

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

“Respuesta de células T cooperadoras y perfil de citocinas asociado a diferentes estadios de sífilis en hombres que tienen sexo con hombres y que viven con VIH”

Tesis

para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Enfermedades Infecciosas.

M. en C. Adriana Hernández Pliego

2019-2023

Director: Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán

Cuernavaca, Mor. Agosto 2023

RESUMEN EJECUTIVO

Antecedentes: La sífilis ha re-emergido, hasta 76% especialmente entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH). En 2017, el Centro para Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estimó que al menos el 58% de los casos de sífilis corresponde a HSH y que la mitad de ellos viven con VIH. La historia natural de la sífilis se ve afectada por la co-infección con VIH. Se conoce que la infección por VIH inmunocompromete la respuesta de células T CD4⁺, esta se ve compensada por células T_{reg}, caracterizadas por la secreción de IL-10 y TGF-β1. Sin embargo, este mecanismo de compensación no es suficiente pues finalmente la infección progresa a Sida, ¿Qué sucede en pacientes co-infectados con sífilis? Es importante conocer los factores inmunológicos involucrados para determinar por qué ciertos pacientes presentan síntomas de una sífilis activa mientras que el 34% permanecen asintomáticos. Estudiar la respuesta inmune de células T en HSH con VIH resulta imprescindible para determinar qué marcadores son más prevalentes en diferentes etapas de la sífilis. **Objetivo general:** Evaluar la respuesta de células T cooperadoras y el perfil de citocinas en sífilis activa, latente y tratada entre HSH que viven con VIH. **Metodología:** Se realizó un estudio transversal entre personas que viven con VIH, que acuden al Centro Ambulatorio de Prevención y Atención en Sida e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) en Cuernavaca, Morelos, entre marzo a octubre de 2022. Previo consentimiento informado, se solicitó una muestra de sangre para determinar su estado serológico contra *T. pallidum*, titulación de anticuerpos por VDRL y revisión del expediente clínico. Se formaron 4 grupos (Sin sífilis; Sífilis activa, Sífilis latente y Sífilis tratada). Se evaluó la concentración de citocinas séricas IL-17, IFN-γ, TNF, TGF-β1 e IL-10 mediante ELISA. Posteriormente se realizó la detección de factores de transcripción (STAT1/T-bet para células T_{H1}, ROR-γt para células T_{H17} y Foxp3 para células T_{reg}) mediante RT-qPCR. **Resultados:** Se reclutaron 686 hombres. De estos, el 56% resultó positivo para sífilis. Para sífilis activa se obtuvieron 24%, para un estadio latente 37% y 39% una sífilis tratada. Para las citocinas evaluadas, TNF demostró mayor expresión en una sífilis activa y esto fue estadísticamente significativo entre los demás grupos. TGF-β1 podría ser un candidato de progresión de enfermedad con diferencia significativa de 12.5% en sífilis latente *versus* sífilis tratada. IFN-γ e IL-10 no demostraron ninguna diferencia entre grupos. IL-17 no demostró ninguna señal de expresión entre la población analizada. Se encontró que Foxp3 es mayormente expresado en sífilis activa, en contraste con T-bet, quien es activado durante toda la infección por *T. pallidum*. STAT-1 disminuye su expresión durante la sífilis. RORc se activó durante una sífilis activa y tratada, lo que podría ser efecto antagónico de la respuesta dependiente de Foxp3. **Conclusiones:** Aunque TNF demostró significancia estadística en un estadio activo, la proporción de positivos (6/89) no implica biológicamente que funja como biomarcador. Las células

Foxp3⁺TGF-β1⁺ podrían estar jugando un papel importante durante una sífilis latente, permitiendo el incremento de carga treponémica mientras el hospedero permanece asintomático. Aún cuando IL-17 ha demostrado ser un biomarcador en neurosífilis, nuestra población de estudio no expresó esta citocina en plasma. Esto podría ser el resultado de una adherencia óptima al tratamiento antirretroviral y por consiguiente un estadio indetectable, es decir, “libre de enfermedad”. La expresión sérica de TGF-β1 incrementa en los diferentes estadios de la sífilis, y esta es la primera vez que se ha analizado en un contexto de co-infección por VIH y demostrado ser un biomarcador en sífilis latente versus sífilis tratada.

