatoria de la IL-6 (66).

Estos hallazgos apoyan la idea de que la genética del huésped contribuye a la inflamación crónica en individuos con VIH. Además, la variabilidad de la carga viral está influenciada por factores ambientales, virales y del huésped, incluida la variación genética humana (69).

Se analizó también la asociación de los polimorfismos SNP con el tiempo de exposición al VIH en el grupo de sujetos expuestos al VIH, no infectados. Se comprobó que los valores no diferían significativamente entre los genotipos de *cccr5*, *IL-10* e *INF-γ*. A diferencia de otros informes en este estudio no se logró relacionar la delección homocigótica del alelo *ccr5*<sup>Δ32</sup> como un factor de protección contra la infección en el grupo de expuestos no infectados (151-153). Esto puede sugerir por un lado que debido a la baja prevalencia de la infección por VIH en Cuba la delección homocigótica del alelo *ccr5*<sup>Δ32</sup> aún no se ha seleccionado en la población. Por otro lado, que la n de pacientes del estudio no permite tener la potencia estadística necesaria para establecer, sin lugar a dudas, su papel protector o no en la cohorte estudiada y también que otros factores genéticos podrían estar participando en la protección contra la infección por el VIH-1. Por lo que se deben realizar más estudios aumentando el tamaño muestral.

En cuanto al polimorfismo GG de *IL-6* hubo diferencias significativas para los sujetos con este polimorfismo que estuvieron expuestos al VIH entre 2 y 10 años. No se reporta en la literatura revisada (136, 137, 139, 140, 142, 154) asociación del polimorfismo de *IL-6* con el tiempo de exposición al VIH en

individuos seronegativos. Se reporta un predominio del alelo G en las poblaciones no caucásicas(137, 139, 140).

Teniendo en cuenta que IL-6 es una citocina pleiotropica con propiedades pro y antiinflamatorias y sus roles diversos en la respuesta inflamatoria aguda y crónica se pudiera sugerir que en estos sujetos que están expuestos al VIH se produzca un rápido aumento de la producción de IL-6 que desencadena una respuesta inflamatoria aguda a través de la señalización clásica de IL-6 que media la activación de vías antiinflamatorias. En contraste, la transseñalización a través de la unión de la IL-6 al sIL-6R lleva a la activación crónica del sistema inmunológico por el reclutamiento de monocitos al área inflamada. La transseñalización en las células T lleva a la inhibición de la apoptosis, inhibición de la diferenciación de Treg, y diferenciación de células de TH17 (155, 156). Dado estos resultados se sugiere continuar la evolución en el tiempo de este grupo y ampliar el estudio para definir si este polimorfismo está implicado en la protección a la infección.

#### **4.4 Relación de los polimorfismos genéticos con las enfermedades oportunistas en pacientes VIH/sida.**

Más de la mitad de los pacientes del grupo seropositivos a VIH-1 no presentaron enfermedades oportunistas al momento del estudio. El uso de la terapia antirretroviral resulta efectivo en la reducción de la carga viral con una mejoría cuantitativa y cualitativa de los linfocitos T CD4+ seguida por una fuerte disminución de las infecciones oportunistas que incluyen aquéllas de causa infecciosa (75). Estos éxitos han sido principalmente atribuidos a la

reconstitución de la inmunidad celular que juega el papel más importante en el control de las enfermedades oportunistas (48). No obstante, se encontró un 18 % de pacientes con enfermedades oportunistas, destacándose la neumonía por *P. jirovecii*, *Herpes Zoster* y *Candidiasis*. Shibata y colaboradores en 2019, identificaron la PcP en alta prevalencia en las muestras analizadas (49). Los hallazgos aquí descritos coinciden con los identificados por otros autores cubanos que estudian *P. jirovecii* (157).

En otras investigaciones en Cuba, Hernández y colaboradores reportan la neurotoxoplasmosis como enfermedad oportunista más frecuente con 21,8 % (110). Oropesa y col. reportan que el desgaste por sida en 25 % de los casos, seguido de la candidiasis esofágica (15,9 %) y la neurotoxoplasmosis con 8,3 % (112).

En la epidemia de sida los factores genéticos del hospedero no solo modulan la dinámica de VIH, sino también modulan la susceptibilidad a infecciones oportunistas (48).

A pesar de que en esta investigación no predominaron las enfermedades oportunistas, este estudio es el primero en Cuba que relaciona los polimorfismos genéticos con las enfermedades oportunistas. Esta investigación mostró una combinación de SNP *ccr5<sup>wt</sup>*, *IL-6 GC*, *IL-10 GA*, *INF-γ TA* asociados a una mayor presencia de enfermedades oportunistas en los pacientes VIH. Proporcionando las primeras evidencias de asociación de estas enfermedades y los SNP estudiados. Hallazgo importante que puede ser útil para orientar desde el punto de vista clínico para realizar tratamiento oportunamente y evitar complicaciones.

La literatura revisada muestra, asociación de los polimorfismos genéticos de forma individual y no sus combinaciones, con algunas enfermedades oportunistas y con enfermedades infecciosas (158, 159, 95).

Varios estudios realizados sobre la asociación del polimorfismo *ccr5*<sup>Δ32</sup> y la susceptibilidad a varias enfermedades virales muestran resultados diferentes según las enfermedades y las poblaciones estudiadas (21, 133, 160, 161). Un estudio realizado en China mostro que el *ccr5*<sup>Δ32</sup> estaba asociado con protección contra la infección por hepatitis B (160). El estudio realizado en Brasil no encontró asociación entre el *ccr5*<sup>Δ32</sup> y la severidad o mortalidad de infección por H1N1 (161).

En cuanto al polimorfismo de *IL-6* y las enfermedades oportunistas este estudio mostró que el polimorfismo homocigótico GG no presentó enfermedades oportunistas, hallazgo que no coincide con otros autores. El estudio de Feng y colaboradores reporta asociación de este polimorfismo con neumonía (158). Un estudio iraní observó que el alelo G y el genotipo G/G tenía una alta distribución en los pacientes con hepatitis B (141). Otro estudio encontró un mayor riesgo de sarcoma de Kaposi con este polimorfismo (162).

En cuanto al polimorfismo de *IL-10* y las enfermedades oportunistas este estudio mostró que el polimorfismo homocigótico GG presentó menos enfermedades oportunistas lo cual coincide con los datos del estudio de In-Suk Kim y colaboradores que demostraron que portar el alelo G tenía un efecto protector contra las enfermedades oportunistas (95).

El genotipo *AT* del polimorfismo +874 A>T de *INF-γ* fue el que predominó en esta investigación. Se plantea que el genotipo *AT* del polimorfismo +874 A>T de *INF-γ* está asociado con TB (159). El polimorfismo de *INF-γ* que predominó

en segundo lugar fue el homocigótico AA. La literatura reporta que el alelo A es un factor de riesgo para la infección por VIH y que los pacientes VIH con el alelo A tienen un riesgo mayor de coinfección VIH/tuberculosis, un conteo de células CD4+ más bajo y una peor respuesta a la terapia antirretroviral (97, 163). Consideramos conveniente estudiar en el tiempo el comportamiento de este polimorfismo en la población cubana VIH+, pues se ha demostrado que IFN- $\gamma$  es la citocina más importante que proporciona resistencia a las enfermedades por micobacterias y la mayoría de sus variantes están involucradas con la susceptibilidad al *mycobacterium tuberculosis* (94, 96, 104, 159, 164, 165).

### **Consideraciones generales**

Los factores genéticos que contribuyen a la predisposición o a la progresión del VIH/sida probablemente implican una interacción entre múltiples alelos de genes localizados en diferentes cromosomas. En consecuencia, en lugar de limitarnos a realizar un estudio de asociación de polimorfismos para un solo gen, optamos por investigar la importancia funcional de la relación entre cuatro polimorfismos de un solo nucleótido localizados en los genes *CCR5*, *IL-6*, *IL-10*, e *IFN- $\gamma$*  y la susceptibilidad a la infección y la progresión de la enfermedad en una cohorte de pacientes cubanos con VIH/sida y expuestos no infectados que son los grupos más pertinentes para estudiar la susceptibilidad y la progresión de la enfermedad.

