



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LIC. BIOTECNOLOGÍA

“Detección del SNP rs3764261 G>T del gen *CETP* en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que cursan con dislipidemia y que reciben tratamiento antirretroviral (TARV)”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

GERSON GABRIEL CONTRERAS CHAVEZ

Asesores

Dra. Miriam Verónica Flores Merino

Dra. Ericka Nelly Pompa Mera



Toluca, Edo. México a 5 de junio de 2018

DESARROLLO DE TRABAJO

La presente tesis deriva del proyecto “Identificación de variantes genéticas de riesgo para el desarrollo de dislipidemia secundaria al tratamiento antirretroviral (TARV) en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)”, el cual cuenta con el número de Registro en el IMSS: R-2013-3502-38.

La tesis se desarrolló en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” del Centro Médico Nacional. S.XXI, bajo la dirección de la Dra. Ericka Nelly Pompa Mera, en conjunto con el Servicio de Infectología de Adultos, Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” del CMN “La Raza”, del Instituto Mexicanos del Seguro Social (IMSS). Para su desarrollo, se contó con las fuentes de financiamiento FIS/IMSS/PROT/G14/1309, Fundación IMSS-Janssen Cilag no. DVR-I-15-MEX-001-V02 y CONACyT-FONSEC-221632.

Índice

Índice.....	2
Índice de Figuras.....	4
Índice de Tablas	5
Abreviaturas	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
1. Introducción.....	9
1.1 Infección por el VIH, características y definición de SIDA.....	9
1.2 Origen del virus de inmunodeficiencia Humana.....	11
1.3 Epidemiología de la infección por el VIH.....	13
1.4 Epidemiología nacional de la infección por el VIH.....	15
1.5 Características del VIH y ciclo de vida.....	17
1.6 Historia natural de la infección por VIH.....	23
1.7 Tratamiento antirretroviral (TARV).....	28
1.8 La dislipidemia como efecto adverso al TARV.....	32
1.9 Bases genéticas de la dislipidemia y SNPs.....	33
1.10 Proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP).....	35
1.11 SNP rs3764261 G >T del gen CETP.....	38
2. Antecedentes.....	39
3. Objetivos.....	40
4.1 Objetivo general.....	40
4.2 Objetivos específicos.....	40

4. Hipótesis.....	40
5. Materiales y Métodos.....	41
5.1. Población de estudio.....	41
5.2. Preparación de muestras sanguíneas.....	41
5.3. Extracción de ADN genómico.....	42
5.4. Cuantificación de ADN.....	42
5.5. Genotipificación y ensayos de discriminación alélica.....	43
5.6. Secuenciación nucleotídica automatizada	44
5.7. Análisis estadístico	46
6. Resultados.....	46
7. Discusión.....	54
8. Conclusiones.....	58
9. Bibliografía.....	58
10. Anexos.....	71

Índice de figuras

Figura 1:	Clasificación de VIH.....	12
Figura 2:	Población mundial infectada por VIH.....	14
Figura 3:	Grafica de defunciones por SIDA 1990-2016.....	15
Figura 4:	Casos nuevos de VIH.....	16
Figura 5:	Defunciones por SIDA en México.....	17
Figura 6:	Representación de la estructura del VIH.....	18
Figura 7:	Organización del genoma de VIH-1.....	19
Figura 8:	Ciclo de replicación viral.....	22
Figura 9:	Evolución de la infección por VIH.....	27
Figura 10:	Tipos de ARV.....	30
Figura 11:	Transporte reverso del colesterol.....	35
Figura 12:	Estructura del gen de CETP.....	38
Figura 13:	Secuencia del SNP rs3764261.....	39
Figura 14:	Flujograma de trabajo.....	41
Figura 15:	Perfil térmico qPCR.....	44
Figura 16:	Perfil térmico PCR de secuenciación.....	46
Figura 17:	Distribución de las frecuencias de edad encontradas en la población de estudio.....	48
Figura 18:	Gráfico de amplificación para la detección del SNP rs3764261 del gen CETP.....	52
Figura 19:	Secuenciación nucleotídica de la región que contiene al SNP rs3764261 del gen CETP.....	53

Índice de tablas

Tabla 1:	Infecciones oportunistas identificadas en SIDA.....	9
Tabla 2:	Distribución geográfica de los distintos subtipos de VIH-1-M.....	13
Tabla 3:	Denominaciones previas para VIH.....	13
Tabla 4:	Proteínas virales, función, tamaño y localización.....	19
Tabla 5:	Clasificación de ARVs.....	29
Tabla 6:	Mecanismos por los que CETP puede afectar la aterogénesis.....	37
Tabla 7:	Concentraciones de lípidos en sangre.....	37
Tabla 8:	Características de los pacientes incluidos en el estudio.....	47
Tabla 9:	Perfiles lipídicos de los pacientes incluidos en este estudio.....	47
Tabla 10:	Frecuencias alélicas y genotípicas de la población estudiada.....	48
Tabla 11:	Análisis de asociación entre el SNP rs3764261 y la dislipidemia a expensas del aumento de TG.....	50
Tabla 12:	Análisis de asociación entre el SNP rs3764261 y la dislipidemia a expensas del descenso de HDL-c.....	51

Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AHI	Síndrome de Infección Aguda (por las siglas en inglés de <i>Acute HIV infection</i>)
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
ARV:	Fármaco Antirretroviral
CDC:	Centro para el control y prevención de las enfermedades de EUA.
CETP:	Proteína transportadora de esteres de colesterol, (por las siglas en inglés de <i>Cholesterylester Transfer Protein</i>)
CMV:	Citomegalovirus
CT	Colesterol total
EC:	Esteres de Colesterol
ECV:	Enfermedad Cardiovascular
GALT:	Tejido linfoide asociado al intestino (por las siglas en inglés de <i>Gut lymphoid associated tissue</i>)
HAART	Terapia antirreoviral altamente combinada (por las siglas en inglés de <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
HDL-c:	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
HSH:	Hombres que tienen sexo con hombres
HTG:	Hipertrigliceridemia
HTS:	Hombres trabajadores del sexo
IE:	Inhibidores de Entrada
IC	Intervalo de confianza
IF:	Inhibidores de la Fusión
IMSS:	Instituto Mexicano del Seguro Social
INSTI	Inhibidores de la Integrasa
ITIAN:	Inhibidores de Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleósidos y Nucleótidos
ITINN:	Inhibidores de la Transcriptasa Inversa No Análogos de Nucleósidos
IP:	Inhibidores de la Proteasa
LDL-c:	Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
N:	Número de sujetos que componen el tamaño de la muestra
nm	nanómetros
OR	Razón de momios (por las siglas en inglés de <i>Odds Ratio</i>)
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
PBS:	Buffer Fosfato Salino
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIVcpzptt:	Virus de inmunodeficiencia en Simios (chimpancé)
SIVgor:	Virus de inmunodeficiencia en Simios (Gorilas)
SIVsm:	Virus de inmunodeficiencia en Simios (Sooty mangabey)
SNP:	Polimorfismo de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphisms)
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa (por las siglas en inglés de <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (por las siglas en inglés de <i>quick Polymerase Chain Reaction</i>)
PUDI:	Personas que usuarias de drogas intravenosas
TARV:	Tratamiento Antirretroviral
TG	Triglicéridos
VIH-1:	Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1
VIH-2:	Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 2
VLDL-c:	Lipoproteínas de muy baja densidad
ZDV:	Zidovudina

Resumen

Desde su introducción, el tratamiento antirretroviral (TARV), ha incidido de manera importante en la reducción de infecciones oportunistas y en la mortalidad asociada a SIDA, mejorando la calidad y la esperanza de vida entre los pacientes con infección por VIH. Sin embargo, el TARV se asocia con efectos metabólicos, entre los cuales, la dislipidemia ocupa un lugar importante. La dislipidemia, se define como una alteración en los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total (CT), colesterol unido a lipoproteínas de alta (HDL-c) y baja densidad (LDL-c). En particular, la disminución de HDL-c puede contribuir al incremento del riesgo cardiovascular.

Si bien la fisiopatología de la dislipidemia es compleja y de origen multifactorial, aún con características sociodemográficas e historia farmacológica similar, no todos los pacientes desarrollan dislipidemia. Esta variabilidad interindividual, sugiere la influencia de factores genéticos, entre los cuales se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). El SNP rs3764261 del gen que codifica para la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) ha sido asociado a la dislipidemia a expensas de la disminución de HDL-c. Sin embargo en nuestro país, no se cuentan con estudios que demuestren esta asociación en la población de pacientes con infección por VIH y que reciben TARV.

En el presente trabajo, se realizó la detección del SNP rs3764261 (G→T), en 310 pacientes mexicanos con diagnóstico confirmado de infección por VIH y que reciben TARV. Los resultados mostraron que el alelo G del SNP rs3764261 del gen *CETP* está asociado con el riesgo de dislipidemia a expensas de la disminución de HDL-c (OR 1.60, IC 0.98-2.62, $P = 0.0584$) y también con el riesgo de hipertrigliceridemia (OR 1.58, IC 0.99 – 2.53, $P = 0.0537$). Por su parte, el genotipo TT está asociado con un efecto protector favorable o normolipidémico en términos de la concentración de HDL-c (OR 0.43, IC 0.28–0.68, $P=0.0002$).

De esta manera, los resultados aportados por el presente trabajo, permitieron detectar a los pacientes en riesgo de desarrollar dislipidemia secundaria al TARV a expensas de la disminución de HDL-c, con base en su perfil genético.

Abstract

Since introduction, antiretroviral treatment (ART), has influenced importantly in reduction of opportunistic diseases and mortality associated to AIDS, improving the quality of life in HIV population. However, ART is associated to metabolic side effects, among them, dyslipidemia is highly prevalent. Dyslipidemia is characterized by alterations in plasmatic levels of the triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL-c) and low-density lipoprotein (LDL-c). In fact, low levels of the HDL-c might contribute to high risk of cardiovascular disease. While the pathophysiology of dyslipidemia is complex with multifactorial etiology, despite of sociodemographic characteristics and pharmacological history, not all patients develop dyslipidemia. This suggest an interindividual variability and the influence of genetic factors, among them, are the single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNP rs3764261 in the gene encoding the Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP) has been associated with the decrease of HDL-c. Studies that support this association in HIV patients receiving ART in Mexico are not available.

In the present study, detection and genotyping of SNP rs3764261 (G→T) was performed in 310 Mexican patients with HIV infection that receiving ART. The results showed that allele G of SNP rs3764261 from CETP gene is associated with risk of dyslipidemia characterized by low HDL-c (OR 1.60, IC 0.98-2.62, $P = 0.0584$), and risk of hypertriglyceridemia (OR 1.58, IC 0.99 – 2.53, $P = 0.0537$). On the other hand, genotype TT is associated with protective and normolipidemic effect in terms of plasmatic concentrations of HDL-c (OR 0.43, IC 0.28–0.68, $P = 0.0002$).

Thus, the results obtained from this study, allowed the identification of HIV patients in high risk of secondary dyslipidemia to ART, characterized by low levels of HDL-c combined with hypertriglyceridemia, in base of its genetic profile.