



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRIA
“Dr. Silvestre Frenk Freund”
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

TÍTULO:

“MEDICIÓN DE CITOCINAS EN SUERO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS QUE VIVEN CON VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL”

**TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN
INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA**

TESISTA:

DRA. MARIANA GUADALUPE SÁMANO AVIÑA
Residente de segundo año de Infectología Pediátrica UMAE HP CMN SXXI
e-mail: aguyen13@hotmail.com

TUTOR:

DR. JOSE GUILLERMO VÁZQUEZ ROSALES
Pediatra infectólogo jefe de servicio Infectología Pediátrica UMAE HP CMN SXXI
e-mail: vazguill@aol.com

COTUTORES:

DR. DANIEL OCTAVIO PACHECO ROSAS
Pediatra infectólogo adscrito al servicio de Infectología UMAE HP CMN SXXI
e-mail: drdanielpacheco@gmail.com

Q.F.B. LETICIA DAMASIO SANTANA
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas
UMAE Hospital Especialidades, CMN SXXI
e-mail: ldamasiosantana@yahoo.com.mx



Universidad Nacional
Autónoma de México

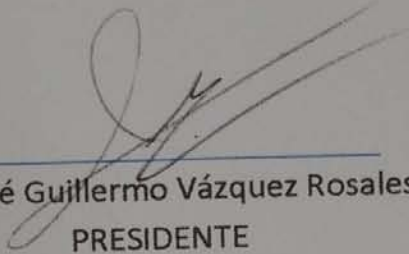


UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso


DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

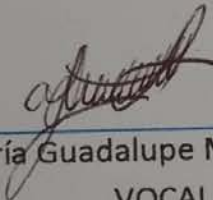
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



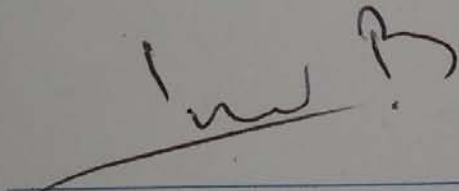
Dr. José Guillermo Vázquez Rosales
PRESIDENTE



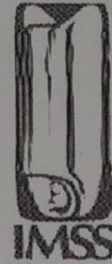
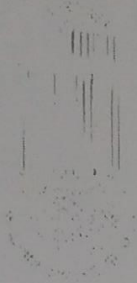
Dra. Julia Rocío Herrera Márquez
SECRETARIO



Dra. María Guadalupe Miranda Novales
VOCAL



Dr. Leoncio Peregrino Bejarano
VOCAL



Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud **3603** con número de registro **13 CI 09 015 192** ante COFEPRIS

HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, D.F. SUR

FECHA **23/05/2016**

M.C. JOSÉ GUILLERMO VÁZQUEZ ROSALES

PRESENTE

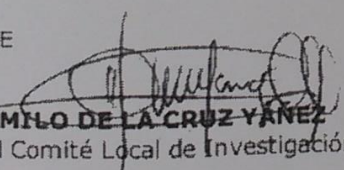
Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

MEDICIÓN DE CITOCINAS EN SUERO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS QUE VIVEN CON VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL"

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **AUTORIZADO**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2016-3603-35

ATENTAMENTE


DR.(A). HÉRMILO DE LA CRUZ YÁNEZ
Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3603

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
JUSTIFICACION.....	10
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	12
METODOLOGIA.....	13
VARIABLES.....	14
DESCRIPCION DEL ESTUDIO.....	16
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	23
CRONOGRAMA.....	24
BIBLIOGRAFIA.....	25
ANEXOS.....	28

RESUMEN

Título.- Medición de citocinas en suero de pacientes pediátricos que viven con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y su relación con la respuesta al tratamiento antirretroviral.

Introducción.- La hiperreactividad crónica del sistema inmunológico reflejada por una hipersecreción de citocinas proinflamatorias incluyendo IL-6, FNT α , e IL-1 favorece la replicación y propagación del virus del VIH. Por otro lado, el descenso en la producción de citocinas como lo es IL-2 o IL-12 en respuesta a antígenos específicos, juega un papel importante en el establecimiento de la deficiencia inmunológica. En pediatría esta actividad inmunológica se ha asociado con progresión de la enfermedad, sin embargo no se cuenta con información suficiente al respecto, además el sistema inmune en algunos niños se encuentra en desarrollo, lo que pudiera producir un comportamiento diferente al de los adultos.

Objetivo.- Cuantificar los niveles séricos de IL-2, IL-6, IL-10 y FNT α en pacientes pediátricos con infección por VIH con y sin falla al tratamiento antirretroviral?

Metodología.- Se llevó a cabo un estudio transversal descriptivo en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI “Dr. Silvestre Frenk Freund” del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se realizó medición de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 y FNT α) mediante técnica de ELISA.

Se incluyeron a los niños con VIH con tratamiento antirretroviral efectivo y con falla al tratamiento que no tenían proceso infeccioso agudo, se tomaron muestras séricas y se resguardaron hasta su procesamiento. Se consideraron controles a niños sin VIH con solicitud de prequirúrgicos en el laboratorio. La asignación fue consecutiva.

Análisis estadístico.- Se empleó estadística descriptiva para variables cuantitativas mediante medidas de tendencia central (medias y medianas) y frecuencias y porcentajes para variables cualitativas.

Resultados.- En el grupo de pacientes con infección por VIH se incluyeron 26 pacientes, se realizaron 2 subgrupos, en el primero los que no tuvieron falla al tratamiento antirretroviral (n=15) y en el segundo los que reunieron criterios de falla (n=11). En grupo control se incluyeron 13 pacientes sin VIH. En el grupo sin falla se reportaron niveles más elevados de IL-2, IL-10 y FNT α en comparación con pacientes sin falla al tratamiento, y solo IL-6 se comportó a la inversa (mediana de 6 vs 13pg/mL. Los niños sin infección por VIH presentaron una mediana menor que los pacientes con VIH con y sin falla al tratamiento al comparar niveles séricos de IL-6 y FNT α .

Conclusiones.- Los niveles séricos de citocinas (IL-6 y FNT α) están más elevados en los pacientes que viven con VIH en comparación con niños sin la enfermedad y los niveles séricos de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 y FNT α) entre los niños con o sin falla al tratamiento antirretroviral son similares

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 (VIH-1) y su estadio final, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es el mayor desafío de salud pública de los tiempos modernos, el SIDA se identificó por primera vez en Estados Unidos en 1981, tras comunicarse infecciones oportunistas inexplicadas, como la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* y el sarcoma de Kaposi en hombres que tenían sexo con hombres (HSH), manifestaciones que asociaron con pérdida de CD4+ e inmunosupresión, y su probable causa infecciosa. Se propuso la existencia de un nuevo retrovirus humano como agente causal¹.

Un poco antes de esta asociación, se realizó la descripción de la transcriptasa inversa y el descubrimiento de los virus linfotrópicos T humanos tipos I y II (HTLV-1 y HTLV-II), los primeros 2 retrovirus humanos conocidos en 1979 y 1980².

El descubrimiento de la interleucina 2 (IL-2), o factor de crecimiento de linfocitos T, permitió el cultivo de los linfocitos T sanguíneos en los casos iniciales de SIDA y hacia 1984, la detección, aislamiento y propagación del VIH-1 -el tercer retrovirus humano-³, permitió el desarrollo de una prueba diagnóstica, un conocimiento cada vez más detallado de la biología molecular del virus y lo más destacado, la introducción de una base racional para el tratamiento antiviral⁴.