Entender cómo influye la genética humana en la susceptibilidad a la enfermedad por VIH ofrece la oportunidad para nuevos conocimientos en la patogénesis, nuevos medicamentos potenciales y la respuesta a la terapia

antirretroviral. Así como, un mayor conocimiento de las diferencias sustanciales en las asociaciones genéticas entre las poblaciones.

Las interacciones del hospedero-microorganismo tienen el potencial para producir una respuesta inmune variada y diversa en las diferentes poblaciones estudiadas condicionada por el fondo genético del individuo.

Los SNP son variantes de un solo nucleótido, generalmente bialélicos, y representan los polimorfismos más abundantes del genoma humano. Se detectan fácilmente y se consideran como uno de los mejores marcadores biológicos de asociación en estudios de casos-controles.

La continua investigación y análisis epidemiológicos, genéticos e inmunológicos sobre la patogénesis de la infección por VIH posibilitan llegar a comprender el impacto de la respuesta inmune y llevar al desarrollo de nuevas estrategias para combatir la epidemia mundial de sida.

El presente trabajo constituye el primer estudio en Cuba que contribuye a evaluar la frecuencia de estos polimorfismos y su influencia en los biomarcadores de progresión de la enfermedad en la población cubana con infección por VIH y en la susceptibilidad a la infección en expuestos no infectados. Los hallazgos encontrados, sin dudas, ofrecen una base científica sobre la inmunopatogenia de la enfermedad en Cuba y pueden ser útiles para orientar desde el punto de vista clínico para realizar tratamiento oportunamente y evitar complicaciones.

Sin embargo, señalaremos algunas limitaciones del estudio como son, el tamaño muestral que debe ser mayor en estudios futuros. Realizar diferentes diseños de estudios que involucren pacientes en diferentes estadios de la enfermedad y sujetos expuestos no infectados, así como población general.

Aumentar la cantidad de polimorfismos de citocinas evaluados relacionados con la infección por VIH y la relación con los niveles solubles de estas citocinas. Además, estudiar la influencia del tratamiento antirretroviral en la evolución de la enfermedad y la cepa del VIH que infecta al paciente en relación a los SNP estudiados.

La investigación muestra evidencias que sugieren el papel de los SNP de ccr5 y algunas citocinas en la infección por VIH, pero se necesitan estudios adicionales que complementen estos resultados, para entender mejor los mecanismos involucrados en la susceptibilidad y la progresión de la infección por VIH en los pacientes cubanos.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- Las características demográficas no mostraron diferencias entre los grupos analizados. Son similares a las descritas en previos estudios cubanos de pacientes VIH. Lo que sugiere que podrían ser representativas de la totalidad de las personas pertenecientes a los grupos estudiados.
- Las distribuciones alélicas y genotípicas de los genes *CCR5*, *IL-6*, *IFN-γ* e *IL-10* no difieren significativamente entre los grupos estudiados. No obstante, debido al tamaño muestral no permite llegar a conclusiones definitivas en este sentido.
- Se sugiere el papel del polimorfismo genético homocigótico *GG* de *IL-6* en la epidemia cubana de VIH/sida, asociado con niveles elevados de carga viral en el grupo de pacientes VIH-1+ y con mayor tiempo de exposición al VIH-1 en el grupo de pacientes expuestos no infectados.
- Se exponen las primeras evidencias que relacionan los polimorfismos genéticos con las enfermedades oportunistas, principalmente la combinación de SNP *CCR5<sup>wt</sup>*, *IL-6 GC*, *IL-10 GA*, *INF-γ TA*.

## **RECOMENDACIONES**

## RECOMENDACIONES

- Ampliar el tamaño muestral que involucre pacientes en diferentes estadios de la enfermedad y un mayor número de citocinas.
- Continuar el análisis de los genes de citocinas particularmente *IL-6* que participan en la inmunopatogenia de la enfermedad.
- Divulgar los resultados de esta investigación entre los facultativos que atienden pacientes VIH/sida.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Powell TR, Duarte RRR, Hotopf M, Hatch SL, de Mulder Rougvie M, Breen GD, et al. The behavioral, cellular and immune mediators of HIV-1 acquisition: New insights from population genetics. *Scientific reports*. 2020;10(1):3304.
2. Fellay J, Pedergnana V. Exploring the interactions between the human and viral genomes. *Human genetics*. 2020;139(6-7):777-81.
3. Wang MG, Wang J, He JQ. Genetic association of TOLLIP gene polymorphisms and HIV infection: a case-control study. *BMC infectious diseases*. 2021;21(1):590.
4. ONUSIDA. Hoja informativa. Estadísticas mundiales sobre el VIH 2024 [09/09/2024]. Available from: <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>.
5. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine*. 1981;305(24):1425-31.
6. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, NY)*. 1983;220:868-71.
7. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunodeficiencias congénitas y adquiridas. *Inmunología celular y molecular*. 9na ed2021. p. 458-68.
8. McLaren PJ, Fellay J. HIV-1 and human genetic variation. *Nature reviews Genetics*. 2021;22(10):645-57.
9. Perdomo-Celis F, Taborda NA, Rugeles MT. CD8(+) T-Cell Response to HIV Infection in the Era of Antiretroviral Therapy. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1896.
10. Turk G, Ghiglione Y, Hormannstorfer M, Laufer N, Coloccini R, Salido J, et al. Biomarkers of Progression after HIV Acute/Early Infection: Nothing Compares to CD4<sup>+</sup> T-cell Count? *Viruses*. 2018;10(1).
11. Ross JM, Ying R, Celum CL, Baeten JM, Thomas KK, Murnane PM, et al. Modeling HIV disease progression and transmission at population-level: The potential impact of modifying disease progression in HIV treatment programs. *Epidemics*. 2018;23:34-41.
12. WHO. Policy brief. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: what's new 2015 [11/2022]. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/arv/policy-brief-arv-2015/en>.
13. Illingworth CJR, Raghwani J, Serwadda D, Sewankambo NK, Robb ML, Eller MA, et al. A de novo approach to inferring within-host fitness effects during untreated HIV-1 infection. *PLoS pathogens*. 2020;16(6):e1008171.
14. Naranbhai V, Carrington M. Host genetic variation and HIV disease: from mapping to mechanism. *Immunogenetics*. 2017;69(8-9):489-98.
15. Thami PK, Chimusa ER. Population Structure and Implications on the Genetic Architecture of HIV-1 Phenotypes Within Southern Africa. *Frontiers in genetics*. 2019;10:905.
16. Monaco DC, Ende Z, Hunter E. Virus-Host Gene Interactions Define HIV-1 Disease Progression. *Current topics in microbiology and immunology*. 2017;407:31-63.
17. Westrop SJ, Cocker ATH, Boasso A, Sullivan AK, Nelson MR, Imami N. Enrichment of HLA Types and Single-Nucleotide Polymorphism Associated With Non-progression in a Strictly Defined Cohort of HIV-1 Controllers. *Frontiers in immunology*. 2017;8:746.
18. Hasson AAA-JaSS. Genetic Diversity within Chemokine Receptor 5 (CCR5) for Better Understanding of AIDS. In: Bitz L, editor. *Genetic Diversity*: IntechOpen; 2017.
19. Hillman T. The Immense Impact of CCR5 Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs). *Preprints.org*; 2020.
20. Tough RH, McLaren PJ. Interaction of the Host and Viral Genome and Their Influence on HIV Disease. *Frontiers in genetics*. 2018;9:720.