Tras un periodo prolongado de investigación, el surgimiento de nuevas combinaciones terapéuticas, junto con la capacidad de medir ARN viral circulante y la susceptibilidad a los fármacos, han permitido una drástica mejoría de la evolución clínica de los pacientes. Los primeros antirretrovirales (ARV) en estar disponibles, fueron los inhibidores de la enzima transcriptasa reversa análogos de nucleósidos, posteriormente los no análogos de nucleósidos y más recientemente de los inhibidores de proteasa. Más recientemente se cuenta con inhibidores de la fusión del virus con las células, de la entrada del virus en la célula huésped y de la integración del ADN viral en el ADN cromosómico del huésped. La investigación del VIH ha demostrado que es posible administrar una terapia antirretroviral racional, individualizada y efectiva, sin embargo aún falta información en relación a la prevención postexposición, tratamiento en pacientes multitratados, vacunas para prevenir infección por VIH y reconstitución inmunitaria⁵.

Gran parte del esfuerzo en el estudio de la patogénesis del VIH, se ha dirigido hacia el sistema inmune, dentro del cual se ha descrito en los últimos años un desequilibrio en la red de citocinas, lo cual induce una disfunción inmunológica. Las citocinas constituyen una red redundante y pleiotrópica molecular que permiten una comunicación entre células independientes tanto parácrinas como autócrinas. Ellas son utilizadas para dividir en 2 subgrupos con diferentes caminos de regulación mediante linfocitos TCD4 o CD8, conocidos como células Th1/Th2⁶.

Durante la década de 1980 se profundizó en el conocimiento de la funcionalidad de los linfocitos T y se identificaron 2 tipos de respuestas colaboradoras: la Th1 (inmunidad celular o retardada) y la Th2 (inmunidad humoral). Las Th1 son altamente efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares y las Th2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos. Se denominó Th1 a los linfocitos secretores de interferón γ (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2), y se denominó Th2 a los linfocitos que liberan IL-4 e IL-13. La diferenciación en Th1 o Th2 se determina en función de las citocinas que están presentes y que funcionan como terceras señales durante el proceso de activación. La IL-12 promueve la transformación en células Th1 y la IL-4 en células Th2⁷ (Figura 1), y ambas vías presentan interacciones para su regulación como puede observarse en la

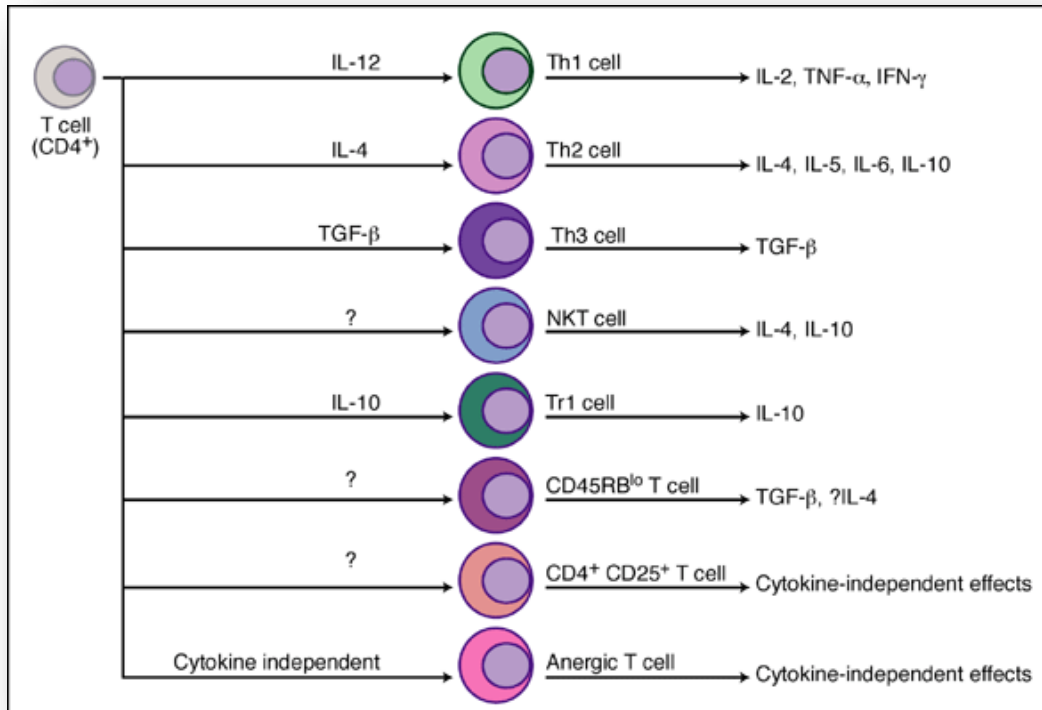


Figura 2.

Figura 1.- El papel de las citocinas en la inducción y función de linfocitos T



Figura 2.- Modelo que esquematiza las probables interacciones entre la respuesta Th1 y Th2

En pacientes adultos con infección por virus de inmunodeficiencia humana, las citocinas actúan como inductor de la respuesta predominantemente de tipo 1 (IL-2 e INF γ); y de la respuesta tipo 2 (IL-4 e IL 10), citocinas que interpretan progresión de la enfermedad⁸.

Esta alteración del estado inflamatorio podría relacionarse con la replicación viral persistente del VIH en reservorios anatómicos o funcionales, pero también se ha implicado al fenómeno de la traslocación microbiana^{9,10}, consistente en el paso de productos bacterianos desde la luz intestinal a los ganglios linfáticos y al torrente sanguíneo debido a la disminución del tejido linfoide de la mucosa intestinal, produciéndose un estado crónico de inflamación¹¹.

La hiperreactividad crónica del sistema inmunológico reflejada por una hipersecreción de citocinas proinflamatorias incluyendo IL-6, FNT α , e IL-1 favorecen la replicación y propagación del virus. Por otro lado, el descenso en la producción de citocinas como lo es IL-2 o IL-12 en respuesta a antígenos específicos, juega un papel importante en el establecimiento de deficiencia inmune.

Reus y colaboradores determinaron mediante un estudio transversal observacional en 81 pacientes adultos con VIH, los factores asociados a una mayor actividad inflamatoria concluyendo que los mayores valores de marcadores inflamatorios (IL-6 y FNT α) se observan en aquellos casos con traslocación bacteriana y antecedentes de enfermedad cardiovascular¹².

Se ha observado que el inicio del tratamiento antirretroviral (TAR) induce una disminución de los marcadores de traslocación y de inflamación paralela a la disminución de la carga viral plasmática (CV) del VIH. Se ha hecho evidente que los pacientes con viremia por debajo de 20 copias/ml, muestran tener menor frecuencia de traslocación que aquellos con viremias bajas pero detectables¹³.

Heijligenberg y col, realizaron la medición de FNT α , IL-10, IL-6 e INF α en pacientes sanos (n=6) y pacientes con SIDA clínicamente estables (n = 6). La concentración plasmática de FNT α fue más alta en pacientes con SIDA con una media de 24 pg/ml (intervalo de 17-31 pg/ml) en comparación con los controles 8pg/ml (intervalo de 1-16 pg/ml). La concentración plasmática de IL-10 no tuvo diferencia entre ambos grupos y en relación con INF α no fue detectable ninguna diferencia entre las muestras¹⁴. La IL 10, se ha visto implicada en infección por VIH -1, y su patogénesis. Es una citocina producida por células Th2 y ocasionalmente por Linfocitos B activados, células Th1, macrófagos activados y células no hematopoyéticas¹⁵. Sus niveles son más elevados en pacientes con VIH con niveles bajos de CD4+ y con cargas virales elevadas en comparación con pacientes con infección por VIH reciente; por otra parte, pacientes determinados como progresores lentos tienen niveles más bajos de IL-10 en comparación con pacientes sin infección por VIH¹⁶.