21. Ellwanger JH, Kulmann-Leal B, Kaminski VL, Rodrigues AG, Bragatte MAS, Chies JAB. Beyond HIV infection: Neglected and varied impacts of CCR5 and CCR5Δ32 on viral diseases. *Virus research*. 2020;286:198040.
22. An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in genetics : TIG*. 2010;26(3):119-31.
23. Wang B, Kang W, Zuo J, Kang W, Sun Y. The Significance of Type-I Interferons in the Pathogenesis and Therapy of Human Immunodeficiency Virus 1 Infection. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1431.
24. Planès R, Serrero M, Leghmari K, BenMohamed L, Bahraoui E. HIV-1 Envelope Glycoproteins Induce the Production of TNF- $\alpha$  and IL-10 in Human Monocytes by Activating Calcium Pathway. *Scientific reports*. 2018;8(1):17215.
25. Veloso S, Olona M, García F, Domingo P, Alonso-Villaverde C, Broch M, et al. Effect of TNF-alpha genetic variants and CCR5 Delta 32 on the vulnerability to HIV-1 infection and disease progression in Caucasian Spaniards. *BMC medical genetics*. 2010;11:63.
26. Freitas FB, Lima SS, Feitosa RN, Azevedo VN, Ishak Mde O, Ishak R, et al. Polymorphisms in the IFNy, IL-10, and TGF $\beta$  genes may be associated with HIV-1 infection. *Disease markers*. 2015;2015:248571.
27. Hernández-Requejo D, Franco-Lacato A, Iglesias-Perez E, de-Armas-Rodriguez Y. Polimorfismo genético del correceptor CCR5 en pacientes cubanos VIH/sida de la tercera edad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2021;40(4).
28. Rodríguez J, Hernández D, Iglesias E, Castillo N, de Armas Y. Gargarismo para identificar polimorfismo genético del correceptor CCR5. *Rev Cub Investig Bioméd*. 2023;42:e2047.
29. Hernández D, de Armas Y, Iglesias E, Díaz H, Gravier R, Godínez M, et al. Polimorfismos de los genes CCR5, IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10 en pacientes cubanos con VIH/sida. *Revista Clínica Española*. 2024;224:96-104.
30. Martínez P. Distribución de la delección Δ32 del CCR5 en pacientes cubanos infectados con el VIH-1 y su relación con la evolución de la enfermedad [Tesis Master en Virología]2003.
31. Corona E, Wang L, Ko D, Patel CJ. Systematic detection of positive selection in the human-pathogen interactome and lasting effects on infectious disease susceptibility. *PloS one*. 2018;13(5):e0196676.
32. Lu J, Ma SS, Zhang WY, Duan JP. Changes in peripheral blood inflammatory factors (TNF- $\alpha$  and IL-6) and intestinal flora in AIDS and HIV-positive individuals. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2019;20(10):793-802.
33. Rolland M. HIV-1 phylogenetics and vaccines. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2019;14:227-32.
34. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual review of pathology*. 2011;6:223-48.
35. Freed E, Martin M. HIVs and Their Replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 8th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2017. p. 2108-85.
36. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(3):182-92.
37. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwang D. HIV subtype diversity worldwide. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2019;14(3):153–60.
38. Peeters M, D'Arc M, Delaporte E. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS reviews*. 2014;16(1):23-34.
39. Kouri V, Khouri R, Alemán Y, Abrahantes Y, Vercauteren J, Pineda-Peña AC, et al. CRF19\_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine*. 2015;2(3):244-54.
40. Zhukova A, Voznica J, Dávila Felipe M, To TH, Pérez L, Martínez Y, et al. Cuban history of CRF19 recombinant subtype of HIV-1. *PLoS pathogens*. 2021;17(8):e1009786.

41. Bertels F, Marzel A, Leventhal G, Mitov V, Fellay J, Günthard HF, et al. Dissecting HIV Virulence: Heritability of Setpoint Viral Load, CD4+ T-Cell Decline, and Per-Parasite Pathogenicity. *Molecular biology and evolution*. 2018;35(1):27-37.
42. Shi Y, Su J, Chen R, Wei W, Yuan Z, Chen X, et al. The Role of Innate Immunity in Natural Elite Controllers of HIV-1 Infection. *Frontiers in immunology*. 2022;13:780922.
43. Bartha I, McLaren PJ, Brumme C, Harrigan R, Telenti A, Fellay J. Estimating the Respective Contributions of Human and Viral Genetic Variation to HIV Control. *PLoS computational biology*. 2017;13(2):e1005339.
44. Garg H, Joshi A. Host and Viral Factors in HIV-Mediated Bystander Apoptosis. *Viruses*. 2017;9(8).
45. Santana DS, Silva MJA, de Marin ABR, Costa V, Sousa GSM, de Sousa JG, et al. The Influence Between C-C Chemokine Receptor 5 Genetic Polymorphisms and the Type-1 Human Immunodeficiency Virus: A 20-Year Review. *AIDS research and human retroviruses*. 2023;39(1):13-32.
46. Kwok AJ, Mentzer A, Knight JC. Host genetics and infectious disease: new tools, insights and translational opportunities. *Nature reviews Genetics*. 2021;22(3):137-53.
47. Castro-Lima VAC, Borges IC, Joelsons D, Sales VVT, Guimaraes T, Ho YL, et al. Impact of human immunodeficiency virus infection on mortality of patients who acquired healthcare associated-infection in critical care unit. *Medicine*. 2019;98(23):e15801.
48. Pyarali FF, Iordanov R, Palacio A, Tamariz L. Excess mortality risk from sepsis in patients with HIV - A meta-analysis. *Journal of critical care*. 2020;59:101-7.
49. Shibata S, Kikuchi T. Pneumocystis pneumonia in HIV-1-infected patients. *Respiratory investigation*. 2019;57(3):213-9.
50. Boyd AT, Oboho I, Paulin H, Ali H, Godfrey C, Date A, et al. Addressing advanced HIV disease and mortality in global HIV programming. *AIDS research and therapy*. 2020;17(1):40.
51. Kuo HH, Licherfeld M. Recent progress in understanding HIV reservoirs. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2018;13(2):137-42.
52. Balasubramaniam M, Pandhare J, Dash C. Immune Control of HIV. *J Life Sci (Westlake Village)*. 2019;1(1):4-37.
53. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annual review of medicine*. 2011;62:141-55.
54. Le Hingrat Q, Sereti I, Landay AL, Pandrea I, Apetrei C. The Hitchhiker Guide to CD4(+) T-Cell Depletion in Lentiviral Infection. A Critical Review of the Dynamics of the CD4(+) T Cells in SIV and HIV Infection. *Frontiers in immunology*. 2021;12:695674.
55. Demers KR, Makedonas G, Buggert M, Eller MA, Ratcliffe SJ, Goonetilleke N, et al. Temporal Dynamics of CD8+ T Cell Effector Responses during Primary HIV Infection. *PLoS pathogens*. 2016;12(8):e1005805.
56. Tuen M, Bimela JS, Banin AN, Ding S, Harkins GW, Weiss S, et al. Immune Correlates of Disease Progression in Linked HIV-1 Infection. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1062.
57. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(3):1588-92.
58. Lee HC. Structure and enzymatic functions of human CD38. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2006;12(11-12):317-23.
59. Lu L, Wang J, Yang Q, Xie X, Huang Y. The role of CD38 in HIV infection. *AIDS research and therapy*. 2021;18(1):11.
60. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *Journal of acquired*

- immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association. 1997;16(2):83-92.
61. Rodríguez-Alba JC, Abrego-Perego A, Gallardo-Hernández C, Pérez-Lara J, Santiago-Cruz W, Jiang W, et al. HIV Disease Progression: Overexpression of the Ectoenzyme CD38 as a Contributory Factor? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2019;41(1):e1800128.
62. Tenforde MW, Gupte N, Dowdy DW, Asmuth DM, Balagopal A, Pollard RB, et al. C-reactive protein (CRP), interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), and lipopolysaccharide (LPS) are associated with risk of tuberculosis after initiation of antiretroviral therapy in resource-limited settings. *PloS one*. 2015;10(2):e0117424.
63. Saavedra N, Fallard A, Araya M, Serón P, Lanas F, Salazar LA. Polimorfismo rs3091244 del gen de la proteína C reactiva influencia los niveles séricos de CRP-hs en individuos de la región de La Araucanía %J Revista chilena de cardiología. 2011;30:22-7.
64. Shah S, Ma Y, Scherzer R, Huhn G, French AL, Plankey M, et al. Association of HIV, hepatitis C virus and liver fibrosis severity with interleukin-6 and C-reactive protein levels. *AIDS (London, England)*. 2015;29(11):1325-33.
65. Shinha T, Mi D, Liu Z, Orschell CM, Lederman MM, Gupta SK. Relationships between renal parameters and serum and urine markers of inflammation in those with and without HIV infection. *AIDS research and human retroviruses*. 2015;31(4):375-83.
66. Sherman BT, Hu X, Singh K, Haine L, Rupert AW, Neaton JD, et al. Genome-wide association study of high-sensitivity C-reactive protein, D-dimer, and interleukin-6 levels in multiethnic HIV+ cohorts. *AIDS (London, England)*. 2021;35(2):193-204.
67. Utay NS, Hunt PW. Role of immune activation in progression to AIDS. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2016;11(2):131-7.
68. Passmore JA, Jaspan HB, Masson L. Genital inflammation, immune activation and risk of sexual HIV acquisition. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2016;11(2):156-62.
69. Siegel DA, Thanh C, Wan E, Hoh R, Hobbs K, Pan T, et al. Host variation in type I interferon signaling genes (MX1), C-C chemokine receptor type 5 gene, and major histocompatibility complex class I alleles in treated HIV+ noncontrollers predict viral reservoir size. *AIDS (London, England)*. 2023;37(3):477-88.
70. Cresswell P, Springer T, Strominger JL, Turner MJ, Grey HM, Kubo RT. Immunological identity of the small subunit of HL-A antigens and beta2-microglobulin and its turnover on the cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(5):2123-7.
71. Berggård I, Bearn AG. Isolation and properties of a low molecular weight beta-2-globulin occurring in human biological fluids. *The Journal of biological chemistry*. 1968;243(15):4095-103.
72. Tin A, Astor BC, Boerwinkle E, Hoogeveen RC, Coresh J, Kao WH. Genome-wide association study identified the human leukocyte antigen region as a novel locus for plasma beta-2 microglobulin. *Human genetics*. 2013;132(6):619-27.
73. Tieu HV, Taylor BS, Jones J, Wilkin TJ. CROI 2018: Advances in Antiretroviral Therapy. *Topics in antiviral medicine*. 2018;26(1):40-53.
74. Gulick RM, Flexner C. Long-Acting HIV Drugs for Treatment and Prevention. *Annual review of medicine*. 2019;70:137-50.
75. Finocchio T, Coolidge W, Johnson T. The ART of Antiretroviral Therapy in Critically Ill Patients With HIV. *Journal of intensive care medicine*. 2019;34(11-12):897-909.
76. MINSAP. Anuario estadístico 2022.
77. Quintana-Murci L. Human Immunology through the Lens of Evolutionary Genetics. *Cell*. 2019;177(1):184-99.
78. Claussnitzer M, Cho JH, Collins R, Cox NJ, Dermitzakis ET, Hurles ME, et al. A brief history of human disease genetics. *Nature*. 2020;577(7789):179-89.

79. Casadevall A, Pirofski LA. What Is a Host? Attributes of Individual Susceptibility. *Infection and immunity*. 2018;86(2).
80. Radwan J, Babik W, Kaufman J, Lenz TL, Winternitz J. Advances in the Evolutionary Understanding of MHC Polymorphism. *Trends in genetics : TIG*. 2020;36(4):298-311.
81. Ramírez-Bello J. Papel de la variabilidad genética en las enfermedades mendelianas y multifactoriales. *Gaceta medica de Mexico*. 2019;155(5):499-507.
82. Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales M. [Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases]. *Gaceta medica de Mexico*. 2017;153(2):238-50.
83. Marques D, Ferreira-Costa LR, Ferreira-Costa LL, Correa RDS, Borges AMP, Ito FR, et al. Association of insertion-deletions polymorphisms with colorectal cancer risk and clinical features. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(37):6854-67.
84. Ekenberg C, Tang MH, Zucco AG, Murray DD, MacPherson CR, Hu X, et al. Association Between Single-Nucleotide Polymorphisms in HLA Alleles and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Load in Demographically Diverse, Antiretroviral Therapy-Naïve Participants From the Strategic Timing of AntiRetroviral Treatment Trial. *The Journal of infectious diseases*. 2019;220(8):1325-34.
85. Donyavi T, Bokharaei-Salim F, Nahand JS, Garshasbi S, Eshghaei M, Sadeghi M, et al. Evaluation of CCR5-Δ32 mutation among individuals with high risk behaviors, neonates born to HIV-1 infected mothers, HIV-1 infected individuals, and healthy people in an Iranian population. *Journal of medical virology*. 2020;92(8):1158-64.
86. Abramovs N, Brass A, Tassabehji M. Hardy-Weinberg Equilibrium in the Large Scale Genomic Sequencing Era. *Frontiers in genetics*. 2020;11:210.
87. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gaceta sanitaria*. 2005;19(4):333-41.
88. Karczewski KJ, Gauthier LD, Daly MJ. Technical artifact drives apparent deviation from Hardy-Weinberg equilibrium at CCR5-Δ32 and other variants in gnomAD. *bioRxiv*. 2023:784157.
89. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science (New York, NY)*. 1996;273(5283):1856-62.
90. Jasinska AJ, Pandrea I, Apetrei C. CCR5 as a Coreceptor for Human Immunodeficiency Virus and Simian Immunodeficiency Viruses: A Prototypic Love-Hate Affair. *Frontiers in immunology*. 2022;13:835994.
91. Islam S, Moni MA, Urmi UL, Tanaka A, Hoshino H. C-C Chemokine receptor-like 2 (CCRL2) acts as coreceptor for human immunodeficiency virus-2. *Briefings in bioinformatics*. 2021;22(4).
92. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*. 2018;285(16):2944-71.
93. Schioppa T, Sozio F, Barbazza I, Scutera S, Bosisio D, Sozzani S, et al. Molecular Basis for CCRL2 Regulation of Leukocyte Migration. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:615031.
94. Zha Z, Bucher F, Nejatfard A, Zheng T, Zhang H, Yea K, et al. Interferon-γ is a master checkpoint regulator of cytokine-induced differentiation. 2017;114(33):E6867-E74.
95. Kim I. Genetic Variants and Haplotypes in the IL10 Gene and Their Association with Opportunistic Infections among HIV-Infected Patients in Korea in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Ann Clin Microbiol*. 2019;22(1).
96. Ye L, Schepf D, Staeheli P. Interferon-λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2019;19(10):614-25.