Mayores concentraciones de IL-10 parece limitar la replicación de VIH-1 en vivo, al inhibir la replicación de macrófagos/monocitos y células T, habiéndose demostrado que la administración de IL-10 produce un descenso del número de viriones de VIH-1 en circulación¹⁵.

El estudio SMART demostró que niveles basales elevados de PCR, IL-6 y dímero D, tuvieron asociación con incremento en la mortalidad, por lo que estos biomarcadores permanecen como predictores de mortalidad aun cuando se cuenta con niveles elevados de CD4+^{17,18}.

Mc Donald y col., analizaron de manera retrospectiva el plasma de 32 pacientes adultos con infección por VIH quienes murieron en los primeros 3 años de haber iniciado el tratamiento antirretroviral en Gaborone, Botswana y 64 paciente con infección por VIH que sobrevivieron más de 3 años, y observaron que por cada incremento de 1 pg/ml de IL-6 presentaban 1.3 veces mayor probabilidad de morir¹⁹.

En niños con infección por VIH transmitido por vía vertical⁸, se realizó medición de transcripción y

de la producción de citocinas en progresores rápidos, serorrevertores y niños con exposición a VIH in útero. La producción de citocinas tipo 1 y 2 fue medida en cultivo de células mononucleares en sangre periférica, en 11 progresores rápidos, 8 serorrevertores y 25 expuestos. En los cultivos bajo condiciones basales, la producción de IL-2, INF γ , IL4 e IL-10 fue similar, independientemente de la etapa de la infección o enfermedad. Sin embargo bajo condiciones de estimulación con fitohemaglutinina más PMA (forbol 12 miristato, 13 acetato), se observó que los cultivos correspondientes a niños progresores rápidos presentaron menor producción de IL-2 ($p < 0.01$), e IFN γ ($p < 0.02$) en comparación con el grupo serorrevertores e incluso significativamente menor expresión del mRNA de IFN γ ($p < 0.01$).

Los cultivos de los niños del grupo progresores rápidos expresaron niveles más elevados de IL-4 que los niños expuestos ($p < 0.03$) y no hubo diferencias en la producción de IL-10 en los 3 grupos evaluados. Los resultados en esta población pediátrica demostraron que una deficiencia en la producción de citocinas tipo 1 y un exceso de transcripción de citocinas tipo 2 (IL-4) correlaciona con progresión de la enfermedad. Estudios adicionales con mayor número de población es necesario para probar posteriormente la hipótesis en relación al papel de las citocinas tipo 1 y 2 en niños infectados por VIH⁸.

En el estudio de Johann y col., los niveles de IL-2 en suero obtenido de niños con infección por VIH aparentemente sin patología agregada, fueron asociados a progresión de la inmunosupresión. IL-2 fue detectada en el suero de 28 de 45 niños con VIH (nivel > 8.7 pg/mL) de los cuales el 42% (19 de 45 niños) tuvieron nivel de > 39 pg/mL. Los niños sin evidencia de inmunosupresión y aquellos con inmunosupresión severa presentaron niveles estadísticamente más bajos de IL-2 (media de 134.4 pg/mL) y (18.2 pg/mL) respectivamente, en comparación con aquellos con inmunosupresión moderada (450.5 pg/ml). En aquellos niños con quienes la inmunosupresión fue evidente, el descenso de valor sérico de IL-2 correlacionó con la depleción de linfocitos CD4, sin embargo en los niños sin inmunosupresión o inmunosupresión moderada presentaron correlación inversa entre niveles de CD4 y de IL-2⁵.

Algunos autores, como Navarro y col, analizaron los valores de FNT α en 26 niños sin infección por VIH, y 14 niños con VIH de transmisión vertical antes del inicio de tratamiento antirretroviral y nuevamente un año después de tener tratamiento antirretroviral efectivo. En este estudio observaron que a la entrada en el estudio, la producción FNT α fue más baja en el grupo VIH⁺ (586 ± 240 pg/mL) que en el grupo control (1729 ± 324 pg/mL). Un año después en HAART, la producción de FNT α (1497 ± 310 pg/mL) se recuperó hasta los valores del grupo control, siendo el incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$)²⁰.

Si bien, la terapia antirretroviral efectiva ha mejorado de manera dramática la expectativa de vida de las personas con VIH; los pacientes con tratamiento antirretroviral efectivo prolongado, tienen un grado de inflamación y activación de sistema inmunitario²¹, lo que se ha asociado de manera estrecha a un incremento en el riesgo cardiovascular²², osteoporosis²³, anemia²⁴ y fragilidad en comparación con pacientes sin SIDA.

Múltiples factores parecen contribuir con la inflamación crónica y activación inmune en pacientes infectados con el VIH en tratamiento antirretroviral, sin embargo el papel que juega cada uno de manera independiente es difícil de discernir²⁵.

Se han intentado diversas maniobras para disminuir el estado inflamatorio persistente, siendo la administración del probiótico *Saccharomyces boulardii* por 12 semanas, lo que produjo una disminución significativa en los niveles séricos de IL-6 y proteínas de unión a lipopolisacáridos²⁶. Además en pacientes con VIH en tratamiento antirretroviral con carga viral indetectable, se ha observado que con tratamiento con vitamina D, omega 3 y estatinas se disminuye la prevalencia de la

expresión de CD38 en las células T CD8⁺²⁸, se disminuyen los niveles de IL 6 y FNT α , así como niveles de lipoproteína asociada a fosfolipasa A2, debido a la acción de cada uno de los fármacos de manera respectiva²⁸.

El estilo de vida, incluyendo ejercicio, también se ha relacionado con disminución de los biomarcadores de inflamación²⁹.

Distintos estudios en adultos, han establecido a los diferentes biomarcadores de inflamación (IL-6, FNT α , proteína C reactiva y dímero D) como factores de mal pronóstico; como mortalidad, la mala recuperación de los linfocitos CD4⁺, progresión de la hepatitis crónica C o la aparición de morbilidad como neoplasias no definitorias de sida, aterosclerosis, insuficiencia renal, osteoporosis o deterioro neurocognitivo³⁰.

Algunas citocinas han demostrado su uso potencial como agentes terapéuticos en síndrome de inmunodeficiencia inducido por VIH, como lo es el caso de la IL-2. El sustancial grado de reconstitución inmune alcanzada en pacientes infectados por VIH durante la administración de IL-2 en asociación con terapia antirretroviral altamente activa (HAART), apoya el desarrollo racional de una nueva estrategia de inmunointervención enfocada a la red de citocinas³¹.

JUSTIFICACIÓN

La UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, es un hospital de 3er nivel que recibe pacientes de los estados de Guerrero, Querétaro, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Morelos y parte de Veracruz, el cual cuenta con una clínica de VIH en donde se les da seguimiento a los niños con infección de virus de inmunodeficiencia humana en su mayoría por transmisión perinatal. Se ha demostrado en población adulta que a pesar de manejo antirretroviral efectivo, con cargas virales indetectables, se mantiene un estado inflamatorio crónico y de activación inmunitaria que conlleva a efectos no deseados como lo son riesgos cardiovasculares, anemia, osteoporosis, así como mala recuperación de los linfocitos CD4+, progresión de la hepatitis crónica C o la aparición de morbilidad como neoplasias no defensorias de sida, aterosclerosis, insuficiencia renal, deterioro neurocognitivo e incluso incremento en la mortalidad.