97. de Carvalho PG, de Oliveira Rodrigues R, Ribeiro da Silva SF, Ribeiro IF, de Miranda Lucena HB, Martins LR, et al. CD38+CD8+ and CD38+CD4+ T Cells and IFN Gamma (+874) Polymorphism Are Associated with a Poor Virological Outcome. *Immunological investigations*. 2016;45(4):312-27.
98. Araujo Z, Palacios A, Biomon R, Rivas-Santiago B, Serrano CJ, Enciso-Moreno L, et al. Concordance between IFNy gene +874 A/T polymorphism and interferon- $\gamma$  expression in a TB-endemic indigenous setting. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2017;50(2):199-207.
99. de Oliveira Rodrigues R, Helena Barem Rabenhorst S, Germano de Carvalho P, Luri Sasahara G, Mabel Ferreira Vasconcelos L, Antônio Gomes de Arruda É, et al. Association of IL10, IL4, IFNG, and CTLA4 Gene Polymorphisms with Efavirenz Hypersensitivity Reaction in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Japanese journal of infectious diseases*. 2017;70(4):430-6.
100. Kulkarni S, Lied A, Kulkarni V, Rucevic M, Martin MP, Walker-Sperling V, et al. CCR5AS lncRNA variation differentially regulates CCR5, influencing HIV disease outcome. *Nature immunology*. 2019;20(7):824-34.
101. Tsiora CG, Nikolopoulos GK, Dimou NL, Pantavou KG, Bagos PG, Mensah B, et al. Interleukin gene polymorphisms and susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis. *Journal of genetics*. 2018;97(1):235-51.
102. An P, Li R, Wang JM, Yoshimura T, Takahashi M, Samudralal R, et al. Role of exonic variation in chemokine receptor genes on AIDS: CCRL2 F167Y association with pneumocystis pneumonia. *PLoS genetics*. 2011;7(10):e1002328.
103. Catálogo Software Flor Cytometry [2/2021]. Available from: <http://www.PARTEC.com/>
104. López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(7):970-5.
105. Catálogo productos eBioscience [2/2021]. Available from: <http://www.eBioscience.com/products>.
106. WHO. Prequalification of Diagnostics Programme. Nucli-SENS EasyQ® HIV-1 v2.0 2017 [Available from: [extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/pqdx0127\\_016\\_00](http://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/pqdx0127_016_00) public report v3.pdf].
107. Cobas Planchez L, Mezquia de Pedro N, Navarro García YE, Rodríguez Mena T. Caracterización de los pacientes con VIH/sida en Guanabacoa, La Habana %J Revista Cubana de Medicina General Integral. 2022;38.
108. Montana JF, Ferreira G, Cunha CLF, de Queiroz AAR, Fernandes WAA, Polaro SHI, et al. The HIV epidemic in Colombia: spatial and temporal trends analysis. *BMC public health*. 2021;21(1):178.
109. Evens E, Lanham M, Santi K, Cooke J, Ridgeway K, Morales G, et al. Experiences of gender-based violence among female sex workers, men who have sex with men, and transgender women in Latin America and the Caribbean: a qualitative study to inform HIV programming. *BMC international health and human rights*. 2019;19(1):9.
110. Hernández D, Pérez J, Can A, Pérez E. Enfermedades oportunistas en pacientes VIH/sida con debut de sida que reciben tratamiento antirretroviral. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2015;34(3).
111. Gil L, Acosta M, Rabeiro C, Gravier R, Hernández M, Bermúdez Y, et al. Facial biostimulation with PRP activated with ozone resound on cellular redox balance, improves lipoatrophy and quality of life in HIV patients. *Journal of pharmacy & pharmacognosy research*. 2019;7(4):273-87.
112. Oropesa González L, Sánchez Valdez L, Berdasquera Corcho D, Gala González Á, Pérez Ávila JL, Isela Lantero M. Debut clínico de SIDA en Cuba %J Revista Cubana de Medicina Tropical. 2007;59:0-.

113. Melo MG, Sprinz E, Gorbach PM, Santos B, Rocha TM, Simon M, et al. HIV-1 heterosexual transmission and association with sexually transmitted infections in the era of treatment as prevention. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2019;87:128-34.
114. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *The New England journal of medicine*. 2016;375(9):830-9.
115. Broyles LN, Luo R, Boeras D, Vojnov L. The risk of sexual transmission of HIV in individuals with low-level HIV viraemia: a systematic review. *Lancet (London, England)*. 2023;402(10400):464-71.
116. Thomford NE, Mhandire D, Dandara C, Kyei GB. Promoting Undetectable Equals Untransmittable in Sub-Saharan Africa: Implication for Clinical Practice and ART Adherence. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(17).
117. Gunn JKL, Patterson W, Anderson BJ, Swain CA. Understanding the Risk of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Virologic Failure in the Era of Undetectable Equals Untransmittable. *AIDS and behavior*. 2021;25(7):2259-65.
118. Bavinton BR, Pinto AN, Phanuphak N, Grinsztejn B, Prestage GP, Zablotska-Manos IB, et al. Viral suppression and HIV transmission in serodiscordant male couples: an international, prospective, observational, cohort study. *The lancet HIV*. 2018;5(8):e438-e47.
119. The Lancet H. U=U taking off in 2017. *The lancet HIV*. 2017;4(11):e475.
120. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, van Lunzen J, et al. Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *Jama*. 2016;316(2):171-81.
121. Rodger A, Bruun T, Weait M, Vernazza P, Collins S, Estrada V, et al. Partners of people on ART - a New Evaluation of the Risks (The PARTNER study): design and methods. *BMC public health*. 2012;12:296.
122. Mujugira A, Coombs RW, Heffron R, Celum C, Ronald A, Mugo N, et al. Seminal HIV-1 RNA Detection in Heterosexual African Men Initiating Antiretroviral Therapy. *The Journal of infectious diseases*. 2016;214(2):212-5.
123. Peeling RW, Ford N. Reprising the role of CD4 cell count in HIV programmes. *The lancet HIV*. 2017;4(9):e377-e8.
124. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(2):112-23.
125. Scully E, Alter G. NK Cells in HIV Disease. *Current HIV/AIDS reports*. 2016;13(2):85-94.
126. Mulu W, Abera B, Mekonnen Z, Adem Y, Yimer M, Zenebe Y, et al. Haematological and CD4+ T cells reference ranges in healthy adult populations in Gojjam zones in Amhara region, Ethiopia. *PloS one*. 2017;12(7):e0181268.
127. Afolabi JK, Fadeyi A, Desalu OO, Durotoye IA, Fawibe AE, Adeboye MAN, et al. Normal CD4 Count Range among Healthy Nigerian Population in Ilorin. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*. 2017;16(4):359-65.
128. Sereti I, Altfeld M. Immune activation and HIV: an enduring relationship. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2016;11(2):129-30.
129. Kroeze S, Wit FW, Rossouw TM, Steel HC, Kityo CM, Siwale M, et al. Plasma Biomarkers of Human Immunodeficiency Virus-Related Systemic Inflammation and Immune Activation in Sub-Saharan Africa Before and During Suppressive Antiretroviral Therapy. *The Journal of infectious diseases*. 2019;220(6):1029-33.
130. Hunt PW, Lee SA, Siedner MJ. Immunologic Biomarkers, Morbidity, and Mortality in Treated HIV Infection. *The Journal of infectious diseases*. 2016;214 Suppl 2(Suppl 2):S44-50.
131. Solloch UV, Lang K, Lange V, Böhme I, Schmidt AH, Sauter J. Frequencies of gene variant CCR5-Δ32 in 87 countries based on next-generation sequencing of 1.3 million

- individuals sampled from 3 national DKMS donor centers. *Human immunology*. 2017;78(11-12):710-7.
132. Silva-Carvalho WH, de Moura RR, Coelho AV, Crovella S, Guimarães RL. Frequency of the CCR5-delta32 allele in Brazilian populations: A systematic literature review and meta-analysis. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016;43:101-7.
133. Zifawei K, Stowe O, Adias T, Tatfeng M, Zaccheaus A. Null Single Nucleotide Polymorphism in Chemokine Receptor 5 (CCR5) Genes among the Ijaw Ethnic Population of Nigeria. *Journal of Blood Diseases*. 2016;59-66.
134. Heydarifard Z, Tabarraei A, Moradi A. Polymorphisms in CCR5Δ32 and Risk of HIV-1 Infection in the Southeast of Caspian Sea, Iran. *Disease markers*. 2017;2017:4190107.
135. Koor GW, Paximadis M, Picton ACP, Karatas F, Loubser SA, He W, et al. Cis-regulatory genetic variants in the CCR5 gene and natural HIV-1 control in black South Africans. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2019;205:16-24.
136. Chen Y, Hu Y, Song Z. The association between interleukin-6 gene -174G/C single nucleotide polymorphism and sepsis: an updated meta-analysis with trial sequential analysis. *BMC medical genetics*. 2019;20(1):35.
137. Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(16):2449-55.
138. Mao ZR, Zhang SL, Feng B. Association of IL-10 (-819T/C, -592A/C and -1082A/G) and IL-6 -174G/C gene polymorphism and the risk of pneumonia-induced sepsis. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2017;22(2):106-12.
139. Cox ED, Hoffmann SC, DiMercurio BS, Wesley RA, Harlan DM, Kirk AD, et al. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation*. 2001;72(4):720-6.
140. Meenagh A, Williams F, Ross OA, Patterson C, Gorodezky C, Hammond M, et al. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Human immunology*. 2002;63(11):1055-61.
141. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, Barrios Y, Solé-Violán J, Ferreres J, et al. Association between Interleukin-6 Promoter Polymorphism (-174 G/C), Serum Interleukin-6 Levels and Mortality in Severe Septic Patients. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(11).
142. Jiménez-Sousa MA, Medrano LM, Liu P, Fernández-Rodríguez A, Almansa R, Gomez-Sánchez E, et al. IL-6 rs1800795 polymorphism is associated with septic shock-related death in patients who underwent major surgery: a preliminary retrospective study. *Annals of intensive care*. 2017;7(1):22.
143. Kingkeow D, McNicholl JM, Maneekarn N, Wongtrakul J, Taechareonkul S, Suriyanon V, et al. Frequencies of IL10 SNP genotypes by multiplex PCR-SSP and their association with viral load and CD4 counts in HIV-1-infected Thais. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2011;29(1):94-101.
144. Prasetyo A, Nurfitria F, Adnan Z, Redhono D, Sari Y, Hudi-yono. The -1082 A allele of the interleukin-10 single nucleotide polymorphism -1082 G/A is associated with hepatitis virus co-infection in Indonesian Javanese HIV patients. *Int J Interferon Cytokine Mediat Res*. 2015;7:1-7.
145. Naicker DD, Wang B, Losina E, Zupkosky J, Bryan S, Reddy S, et al. Association of IL-10-promoter genetic variants with the rate of CD4 T-cell loss, IL-10 plasma levels, and breadth of cytotoxic T-cell lymphocyte response during chronic HIV-1 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(2):294-302.

146. Ben Selma W, Harizi H, Bougmiza I, Hannachi N, Ben Kahla I, Zaieni R, et al. Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA and cell biology*. 2011;30(6):379-87.
147. Li J, Liu Y, Kim T, Min R, Zhang Z. Gene expression variability within and between human populations and implications toward disease susceptibility. *PLoS computational biology*. 2010;6(8).
148. Zhang R, Wu H, Li Y, Huang Z, Yin Z, Yang CX, et al. GWLD: an R package for genome-wide linkage disequilibrium analysis. *G3 (Bethesda, Md)*. 2023;13(9).
149. Ramezani A, Kalantar E, Aghakhani A, Banifazl M, Foroughi M, Hosseini S, et al. Lack of Association between Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphisms with HIV Susceptibility and Progression to AIDS. *Iranian journal of pathology*. 2015;10(2):141-8.
150. Borges Á H, O'Connor JL, Phillips AN, Rönsholt FF, Pett S, Vjecha MJ, et al. Factors Associated With Plasma IL-6 Levels During HIV Infection. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(4):585-95.
151. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86(3):367-77.
152. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382(6593):722-5.
153. Bradbury J. HIV-1-resistant individuals may lack HIV-1 coreceptor. *Lancet (London, England)*. 1996;348(9025):463.
154. Sundermann EE, Hussain MA, Moore DJ, Horvath S, Lin DTS, Kobor MS, et al. Inflammation-related genes are associated with epigenetic aging in HIV. *Journal of neurovirology*. 2019;25(6):853-65.
155. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International immunology*. 2021;33(3):127-48.
156. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(5):878-88.
157. Sokulska M, Kicia M, Wesolowska M, Piesiak P, Kowal A, Lobo ML, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in colonized patients with various pulmonary diseases. *Medical mycology*. 2018;56(7):809-15.
158. Feng B, Mao ZR, Pang K, Zhang SL, Li L. Association of tumor necrosis factor  $\alpha$  -308G/A and interleukin-6 -174G/C gene polymorphism with pneumonia-induced sepsis. *Journal of critical care*. 2015;30(5):920-3.
159. Meenakshi P. Genetic Susceptibility of Inflammatory Genes in Household Contacts of Tuberculosis Patients with Diabetes Mellitus. *J Bacteriol Mycol*. 2020;7(5).
160. Zhang C, He Y, Shan KR, Tan K, Zhang T, Wang CJ, et al. Correlations between polymorphisms in the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A and C-C motif chemokine receptor 5 genes and infection with the hepatitis B virus in three ethnic groups in China. *The Journal of international medical research*. 2018;46(2):739-51.
161. Matos AR, Martins J, Oliveira MLA, Garcia CC, Siqueira MM. Human CCR5 $\Delta$ 32 (rs333) polymorphism has no influence on severity and mortality of influenza A(H1N1)pdm09 infection in Brazilian patients from the post pandemic period. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2019;67:55-9.
162. Foster CB, Lehrnbecher T, Samuels S, Stein S, Mol F, Metcalf JA, et al. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood*. 2000;96(7):2562-7.
163. Singh S, Sharma A, Arora SK. Combination of low producer AA-genotypes in IFN- $\gamma$  and IL-10 genes makes a high risk genetic variant for HIV disease progression. *Cytokine*. 2016;77:135-44.

164. Wei Z, Wenhao S, Yuanyuan M, Yang L, Daming Z, Jiangchun X, et al. A single nucleotide polymorphism in the interferon- $\gamma$  gene (IFNG +874 T/A) is associated with susceptibility to tuberculosis. *Oncotarget*. 2017;8(31):50415-29.

165. Gutlapalli VR, Sykam A, Tenali SP, Suneetha S, Suneetha LM. High levels of plasma interferon gamma and +874T/A gene polymorphism is associated with HIV-TB co-infection. *Human immunology*. 2016;77(12):1264-70.

# **ANEXOS**

## **ANEXO 1.**

### **Estudio del Polimorfismo genético, susceptibilidad a la infección por VIH, progresión a sida en pacientes VIH/sida cubanos.**

#### **Datos demográficos, clínicos, epidemiológicos y de laboratorio**

Código de muestra asignado por IPK: Fecha de toma de muestra:

#### **I. Datos generales y variables sociodemográficas:**

1. Nombre y Apellidos: 2. caso índice: 3. Historia clínica:  
4. Provincia: 5. Municipio: 6. Sexo: 7: Edad: 8. Color de  
la piel: 9 Fecha de diagnóstico de VIH: 10. Edad al diagnóstico:

#### **II. Variables epidemiológicas:**

11. Fecha probable de contagio: 12. Forma de contagio:  
13. Orientación sexual: 14. Forma de detección de la infección:  
15: Pruebas de VIH anteriores a la primera positiva:  
16: Tiempo de pareja expuesta: 17: Cuantos contactos sin protección al mes:  
18: ITS:

#### **III: Variables clínicas y de laboratorio:**

19. CD4 al diagnóstico: Fecha:  
20. CV al diagnóstico: Fecha:  
21. CD4 actual: Fecha: 22. CV actual: Fecha:  
23. Tratamiento antirretroviral: 24. Tipo: 25. Fecha de inicio:  
26. Enfermedades oportunistas: 27. Tipo: 28: Tto:  
29. Ingreso: 30. Fecha:

#### **IV: Otros datos de interés:**

Nombre y firma del especialista que realizó la encuesta:

Fecha de realizada la encuesta:

## **ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **Información a los pacientes.**

Estimado paciente quisiéramos conocer si usted está dispuesto a participar en una Investigación que tiene como Título **“Polimorfismo genético, susceptibilidad a la infección por VIH, progresión a sida en pacientes VIH/sida cubanos.”**

Este consentimiento informado tiene 2 partes:

- Hoja informativa (para compartir información sobre el estudio con usted)
- Certificado de consentimiento (para su firma, si usted elige autorizar)

#### **Parte I: Hoja informativa**

##### **Introducción**

Las características genéticas de los pacientes tienen influencia en la evolución de la infección por VIH, así como en la progresión a sida. Mediante la información presente en nuestros genes podemos ser más o menos susceptibles a la infección por el virus e incluso ser resistentes a este. En Cuba se han realizado pocos estudios que permitan conocer cuáles son las características genéticas que pueden influir en la evolución de la enfermedad, en la población cubana afectada. Esta información pudiera contribuir al conocimiento de la patogenia de la enfermedad en Cuba. Permitirá crear protocolos de manejo de los pacientes para el diagnóstico clínico a nivel individual de la progresión de la enfermedad, la aparición de enfermedades oportunistas y la aparición de las toxicidades del tratamiento antirretroviral. Además, permitirá un análisis más objetivo sobre la capacidad protectora de nuevos candidatos de vacunas que se evalúen, así como mejorar la calidad de vida de los pacientes con VIH/sida.