En pediatría, esta actividad inmunológica se ha asociado con progresión de la enfermedad, sin embargo no se cuenta con información suficiente al respecto, además el sistema inmune en algunos niños se encuentra en desarrollo, lo que pudiera producir un comportamiento diferente al de los adultos. Con este estudio se pretende determinar el estado de inflamación de los pacientes pediátricos con VIH mediante la determinación de IL-2, IL-6, IL-10 y FNT α , comparándolo con niños sanos. La información que se obtenga a partir de este estudio puede ser el cimiento para estudios posteriores.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

1.- ¿Cuáles son los niveles séricos de IL-2, IL-6, IL-10 y FNT α en pacientes pediátricos con infección por VIH con y sin falla al tratamiento antirretroviral?

OBJETIVOS

1.- Cuantificar los niveles séricos de IL-2, IL-6, IL-10 y FNT α en pacientes pediátricos con infección por VIH con y sin falla al tratamiento antirretroviral?

METODOLOGÍA.-

Diseño de estudio.

Estudio transversal descriptivo

Lugar de realización del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI “ Dr. Silvestre Frenk Freund” del Instituto Mexicano del Seguro Social, el cual es un hospital de tercer nivel, de concentración de pacientes procedentes de hospitales del sur de la Ciudad de México, del estado de Chiapas, Morelos, Guerrero y Querétaro, entre otros.

Criterios de inclusión.

Pacientes con diagnóstico de infección por virus de inmunodeficiencia humana por transmisión vertical atendidos en la clínica de VIH en esta unidad.

Pacientes con información completa en el expediente clínico

Pacientes que aceptaron la toma de la muestra sérica.

Criterios de exclusión.

Pacientes que presentaban proceso infeccioso agudo en el momento de la toma de muestra sanguínea

Pacientes con aplicación de vacuna en los últimos 30 días.

Criterios de eliminación.

En quienes hubo pérdida de la muestra sanguínea o resultado indeterminado

VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable
Género	Se refiere al conjunto de características biológicas que definen al espectro de humanos como mujeres y hombres* *(Asociación Mexicana para la Salud Sexual)	Se dividió en femenino y masculino con base en la información obtenida del expediente	Variable cualitativa dicotómica <ul style="list-style-type: none"> • Femenino • Masculino
Edad	Periodo de tiempo que ha transcurrido desde el momento del nacimiento* *(Real Academia Española)	Cantidad en años cumplidos al momento del ingreso al estudio, la información se obtuvo del expediente	Variable cuantitativa continua <ul style="list-style-type: none"> • Años
Estado nutricional	El estado de crecimiento o el nivel de micronutrientes de un individuo.(UNICEF) Es la condición física que presenta una persona, como resultado del balance entre sus necesidades e ingesta de energía y nutrientes.	Se tomó el peso en kilogramos y la talla en centímetros el mismo día de la toma de la muestra sérica y se obtuvo el índice peso/talla en menores de 6 años y el IMC para niños de 6 años en adelante y se percentiló con base en las tablas correspondientes para sexo y edad (www.who.int/childgrowth/standards)	Variable cualitativa policotómica <ul style="list-style-type: none"> • Desnutrición • Peso adecuado • Sobrepeso • Obesidad
Interleucina 2, 6 y 10 y FNT α	Son proteínas que intervienen en la diferenciación y maduración de las células del sistema inmune, contribuyendo a la comunicación entre ellas y, en algunos casos, ejercen funciones efectoras directas * (Abbas et al.)	Medición en suero mediante la técnica de ELISA en los pacientes incluidos y se reportará en pg/ml. (ver anexo 3)	Cuantitativa continua <ul style="list-style-type: none"> • Picogramos /mililitro
Cuenta de CD4	Células que constituyen una parte esencial del sistema inmunitario, cuya función principal es la de activar al propio sistema	Medición en sangre de linfocitos CD4 en los pacientes con diagnóstico de VIH, reportándose en número de células /mm ³ .	Cuantitativa continua <ul style="list-style-type: none"> • Células /mm³

	alertándole de la presencia de patógenos o de una replicación errónea de células humanas.		
Carga viral	Es la cuantificación de VIH-1 que se encuentra en el plasma o cuantificación del RNA vírico que existe en una muestra. El método empleado consiste en evaluar reacción en cadena de la polimerasa.	Se consultó en el expediente el reporte obtenido en el mismo momento de la toma de sangre por venopunción, estudio que se realiza de manera rutinaria para evaluar tratamiento antirretroviral y se expresó en copias /mL.	Cuantitativa discreta <ul style="list-style-type: none"> Número de copias/mL
Tiempo de diagnóstico de VIH	Periodo de tiempo que ha transcurrido desde el diagnóstico de infección por virus de inmunodeficiencia humana	Se revisó el expediente y se consideró el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de infección por virus de inmunodeficiencia humana y el momento del inicio de este estudio, se expresará en meses.	Cuantitativa discreta <ul style="list-style-type: none"> Meses
Falla al tratamiento	<p>Falla clínica.- La presencia o recurrencia de complicación relacionada a infección por VIH posterior a 3 meses de tratamiento antirretroviral (excepto SIRI).</p> <p>Falla virológica.-La imposibilidad de mantener supresión de la carga viral de RNA de VIH <40 copias/mL.</p> <p>Falla inmunológica.-Incapacidad para mantener o incrementar el nivel de células CD4 en valores normales de acuerdo a la edad específica.</p> <p>>1 año 1500 CD4 1-6 años >1000 CD4 >6 años 500 CD4</p> <p>*http://aidsinfo.nih.gov/gu</p>	Se realizó interrogatorio y exploración física para descartar procesos infecciosos agregados o alguna alteración clínica, y se realizó medición de carga viral y cuenta de CD4+ al mismo tiempo de la recolección de la muestra para medición de interleucinas, y se clasificó con falla al tratamiento o sin falla al tratamiento. Con base en los datos obtenidos en interrogatorio, exploración física y estudios de laboratorio que incluyen la determinación de cuenta de CD4 y determinación de carga viral, se consideró falla al tratamiento antirretroviral cuando contó con al menos 1 de los 3 tipos de falla (clínica, virológica o inmunológica)	Cualitativa dicotómica <ul style="list-style-type: none"> CON FALLA SIN FALLA

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Se explicó a los padres de los niños con infección de virus de inmunodeficiencia humana que se encuentran en seguimiento en la clínica de VIH la utilidad del protocolo de estudio, y se solicitó consentimiento informado en forma verbal para la toma de muestra sérica.

Se realizó la toma de la muestra en la misma venopunción que la requerida para la toma de otras muestras séricas que se requieren para el seguimiento de su enfermedad, se descartó proceso infeccioso agudo mediante interrogatorio y exploración física.

Para establecer un valor basal de interleucinas sérico con el cual comparar el obtenido en los niños que viven con VIH se decidió recolectar suero de pacientes sin diagnóstico de infección por VIH, obteniéndose de niños con programación de estudios prequirúrgicos, que no presentaran proceso infeccioso agudo, previa autorización por los padres.

El suero se recolectó por la tesista, se almacenó a -20°C hasta su procesamiento; la medición de las citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 y FNT α) se hizo mediante técnica de ELISA empleando el set OptEIA®. La técnica y especificaciones del proceso se describen en el anexo 2. El cual se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas en la UMAE Hospital Especialidades, CMN SXXI.

Se revisaron los expedientes clínicos y se obtuvieron los datos generales y lo relativo a la infección y tratamiento por VIH en la hoja de recolección elaborada exprofeso (Anexo 1). Se realizó una base de datos con la información obtenida.

Análisis estadístico.

Se empleó estadística descriptiva para variables cuantitativas mediante medidas de tendencia central (medias y medianas) y frecuencias y porcentajes para variables cualitativas.

Aspectos éticos

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con los lineamientos de Helsinki

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación con riesgo mínimo, se realizó previo a consentimiento informado verbal.

Se solicitó aprobación por el Comité local de Investigación.

Financiamiento

Los investigadores financiaron la compra de los reactivos para la determinación de citocinas y el resto se llevó a cabo con recursos de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas en la UMAE Hospital Especialidades, CMN SXXI.

RESULTADOS

En el grupo de pacientes con infección por VIH se incluyeron 26 pacientes de los cuales 57% (n=15) correspondieron al género masculino, la media de edad fue de 9 años (2-17años), y el estado nutricional fue adecuado en el 85% de los casos (n=22), el resto (15%) se catalogaron con obesidad. De la muestra total se realizaron 2 subgrupos, en el primero se incluyeron todos aquellos pacientes que no tuvieron falla al tratamiento antirretroviral (clínica, virológica y/o inmunológica), correspondiendo a 15 pacientes, y en el segundo grupo, se incluyeron a 11 pacientes que reunieron criterios de falla. Se incluyeron 13 pacientes sin infección por VIH, con una media de edad de 8 años (1-16 años), y el 61% correspondieron a género masculino, todos ellos con adecuado estado nutricional.

En la tabla 1 se describen las características generales en los diferentes grupos.

Tabla 1.- Características generales de los pacientes con y sin falla al tratamiento antirretroviral

	SIN FALLA (n=15)	CON FALLA (n=11)	TOTAL CON VIH (n=26)	SIN VIH (n=13)
Género masculino (n, %)	7 (46%)	8 (72%)	15 (57%)	8 (61.5%)
Edad Media (mínima, máxima)	10 (3-17)	7 (2-16)	9 (2-17)	8 (1-16)
Estado nutricional adecuado** (n, %)	11 (73%)	11 (100%)	22 (85%)	13 (100%)
Obesidad ** (n, %)	4 (17%)	0 (0%)	4 (15%)	0 (0%)
Tiempo de recibir tratamiento ARV* Meses, mínimo, maxmo	Media: 112 Intervalo (50-192)	Media: 66.4 Intervalo (6-180)	Media: 93 Intervalo (6-192)	NA***

*ARV.- Antirretroviral

** < 6 años P/T y > 6 años IMC

*** NA= No aplica

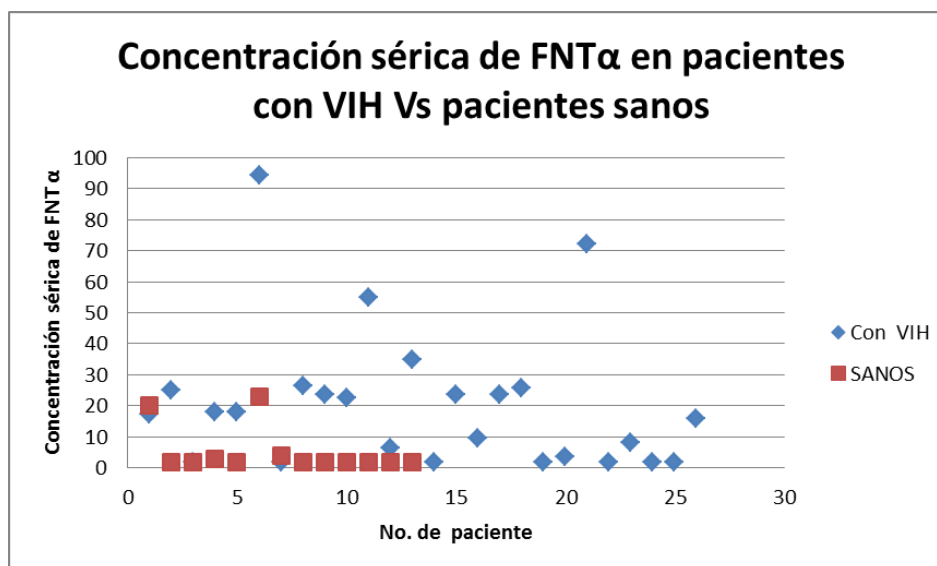
En la siguiente tabla (Tabla 2) se resumen en medianas y rangos las concentraciones séricas de citocinas en cada uno de los 3 grupos, (Con VIH con y sin falla al tratamiento y niños sin VIH), en donde se puede observar que los pacientes sin falla al tratamiento presentaron concentraciones séricas mayores de IL-2, IL-6 y FNT α en comparación con los pacientes del grupo con falla, teniendo un comportamiento contrario al comparar los niveles séricos de IL-6 entre estos 2 grupos (6 vs 13 pg/mL). El grupo sin infección por VIH presentó niveles séricos de IL-6 y FNT α más bajos que los pacientes con VIH ya sea con o sin falla al tratamiento antirretroviral.

Tabla 2.- Concentración sérica de interleucinas en pacientes pediátricos con y sin falla al tratamiento antirretroviral

	SIN FALLA (n=15) Mediana (rango)	CON FALLA (n=11) Mediana (rango)	SIN VIH (n=13) Mediana (rango)
IL-2 (pg/mL)	27 (1-155)	1 (1-114)	NA*
IL -6(pg/mL)	6 (2-171)	13 (2-70)	2 (2-216)
FNTα (pg/mL)	23 (2-94)	8 (2-72)	2 (2-23)
IL-10 (pg/mL)	4 (1-86)	2 (1-10)	NA*

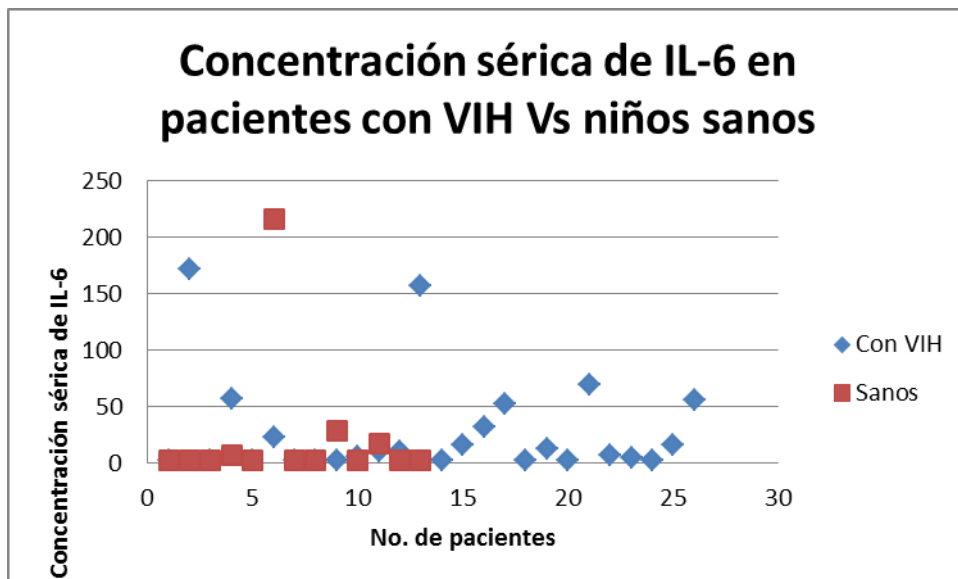
* NA: No Aplica

La proporción de niños que viven con VIH que tuvieron valores de IL-6 mayor al percentil 90 (> 28pg/mL) del grupo de pacientes sin infección por VIH, fue de 26.9% (7/26 pacientes). En relación a FNT α se observaron 11 pacientes con valores séricos mayores al percentil 90 >20pg/mL de los sujetos sin infección (42.3%). (Gráficas 1 y 2)