La información que le estamos brindando tiene como objetivo que usted conozca la importancia de esta investigación y pueda tomar la decisión de participar o no, autorizándonos a la extracción de su sangre para utilizarla en la realización de esta investigación.

Este documento puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, tome su tiempo para realizar las preguntas que necesite relacionadas con el estudio antes de decidir participar.

Al grupo de investigación le gustaría invitarlo a colaborar en este estudio, pero solo si usted comprende todo sobre el mismo.

Se trata de una investigación donde se incluyen pacientes que desean participar voluntariamente.

### **Propósito y descripción de la investigación**

En este estudio se evalúan algunas de las características genéticas de una muestra de la población cubana VIH/sida para analizar cómo influyen en la evolución de la enfermedad.

Toda la información que sigue usted deberá leerla detenidamente y puede consultarla con familiares, amigos cercanos y su médico de familia, si lo considera necesario, antes de decidir su participación en el estudio.

### **¿Qué tipo de pacientes y cuántos participarán?**

En este estudio participarán 100 pacientes, que cumplan con los siguientes criterios de inclusión:

Diagnóstico de VIH/sida con tratamiento antirretroviral.

Personas expuestas no infectadas, parejas de pacientes VIH positivos.

Con actitud psíquica e intelectual adecuada.

Mayores de 19 años de edad.

Criterios de exclusión:

Pacientes en aislamiento.

Pacientes con enfermedades infecciosas agudas en el momento del estudio.

Menores de 19 años de edad.

Usted deberá aceptar de manera voluntaria su participación en el ensayo, firmando este Consentimiento Informado.

**¿Por qué razón usted puede ser retirado del estudio?**

Porque presente alguno de los criterios de exclusión

Porque usted no desee participar más.

**¿En qué consiste la investigación?**

En el estudio se realizará la extracción de 20 cc de sangre a cada persona, a la cual se le realizará una serie de exámenes de laboratorio para conocer algunas características genéticas que influyen en la evolución del VIH/sida, así como, estudios inmunológicos y virológicos.

**¿Conlleva riesgos su participación en el estudio?**

El presente estudio no ocasiona riesgos a su salud, aunque se puede considerar molesto el procedimiento de la extracción de sangre.

**¿Qué beneficios puedo obtener con mi participación en esta investigación?**

Se obtendrá el beneficio de un mayor conocimiento de la enfermedad y el beneficio razonable de ayudar a otros que como Ud. estén en la misma situación ya que este estudio puede influir en las futuras decisiones de tratamiento médico.

**¿Existirá confidencialidad en el manejo de todo lo referente a su persona?**

Toda la información referida a Ud., aunque puede ser revisada por otros investigadores, autoridades hospitalarias y regulatorias estatales o quienes estas designen, no se hará pública en ningún caso. Su identidad no será revelada en ninguna publicación.

**¿Cuáles son sus derechos como participante?**

Ud. debe recibir una copia de este modelo para consultarla cada vez que desee.

Usted está en el derecho de conocer los resultados de la investigación.

**¿A quién puede contactar para información adicional, consultar problemas, etc.?**

Ud. debe dirigirse al hospital de asistencia donde se le está atendiendo. También puede dirigirse a la Dra. Daymé Hernández Requejo, tel. 72553238, correo dayme@ipk.sld.cu.

**Conformidad**

Como he tenido tiempo suficiente para considerar la propuesta de participación en el estudio y suficiente información (oral y escrita) acerca del mismo, he decidido tomar parte en la investigación. Para que así conste, firmo el presente consentimiento junto con el médico que me ha dado las explicaciones y un testigo de que así ha sido.

Nombre del Paciente	Firma	Fecha (día/mes/año)
Nombre del Testigo	Firma	Fecha (día/mes/año)
Nombre del Investigador	Firma	Fecha (día/mes/año)

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA  
SOBRE EL TEMA DE LA TESIS**

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

### PUBLICACIONES

- **D. Hernández Requejo**, Y. de Armas, E. Iglesias, H.M. Díaz, R. Gravier, M.C. Godínez López, L. Fonte, M. Plascencia-Cruz, K. Pacheco-Quijano, J. Palomares, H.R. Pérez-Gómez, A. Plascencia-Hernández, y E.J. Calderón. Polimorfismos de los genes *CCR5*, *IL-6*, *IFN-γ* e *IL-10* en pacientes cubanos con VIH/sida. *Revista Clínica Española* 224 (2024) 96---104
- **Hernández Requejo Dayme**, Franco Lacato Alex Omar, De armas Rodríguez Yaxsier, Iglesias Pérez Enrique. Polimorfismo genético del correceptor CCR5 en pacientes cubanos VIH/sida de la tercera edad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2021;40(4):e1166
- Junco Rodríguez JM, **Hernández Requejo D**, Iglesias Pérez E, Castillo Ferrán N, De Armas Rodríguez Y. Gargarismo para identificar polimorfismo genético del correceptor CCR5. *Rev Cub Investig Bioméd*. 2023; 42:e2047
- Junco Rodríguez JM, **Hernández Requejo D**, Iglesias Pérez E, De Armas Rodríguez Y. Polimorfismo genético del receptor CCRL2 en individuos cubanos con SIDA. *Rev Cub Investig Bioméd*. 2019; 38(3):e242

## PRESENTACIÓN DE RESULTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

- Jornada Científica XXXVI Aniversario CICDC. LISIDA. Enero 2018. Características clínico-genética de los pacientes con VIH ingresados en el Instituto “Pedro Kourí”, septiembre–octubre 2016. Conferencista
- XXII Jornada de médicos residentes de Microbiología, V de egresados y II Jornada de maestrantes y doctorandos del IPK. IPK. Mayo 2018. Polimorfismo genético de los correceptores CCR5, CCRL2 y TNF- $\alpha$  en pacientes VIH/sida cubanos. Conferencista
- Jornada provincial de médicos residentes, maestrantes y doctorandos. Hospital Calixto García. junio 2018. Polimorfismo genético de los correceptores CCR5, CCRL2 y TNF- $\alpha$  en pacientes VIH/sida cubanos. Conferencista. Características clínico-genética de los pacientes con VIH ingresados en el Instituto “Pedro Kourí”, septiembre–octubre 2016. Conferencista. Polimorfismo del factor de necrosis tumoral alfa en los pacientes con VIH/sida ingresados en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, septiembre-octubre 2016. Conferencista
- Whorkshop. Shaping of the Immune system: Nurture or Nature? ICBP Victoria de Girón. Julio 2018. Genetics polymorphisms of receptor CCR5, CCRL2 in Cuban AIDS patients. Poster electrónico
- Taller Nacional de la Red de Laboratorios para el diagnóstico y seguimiento del VIH. LISIDA. octubre 2019. Polimorfismo Genético, Inmunosenescencia y VIH. Conferencista
- SYMPOSIA Advances in Immunology and Therapy of infectious diseases: from Bench to Bed, 2<sup>nd</sup> Edition. Hotel Melia Habana. Octubre 2019.