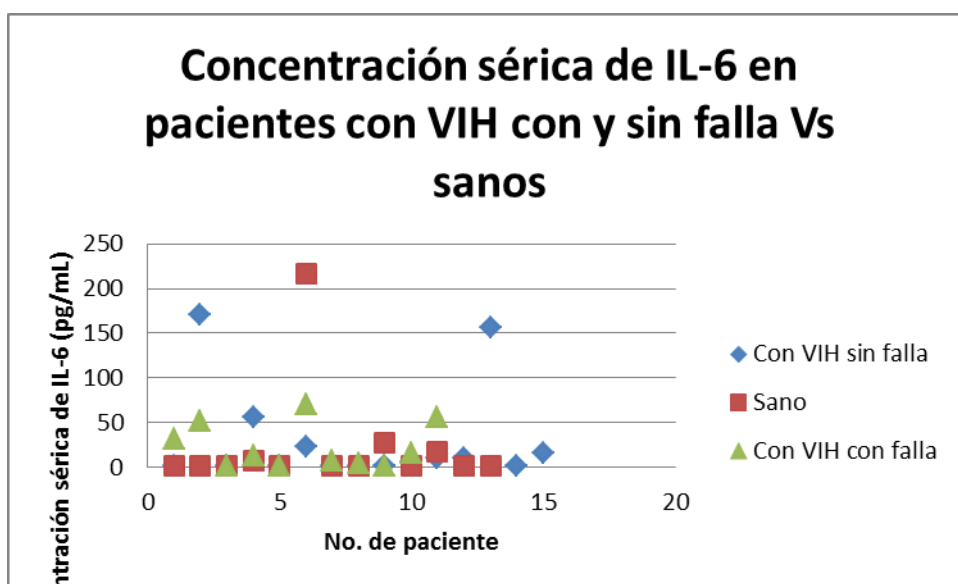
Gráfica 1.- Concentración sérica de FNT α en pacientes con infección por VIH en comparación con pacientes

sin VIH



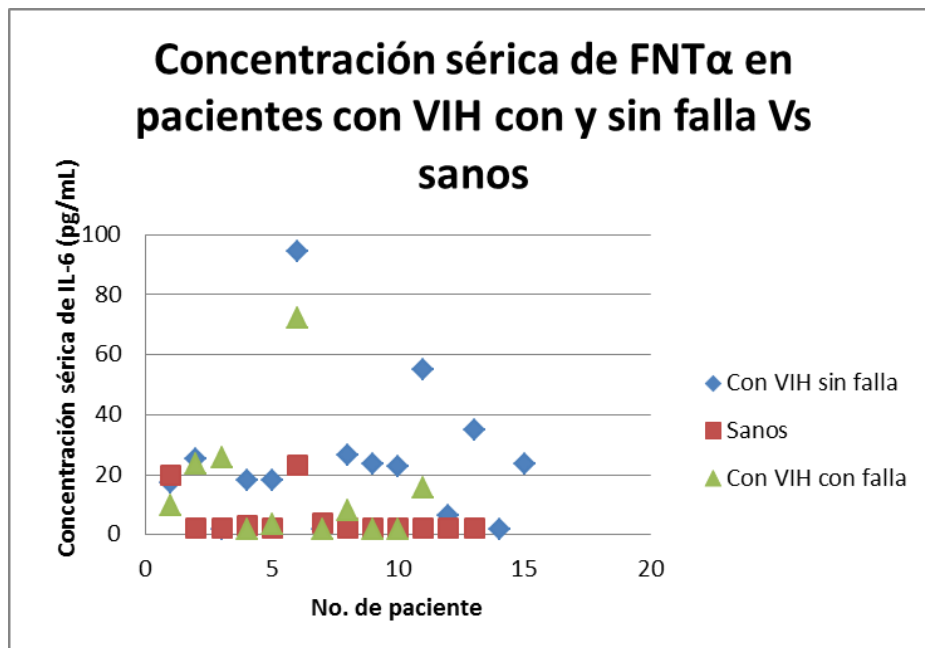
Gráfica 2.- Concentración sérica de IL-6 en pacientes que viven con VIH en comparación con niños sanos

El porcentaje de niños sin falla al tratamiento antirretroviral que presentaron niveles séricos de IL-6 mayor al percentil 90 de niños controles, fue de 20% (3/15) y del grupo con falla al tratamiento fue de 36.3% (4/11). En el grupo de niños sin falla, el 53.3% (8/15) presentaron la concentración sérica de FNT α mayor a la percentila 90 del grupo control (20pg/mL), y en el grupo con falla el 27.2% (3/11) supero al percentil 90 de la concentración de niños sin infección (20pg/mL) (Gráfica 3 y 4).



Gráfica 3.- Concentración sérica de IL-6 en pacientes con infección por VIH con y sin falla a tratamiento

antirretroviral en comparación con niños sanos.



Gráfica 4.- Concentración sérica de FNT α en pacientes que viven con VIH con y sin falla al tratamiento antirretroviral en comparación con niños sanos

En relación a los niveles séricos de IL-2 e IL-10 en el grupo control no se contó con el reactivo necesario para su obtención

Con respecto al tratamiento antirretroviral, en los quince pacientes sin falla, 6 tenían antecedente de haber recibido un solo esquema, y el esquema más comúnmente empleado al momento de realizar el estudio consistió en AZT, 3TC y LPV/r en la tercera parte de ellos.

Las características de los pacientes con falla al tratamiento antirretroviral y los esquemas de tratamiento que fueron utilizados de forma secuencial así como el tiempo de falla y valores de carga viral y linfocitos CD4+ se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. - Características de pacientes con falla al tratamiento antirretroviral

PACIENTE	EDAD (años)	TIPO DE FALLA	TIEMPO DE FALLA	CARGA VIRAL	CD4	TRATAMIENTOS EMPLEADOS*
1	14	VIROLOGICA	6 MESES	121	900	AZT+3TC+LPV/r +SQV+NVP AZT+DDI+LVP/r TDF + DRV/r+ RAL
2	3	VIROLOGICA	>1 AÑO	93	992	AZT+3TC+LPV/r EFV + RAL+LPV/r
3	2	VIROLOGIA INMUNOLOGICA	6 MESES	166	164	AZT+3TC+LPV/r
4	7	VIROLOGICA INMUNOLOGICA	>3 AÑOS	7844	382	AZT+3TC + NVP AZT+3TC+LPV/r ABC+3TC+LPV/r
5	5	INMUNOLOGICA	>1 AÑO	39	310	AZT+3TC+EFV
6	4	VIROLOGICA	1 AÑO 6 M	486	649	AZT+3TC+LPV/r
7	11	INMUNOLOGICA	10 MESES	39	281	AZT+3TC+LPV/r
8	16	VIROLOGICA	6 MESES	2447	571	AZT+ 3TC+LPV/r DRV/r+ RAL+TDF
9	4	VIROLÓGICA	>6 MESES	362	748	AZT+3TC+LPV/r
10	5	INMUNOLOGICA	2 AÑOS	39	433	AZT+3TC+LPV/r
11	8	VIROLOGICA INMUNOLOGICA	>2 AÑOS	107	355	AZT+3TC+NVP AZT+3TC+LPV/r DRV/r+D4T+AZT DRV/r+RAL+ABC

*Los esquemas antirretrovirales se expresan de manera secuencial en temporalidad. AZT zidovudina.-, 3TC.- lamivudina, EFV.- efavirenz, LPV/r.- lopinavir/ritonavir. DRV/r.- darunavir,/ritonavir. TDF tenofovir, D4T estavudina, ABC.- Abacavir . RAL.- raltegravir. DDI.- didanosina.- SQV saquinavir .

DISCUSIÓN

El VIH causa una destrucción de células CD4 por diversos mecanismos, condicionando una pérdida de la regulación y con ello, deterioro del sistema inmune de manera gradual.

Uno de estos mecanismos es la producción de citocinas, entre ellas las citocinas pro y antiinflamatorias, siendo evidente en este trabajo que existe un incremento tanto de interleucinas proinflamatorias de manera sustancial así como de interleucinas antiinflamatorias en niños que viven con VIH en comparación con niños sin la enfermedad.

En relación a las interleucinas proinflamatorias, se reporta en la literatura que los pacientes que viven con VIH con concentraciones séricas elevadas de IL-2 tienen mejor control de la enfermedad y disminución de la progresión. Si bien en nuestro trabajo no se reportan niveles tan elevados como en el artículo de Johann y col., en donde los pacientes con inmunosupresión severa tuvieron una media de concentración de 18.2pg/mL en comparación con los pacientes sin inmunosupresión con media de 134pg/mL, si se observaron concentraciones séricas más elevadas en los pacientes sin falla al tratamiento

En relación a FNT α e IL-6, Reus y colaboradores concluyeron que en adultos con VIH los mayores valores de estos marcadores inflamatorios se observan en aquellos casos con traslocación bacteriana y antecedentes de enfermedad cardiovascular. Heijligenberg y col. determinaron que la concentración plasmática de FNT α fue más alta en pacientes con SIDA (adultos) con una media de 24 pg/ml (intervalo de 17-31 pg/ml) en comparación con los controles con una media de 8pg/ml (intervalo de 1-16 pg/ml). En nuestro trabajo pudimos determinar que en la población pediátrica se comporta de manera similar con una mediana de 18pg/ml en niños con VIH en comparación con 2 pg/ml en el grupo sin la infección.

De manera similar a lo reportado en la literatura en relación a concentración sérica de interleucinas antiinflamatorias en los pacientes que viven con VIH, (en este caso, IL-10), concentraciones séricas disminuidas se relacionan con progresión de la enfermedad y viremia, similar a lo encontrado en nuestro estudio.

Con base en estos resultados, es posible que los niños que viven con VIH, presenten una desregulación en la red de citocinas y con ello un estado proinflamatorio crónico. Por otro lado, se hace evidente que esta desregulación de la red de citocinas se presenta tanto en los niños con y sin falla al tratamiento, medido desde el punto de vista virológico, sin embargo es posible que aun teniendo supresión de carga viral el sistema inmune continúe alterado y por lo tanto pareciera no existir una relación entre la reducción de la carga viral y el incremento del nivel de interleucinas.

Hasta el momento no se cuenta con estudios al respecto en población adulta con transmisión vertical de VIH. .

Dentro de las limitaciones de este estudio se debe considerar el tamaño de muestra que fue pequeño y el no haberse contado con reactivo suficiente para la medición sérica de IL-2 y de IL.10 en el grupo sin VIH.

No se tienen datos en relación de valores de referencia de las distintas interleucinas en pacientes pediátricos que viven con VIH, por lo que no se pueden establecer valores de normalidad en este grupo de pacientes y por lo tanto los resultados obtenidos en este proyecto pueden ser cimiento para futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

- 1.- Los niveles séricos de citocinas (IL-6 y FNT α) están más elevados en los pacientes que viven con VIH en comparación con niños sin la enfermedad.
- 2.- Los niveles séricos de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 y FNT α) entre los niños con o sin falla al tratamiento antirretroviral son similares.

CRONOGRAMA

	ABR 15	MAY 15	JUN 15	JUL 15	AGO 15	SEP 15	OCT 15	NOV 15	DIC 15	ENE 16	FEB 16	MAR 16	ABR 16
ELABORACIÓN PROTOCOLO	XXX	XXX											
SOLICITAR APROBACIÓN POR EL COMITÉ		XXX											
RECOPIACIÓN DE DATOS			XXX	XXX	XXX	XXX							
ANÁLISIS DE RESULTADOS							XXX						
PRESENTACIÓN DE TESIS Y EXAMEN FINAL								XXX					
CORRECCIONES Y ENTREGA								XXX	XXX				
PUBLICACIÓN										XXX	XXX		

XXX
 PROYECTADO REALIZADO

BIBLIOGRAFÍA

1. Gottlieb M S, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl. J. Med 1981; 305: 1425-31.
2. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC, A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218: 571-3
3. Schüpbach J, Popovic M, Gilden RV, Gonda MA, Sarngadharan MG, Gallo RC. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) associated with AIDS, Science 1984; 224:506-8
4. Mitsuya H., Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, et al Broder S. 3'-Azido-2'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1985;82:7096-100.
5. Johann LR, Cervia J., y Noel GJ. Endogenous Interleukin-2 Serum Levels in children Infected with Human Immunodeficiency Virus, CID 1997;25 (11); 1232-1235.
6. Tkaczuk J, Cytokines: Physiologie et implications diagnostiques et Thérapeutiques, Revue Française Des Laboratoires, Novembre 2000, 437; 39-47.
7. Serrano HA., Células colaboradoras (Th1, Th2, Th17) y reguladoras (Treg, Th3, NKT) en la artritis reumatoide, Reumatol Clin. 2009;5(S1):1-5.
8. Lee BN, Lu JG, Kline MW, Paul M, Doyle M, Kozinetz C, Shearer WT, Reuben JM., Type 1 and type 2 Cytokine Profiles In Children Exposed To Or Infected With Vertically Transmitted Human Immunodeficiency Virus, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Sept. 1996 (3) 5, P. 493-499.
9. Bentwich Z. Bacterial translocation: A useful biomarker for immune activation and disease progression. AIDS. 2011;25:1439-41.
10. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, et al Rao S. Bacterial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med. 2006;12:1365-71.
11. Hofer U, Speck RF. Disturbance of the gut-associated lymphoid tissue is associated with disease progression in chronic HIV infection. Semin Immunopathol. 2009; 31:257-66.).
12. Reus BS, Portilla SJ, Sánchez-PJ, Boix MV, Giner OL et al Gimeno GA, Asociación entre marcadores inflamatorios y traslocación bacteriana en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en tratamiento antirretroviral, Med Clin (Barc). 2014;142 (2):47-52).
13. Reus S, Portilla J, Sánchez-Paya' J, Giner L, France' s R, et al Such J. Low-level HIV viremia is associated with microbial translocation and inflammation. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;62:129-34.
14. Heijligenberg R, Romijn JA, Godfried MH, Endert E, Sauerwein HP, In vitro production of cytokines in whole blood versus plasma concentrations of cytokines in AIDS, AIDS Res Hum Retroviruses. 1998 Jan 20;14(2):123-7.
15. Shrestha S, Wiener HW, Aissani B, Song W, Shendre A, Wilson CM et al Tang J. Interleukin-10 (IL-10) Pathway: Genetic Variants and Outcomes of HIV-1 Infection in

African American Adolescents. PLoS ONE 5 (10): e13384. doi:10.1371/journal.pone.0013384.