Genetics polymorphism of receptor CCR5, CCL2 and TNF- $\alpha$  in Cuban AIDS patients. Conferencista

- Taller Nacional de la Red de Laboratorios para el diagnóstico y seguimiento del VIH. Curso: Retos en el tratamiento de pacientes con VIH/sida. Experiencia cubana. IPK noviembre 2019. Polimorfismo Genético, Inmunosenescencia y VIH. Conferencista
- Taller lecciones aprendidas entre dos pandemias Del VIH al SARS-CoV2. Del sida a la Covid-19. LISIDA. Hotel Pakard. Mayo 2022. Polimorfismo genético del correceptor ccr5 y de los genes de citocinas, *IL-6*, *IL-10* e *INF- $\gamma$*  y en pacientes VIH/sida y en expuestos no infectados. Conferencista
- Congreso ALACI. 13th Latin American and Caribbean Immunology and 7<sup>th</sup> Cuban Immunology Society Congresses. Varadero. Junio 2022. Genetics Polymorphism of CCR5, IL-6, IL-10 e INF- $\gamma$  in Cuban HIV/aids patients. Conferencista

## RECONOCIMIENTOS

- Trabajador destacado Sección Sindical de Medios Diagnósticos. Marzo 2019
- Destacada contribución en el proyecto de Marcadores Leucocitarios. Noviembre 2019
- Comité Editorial de la Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas por trabajo de Revisor. Enero 2020
- Por su aporte a la salud pública cubana y en especial a la Ciencia. Enero 2025

## **TESIS TUTOREADAS**

- Tutor de Tesis de Maestría en Infectología y Enfermedades Tropicales. Caracterización clínica, sociodemográfica y del polimorfismo genético en los correceptores CCR5 y CCRL2 en pacientes con VIH ingresados en el Instituto “Pedro Kouri”, septiembre – octubre 2016. Autor: Dr. Juan Mario Junco Rodríguez. IPK. Diciembre 2016.
- Tutor de Tesis de Terminación de especialidad en Inmunología. Determinación del polimorfismo del factor de necrosis tumoral alfa en los pacientes VIH/sida ingresados en el Instituto “Pedro Kouri”, septiembre – octubre 2016. Autora: Dra. Dayanira García Gómez. ICBP Victoria de Girón. Diciembre 2018.
- Tutor de Tesis de Terminación de especialidad en Inmunología. Polimorfismo genético del correceptor CCR5 en pacientes VIH/sida de la tercera edad. Autor: Dr. Alex Omar Franco Lacato. ICBP Victoria de Girón. Septiembre 2019.
- Tutor de Tesis de Terminación de especialidad en Inmunología. Polimorfismo genético del correceptor CCR5 en pacientes con VIH ingresados y personal sanitario en el Instituto “Pedro Kouri”, febrero– marzo 2019. Autor: Dr. Juan Mario Junco Rodríguez. ICBP Victoria de Girón. Diciembre 2019.

## **Proyectos de investigación:**

- Jefe de Proyecto Dra. Daymé Hernández Requejo. Proyecto institucional 19004 Polimorfismo genético, susceptibilidad a la infección por VIH, progresión a sida en pacientes VIH/sida cubanos.2018-2020.

**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DE LA AUTORA  
NO RELACIONADAS CON TEMA DE LA TESIS**

OTRAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DE LA AUTORA NO  
RELACIONADAS CON TEMA DE LA TESIS

- Hernández Requejo D, Pérez Ávila Jorge. Causas de cambio de tratamiento en un grupo de pacientes VIH/sida cubanos. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 2010; 29(2):223-230
- Gil L, Tarinas A, Hernández D, Vega Riverón B, Perez J, Tápanes R. Altered oxidative stress indexes related to disease progression marker in human immunodeficiency virus infected patients with antiretroviral therapy. Revista Biomedicine and aging Pathology, January March 2011 Vol1 No.1 p1-72
- Castaño O, Gil L, Ajete D, Caballero M, Abad Y, Calderón O, Rodríguez W, Hernández D, Tápanes R. Estado redox en pacientes infectados por VIH/sida con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis. Revista Cubana de Farmacia Vol.46 No 4 2012.
- Hernández Requejo D, Abad Y. Linfocitos T CD4 y carga viral en pacientes VIH/sida de la tercera edad que reciben tratamiento antirretroviral. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas Vol. 32 No. 2 2013
- Hernández R, Blanco I, Tarinas A, Pérez D, Hernández D, Alfonso Y, GIL L, Fernández OS. Antiretroviral concentration, redox indexes and progression markers in HIV-infected patient's blood samples follow-up during six month. Rev. Oxidants and Antioxidants in Medical Science. 2014;3(2):99-108

- Hernández R, Blanco I, Tarinas A, Pérez D, Hernández D, Alfonso Y, Gil L, Fernández OS Oxidant/antioxidant status in subjects with HIV infection in different clinical conditions. Rev Biomed Aging Pathol. 2014 Vol.4 (235-242)
- Hernández Requejo D, Pérez Ávila Jorge, Carr Pérez A. Linfocitos T CD4 y carga viral en pacientes con debut de sida que reciben tratamiento antirretroviral. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.2014 Vol. 33 No.3
- Hernández R, Blanco I, Tarinas A, Pérez D, Hernández D, Alfonso Y, Gil L, Fernández OS Redox indexes and progression markers in HIV-infected patients treated with three different HAART combinations. Oxidants and Antioxidants in Medical Science. 2014 Vol.3 No.3
- Hernández Requejo D, Pérez Ávila Jorge, Carr Pérez A. Enfermedades oportunistas en pacientes VIH/sida con debut de sida que reciben tratamiento antirretroviral. Rev Cubana de Investigaciones Biomédicas 2015; 34(3)
- Gil L, Cálas V, Hernández R, Hernández D, González S, Filgueira I, Casamayor Z, Guevara M, Pérez j. Protocol of Determining the Effect of Vimang® and Spirel® Supplementation in Aids Patients with Delayed Diagnosis of HIV: An Open Randomized Controlled Trial. J AIDS Clin Res 2016, 7:5
- Gil L, Duque M, Calás V, Gravier R, Jiménez N, Bermúdez Y, Hernández D, Gonzalez D. Multivariate discriminant analysis of redox and progression indexes in Cuban AIDS patients with Kaposi sarcoma. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*; 2017, 6(1): DOI: 10.5455/oams.210317.or.102

- Gil L, Bareala A, Pomier O, Gravier R, Bermúdez Y, Hernández D, Rosell T, Hernández MC. Biomarkers of Redox Balance in Tuberculosis-Human Immunodeficiency Virus Co-Infected Cuban Patients. *ARC Journal of AIDS*; 2017, 2 (1):1-11
- Gil L, Fonseca C, Tarinas A, Gravier R, Bermúdez Y, Hernández D, León R, Pérez J. Cuantificación de antirretrovirales en sangre y análisis de efectividad en pacientes masculinos con VIH/sida tratados con AZT/3TC/NVP. Trabajos científicos presentados en el evento de masculinidades del año 2016, Editorial: Lazo Adentro 2017. ISBN:978-959-283-168-1
- Ivón González Blanco, Teresa Rosell Guerra, Rosario Gravier Hernández, Daniel Pérez Correa, Daymé Hernández Requejo, Olga Sonia León Fernández, L Jorge Pérez Ávila, Lizette Gil del Valle. Hematologic, Biochemical, Virologic and Immunological Status of Cuban HIV Patients Treated with Four Generic Antiretroviral Combinations during Two Years. *SciFed J AIDS HIV Res* 2018, 2(1): 30-40
- Gil-del Valle L, Acosta Suarez MA, Rabeiro-Martínez CL, Gravier-Hernández R, Hernández González-Abreu MC, Bermúdez-Alfonso Y, Rosa-Font M, Campos-Díaz J, Hernández-Requejo D, Martínez-Sánchez G, Weiser MT. Facial biostimulation with PRP activated with ozone resound on cellular redox balance, improves lipoatrophy and quality of life in HIV patients. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 7 (4), 273-287, 2019 ISSN 0719-4250
- Gil L, Calas V, Gravier R, Reyes A, Bermudez Y Rosell T, Hernández D, Duque M, Campos J, Cárdenas A, and cols. Antioxidant supplementation

effects in aids patients with delayed diagnosis of HIV: an open randomized controlled trial Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research 2019, 7: S20-22 ISSN 0719-425

- Iglesias E, Hernández-Requejo D, Godínez-López MC, Vazquez-Arteaga A. Strong impact of the side scatter channel performance in the volumetric flow cytometer CD4+ T cell counts using the CD4% easy count kit. Biotecnol Apl. 2019;36(1):1301-6
- Rosario Gravier-Hernández, Lizette Gil-del Valle, Lindunka Valdes-Alonso, Nadiecha Hernández-Ayala, Yusimit Bermúdez-Alfonso, Daymé Hernández-Requejo, Teresa Rosell-Guerra, Maria C. Hernández-González-Abreu. Oxidative stress in hepatitis C virus–human immunodeficiency virus co-infected patients. Journal Annals of Hepatology 19 (2020) 92–98