16. Elrefaei M, Barugahare B, Ssali F, Mugenyi P, y Cao H., HIV-Specific IL-10-Positive CD 8+ T Cells Are Increased in Advanced Disease and Are Associated with Decreased HIV-Specific Cytolysis. *The Journal of* 2006; 176: 1274–1280
17. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, et al Neaton JD: Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* 2008;5:e203.
18. Tien PC, Choi AI, Zolopa AR, Benson C, Tracy R, Scherzer R, Bacchetti P, Shlipak M, and Grunfeld C: Inflammation and mortality in HIV-infected adults: Analysis of the FRAM study cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;55: 316–322.
19. McDonald B, Moyo S, Gabaitiri L, Gaseitsiwe S, Bussmann H, Koethe JR, et al Essex M. Persistently Elevated Serum Interleukin-6 Predicts Mortality Among Adults Receiving Combination Antiretroviral Therapy in Botswana: Results from a Clinical Trial, *Aids Research And Human Retroviruses*,2013; 29 (7):993-99.
20. Abad ML, Navarro J, Bellón JM, Sánchez-Ramón S and Muñoz-Fernández MA. Stimulated proliferative responses in vertically HIV-infected children on HAART correlate with clinical and immunological markers. *Clin Exp Immunol* 2003, 131 (1): 130-137.
21. De Pablo-Bernal RS, Ruiz ME, Rosado I, Dominguez MB Alvarez RA Carrillo VA. TNF-alpha levels in HIV-infected patients after long-term suppressive cART persist as high as in elderly, HIV-uninfected subjects. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:3041–6.
22. Nordell AD, McKenna M, Borges AH, Duprez D, Neuhaus J, Neaton JD. Severity of cardiovascular disease outcomes among patients with HIV is related to markers of inflammation and coagulation. *J Am Heart Assoc* 2014; 3.
23. Hileman CO, Labbato DE, Storer NJ, Tangpricha V, McComsey GA. Is bone loss linked to chronic inflammation in antiretroviralnaiveHIV- infected adults? A 48-week matched cohort study. *AIDS* 2014; 28:1759–67
24. Borges AH, Weitz JI, Collins G, Baker JV, Lévy Y, Davey RT Jr, et al Deeks SG. Markers of inflammation and activation of coagulation are associated with anaemia in antiretroviral- treated HIV disease. *AIDS* 2014; 28:1791–6
25. Armah KA, McGinnis K, Baker J, Gibert C, Butt AA, Bryant KJ et al Freiberg M. HIV status, burden of comorbid disease, and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation. *Clin Infect Dis* 2012; 55:126–36.
26. Villar GJ, Hernandez JJ, Guerri FR, González A, Lerma E, Guelar A, et al Freud KH.. Effect of probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on microbial translocation and inflammation in HIV-treated patients: a double-blind, randomized, placebo- controlled trial. *J Acquir Immun Def Syndr* 2015;68 (3): 256-63.
27. Fabre MV, Tubiana R, Papagno L, Bayard C, Briceno O, Fastenackels S, et al Appay V. Vitamin D supplementation is associated with reduced immune activation levels in HIV-1-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS* 2014; 28:2677–82
28. Metkus TS, Timpone J, Leaf D, Bidwell Goetz M, Harris WS, Brown TT. Omega-3 fatty acid therapy reduces triglycerides and interleukin- 6 in hypertriglyceridemic HIV patients. *HIV Med* 2013; 14:530–9
29. Wooten JS, Nambi P, Gillard BK, Pownall HJ, Coraza I, Scott LW, et al BAlasubramanyam A. Intensive lifestyle modification reduces Lp-PLA2 in dyslipidemic HIV/HAART patients. *Med Sci Sports Exerc* 2013; 45:1043–50.

30. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodríguez B, et al Brenchley JM, Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis.* 2009;199:1177–85.
31. Krzysiek R, Emilia D, Galanaud P, Role des cytokines dans la physiopathologie des Syndromes D'immunodificience Acquise.: L'exemple de l'infection par le VIH, *Revue Fraqaise Des Laboratoires*, Dkembre 2000, (328): 47-50pp.

ANEXO 1

“HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS”

Fecha de recolección de la muestra _____ Folio _____
 Nombre _____ NSS _____
 Edad: _____ Género _____
 Talla _____ Peso _____ Estado nutricional _____
 Fecha de nacimiento _____ Fecha de diagnóstico de VIH _____
 Cuenta de CD4 al momento de la toma _____
 Carga viral al momento de la toma de la muestra _____
 Tratamiento antirretroviral utilizado _____
 Fecha de inicio de tratamiento actual _____
 Tiempo de falla virológica _____
 Tiempo de falla inmunológica _____
 Resultados.-
 IL 2 _____ IL 6 _____ IL 10 _____ FNT α _____

FECHA	CARGA VIRAL	CUENTA CD4	PORCENTAJE CD4	OBSERVACIONES

FECHA DE INICIO Y TÉRMINO	FÁRMACOS UTILIZADOS	OBSERVACIONES

Persona responsable del estudio: Mariana Sámano Aviña R6IP 9923661

ANEXO 2

“TÉCNICA DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS

Se realizará la determinación de citocinas en plasma mediante análisis de ELISA tipo sándwich en pacientes que cuenten con los criterios de inclusión, utilizando el set de OptEIA®.

Esta técnica se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectómetro o un colorímetro.

Preparación estándar y manejo

1. Reconstitución: Después de resguardar el estándar liofilizado a temperatura ambiente. Reconstituir el estándar liofilizado con 1.0 mL de agua ionizada para producir el estándar. Dejar en reposo el estándar por al menos 15 minutos antes de realizar las diluciones. Mover suavemente para mezclar.
2. Almacenamiento/Manejo del estándar reconstituido: después de las reconstituciones, inmediatamente vaciar en viales de polipropileno 50 µl en cada vial y congelar a -80°C hasta por 6 meses. Si fuera necesario, almacenarlo entre 2-8°C hasta por 8 horas previo a realizar la alícuota / congelar. No dejar el estándar a temperatura ambiente.
3. Preparación de los estándares para las pruebas:
 - a) Preparar 500 pg/mL del estándar a partir del estándar reservado. Mezclar.
 - b) Agregar 300 µL del diluyente de prueba en 6 tubos. “Etiquetar” como 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL, 15.6 pg/mL y 7.8 pg/ mL.
 - c) Realizar las diluciones seriales agregando 300 µl de cada estándar al siguiente tubo y mezclando entre cada una de las transferencias. La dilución de prueba se utiliza como el estándar cero (0 pg/mL).

Las diluciones seriales entre los tubos pueden ser realizadas pipeteando 100 µl de la dilución de prueba en cada recipiente con estándar excepto el más elevado (500 pg/mL), y después añadiendo 100 µl del estándar de 500 pg/mL en ambos recipientes y en el de 250 pg/mL, mezclando el contenido de los recipientes.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA RECOMENDADO

1. Cubrir la microplaca con 100 µl cada uno de los pocillos del anticuerpo de captura diluido en la solución amortiguadora. Tapar la microplaca e incubar durante toda la noche a 4°C.
2. Aspirar los pocillos y lavar 4 veces con ≥ 300 µL/pocillo de agua de lavado, durante 30 segundos entre cada uno de ellos. Después del último lavado, voltear la placa y dejar escurrir sobre el papel absorbente para eliminar todo residuo de la solución amortiguadora.
3. Llenar la placa con ≥ 300 µL/pocillo de la disolución de prueba “buffer de bloqueo”. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

4. Aspirar y lavar de acuerdo al punto 2.
5. Preparar el estándar y las diluciones de muestra en la disolución de prueba.
6. Pipetear 100 μ L de cada estándar, muestra y control dentro del pocillo apropiado por duplicado o triplicado. Cerrar la placa e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
7. Aspirar/lavar como en el punto 2.
8. Agregar 100 μ L del anticuerpo de detección en cada pocillo. Cierra la placa e incuba por 2 horas a temperatura ambiente.
9. Aspirar/lavar como en el punto 2.
10. Agregar 100 μ L de anticuerpo conjugado (STRP-HRP) en cada pocillo e incubar durante 30 min a temperatura ambiente
11. Aspirar/lavar como se menciona en el punto 2, pero un total de 7 lavados. NOTA: en este lavado final, remojar los pocillos en agua amortiguadora durante 30 seg – 1 minuto para cada lavada.
12. Agregar 100 μ L de Solución Substrato a cada pocillo. Incubar la placa (sin cerrar la placa) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
13. Agregar 50 μ L de solución de paro a cada pocillo. NO LAVAR
14. Leer la absorción a 450nm dentro de los 30 minutos de que se detuvo la reacción. Si la corrección de las ondas puede regularse, modificarla a 570 nm.