1 Tabla de contenido

1. Marco conceptual.....	11
1.1 Virus de Inmunodeficiencia Humana	11
1.1.1 Generalidades y biología del virus.....	11
1.1.2 Replicación viral e historia natural de la enfermedad	12
1.1.3 Epidemiología de VIH.....	13
1.1.4 Diagnóstico	15
1.1.5 Tratamiento	16
1.2 <i>Treponema pallidum pallidum</i>.....	17
1.2.1 Generalidades.....	17
1.2.2 Estructura de la bacteria.....	19
1.2.3 Patogénesis e historia natural de la enfermedad	19
1.2.4 Epidemiología	20
1.2.5 Diagnóstico	21
1.2.6 Pruebas treponémicas.....	22
1.2.7 Pruebas no treponémicas.....	23
1.2.8 Tratamiento	25
2. Antecedentes.....	26
2.1. Sistema inmunológico	25
2.1.1 Inmunología viral	28
2.1.2. Inmunología de sífilis.....	30
2.1.3. Sistema inmune durante la co-infección VIH/sífilis.....	32
2.2. Epidemiología de la co-infección VIH-Sífilis	34
3. Planteamiento del problema.....	35
4. Justificación.....	35
5. Pregunta de investigación.....	36
6. Hipótesis	36
7. Objetivo general.....	37
8. Objetivos específicos.....	37
9. Materiales y métodos	38
9.1. Diseño de estudio	38
9.2. Tamaño de muestra	40
9.3. Implicaciones éticas y de bioseguridad	40
9.4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	40
9.5. Procesamiento de muestras	41
9.6. Detección de sífilis	41
9.7. Respuesta de células T cooperadoras y perfil de citocinas	42
9.7.1. Detección de citocinas	42
9.7.2. Cuantificación relativa de factores de transcripción por RTqPCR	42
9.8. Operacionalización de variables	42

9.9.	Análisis estadístico.....	45
10.	Resultados	46
10.1.	Revisión sistemática de literatura: inmunología de sífilis.....	46
10.2.	Prevalencia de sífilis adquirida en CAPASITS Cuernavaca.....	46
10.3.	Detección de citocinas séricas en hombres con VIH.....	51
10.4.	Expresión de factores de transcripción den hombres con VIH de CAPASITS.....	53
10.5.	Manuscrito con resultados originales	57
11.	Discusión.....	58
12.	Conclusiones	62
13.	Problemas y limitaciones.....	63
14.	Perspectivas.....	63
15.	Bibliografía	64
16.	Anexos.....	70

Índice de figuras

Figura 1	Carga Global de la Enfermedad en hombres de 15-49 años de edad en 2017 (https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/).	14
Figura 2	Inmunología de VIH. Elaboración propia	28
Figura 3.	Progresión de la enfermedad de VIH	29
Figura 4.	Presentación de Treponema pallidum pallidum e inmunología de sífilis	30
Figura 5.	Prevalencia de sífilis adquirida y sus estadios en PVV de CAPASITS Cuernavaca . ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 6.	Prevalencia de sífilis adquirida y sus estadios en hombres de CAPASITS Cuernavaca	47
Figura 7.	Conteo de células T CD4 ⁺ en hombres con VIH.....	49
Figura 8.	Conteo de células T CD4 ⁺ en hombres con VIH por grupo de interés	50
Figura 9.	Carga viral indetectable por grupo de interés en hombres con VIH.....	50
Figura 10	Expresión sérica de citocinas evaluadas.....	52
Figura 11.	Expresión de GAPDH en hombres con VIH.....	53
Figura 12	Expresión de STAT-1 en hombres con VIH	54
Figura 13.	Expresión de T-bet en hombres con VIH.....	54
Figura 14.	Expresión de Foxp3 en hombres con VIH.....	55
Figura 15.	Expresión de RORc en hombres con VIH.....	55

Índice de tablas

Tabla 1.	Infecciones oportunistas y cáncer asociado a Sida	10
Tabla 2.	Tratamiento antirretroviral para VIH	16
Tabla 3.	Tipos de diagnóstico para sífilis Fuente. Elaboración propia	22
Tabla 4.	Linaje de linfocitos T y características generales.....	26
Tabla 5.	Operacionalización de variables. Elaboración propia.....	45
Tabla 6.	Características de hombres asistentes a CAPASITS Cuernavaca	48

<i>Tabla 7. Adherencia al tratamiento antirretroviral entre HSH con VIH por estadio de sífilis</i>	49
<i>Tabla 8. Proporción de positivos para cada citocina sérica expresada</i>	51
<i>Tabla 10 Promedio de Cts de amplificación por grupos de interés</i>	53
<i>Tabla 11. Proporción de expresión de factores de transcripción de células T CD4+</i>	¡Error!
Marcador no definido.	
Tabla 9.Oligos de factores de transcripción canónicos de células T CD4+	18

Índice de anexos

Anexo 1 Historia natural de la enfermedad: Sífilis y la respuesta inmune en diferentes estadios. Revisión sistemática de literatura.	71
Anexo 2 Respuesta inmune en la co-infección de VIH y sífilis: Revisión sistemática de literatura.	72
Anexo 4 Carta de consentimiento informado.....	0

Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
Ac	Anticuerpo.
Ag	Antígeno.
CAPASITS	Centro Ambulatorio de Prevención y Atención en Sida e Infecciones de Transmisión Sexual.
CD3	Cúmulo de Diferenciación tipo 3 (<i>Cluster of Differentiation</i> en inglés).
CD4	Cúmulo de Diferenciación tipo 4 (<i>Cluster of Differentiation</i> en inglés).
CDC	Centro para Control y la Prevención de Enfermedades (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> en inglés).
CPA	Célula Presentadora de Antígeno.
CSF	Líquido Cerebroespinal.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetra Acético.
ELISA	Ensayo Inmuno-Absorbente Ligado a Enzimas (<i>Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay</i> en inglés).
FoxP3	Factor de Transcripción canónico para célula T reguladora (<i>Forkhead Box P3</i> en inglés).
GBD	Carga Global de la Enfermedad (<i>Global Burden Disease</i> en inglés)
HNE	Historia Natural de la Enfermedad.
HSH	Hombres que tienen Sexo con Hombres.
IFN-γ	Interferon gamma.
IgG	Inmoglobulina tipo G.
IgM	Inmoglobulina tipo M.
IL-10	Interleucina 10.
IL-17	Interleucina 17.
MHCII	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II.
NK	Célula Asesina (<i>Natural Killer cell</i> en inglés).
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PAMP	Patrones Moleculares Asociados A Patógeno.
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones.
ARN	Ácido Ribonucleico.
RORγt	Factor de Transcripción canónico para célula T cooperadora de tipo 17 "Receptor nuclear huérfano relacionado con el receptor de ácido retínico gamma" (<i>Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma</i> en inglés).
RT q PCR	Retro Transcripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa.
Sida	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
STAT 1	Factor de transcripción de célula T cooperadora de tipo 1 "Transductor y activador de transcripción tipo 1" (<i>transducer and activator of transcription 1</i> en inglés).
T$\gamma\delta$	Células T gamma delta
TAR	Tratamiento Antirretroviral.
T-bet / TBX21	Factor de transcripción canónico de célula T cooperadora de tipo 1 "Factor de transcripción de la familia T-box".
Tc	Célula T citotóxica.
TCR	Receptor de Célula T.
TGF-β1	Factor de Crecimiento Transformante tipo beta.
Th	Célula T cooperadora (<i>T helper cell</i> en inglés).
TLR	Receptor de Tipo Toll (<i>Toll Like Receptor</i> en inglés).
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
Tpp	<i>Treponema pallidum pallidum</i> .
Treg	Célula T reguladora.
VDRL	Prueba serológica para sífilis (<i>Venereal Disease Research Laboratory</i> en inglés).

Glosario

Anticuerpo	Proteínas secretadas por células B que reconocen ciertas regiones de un antígeno, dicha región denominada como epítipo.
Antígeno	Sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria.
Célula presentadora de antígeno	Grupo diverso de células del sistema inmunitario (células dendríticas, macrófagos, células B y células epiteliales) cuya función es la de captar, procesar y presentar moléculas antigénicas sobre sus membranas para que sean reconocidos, en especial por linfocitos T.
Co-infección	Presencia de dos o más agentes infecciosos de manera simultánea.
Diagnóstico clínico	Procedimiento mediante el cual el profesional de la salud identifica una enfermedad o el estado de una persona con la ayuda de varias herramientas que permiten definir su cuadro clínico.
Diagnóstico molecular	Término general que engloba un conjunto de técnicas de biología molecular empleadas para la identificación y análisis de marcadores biológicos en el genoma y proteoma.
Factor de transcripción	Proteína que se une a secuencias específicas de ADN, controlando así la transcripción de la información genética de ADN a ARN mensajero.
Fagocitosis	Proceso por el cual ciertas células y organismos unicelulares capturan y digieren partículas nocivas o alimento.
Historia Natural de la Enfermedad	Evolución de un proceso patológico sin intervención médica.
Inmunidad adquirida	Es la inmunidad que se desarrolla con la exposición a diversos antígenos.
Inmunodepresión	Debilitamiento del sistema inmunitario del cuerpo y de su capacidad de combatir infecciones y otras enfermedades.
Inmunidad innata	Consiste en barreras que impiden que los materiales dañinos ingresen en el cuerpo. Estas barreras forman la primera línea de defensa en la respuesta inmunitaria.
Inmunosupresión	Disminución o anulación de la respuesta inmunológica del organismo mediante tratamiento médico.
Marcador	Características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc., objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica
Neurosífilis	Es una infección bacteriana del cerebro o de la médula espinal. Ocurre por lo general en personas que han tenido sífilis sin tratamiento durante muchos años.
Opsonización	La opsonización por anticuerpos es el proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito.
Patógeno	Se denomina patógeno a todo agente biológico externo que se aloja en un ente biológico determinado.
Proteoma	Es el total de proteínas expresadas en una célula particular bajo condiciones específicas.
Prueba no treponémica (indirecta)	Aquellas que no determinan anticuerpos específicos contra <i>T. pallidum</i> , en su lugar detectan anticuerpos contra antígenos generados comúnmente por los tejidos dañados por este microorganismo.
Prueba treponémica (directa)	Pruebas que detectan anticuerpos IgG e IgM específicos contra <i>T. pallidum</i> . Utilizan antígenos de la membrana externa del protozoo y antígenos recombinantes.
Enfermedad reemergente	Aquellas anteriormente conocidas, controladas o tratadas eficazmente y cuya frecuencia y/o mortalidad se encuentran en aumento.
Serología	Estudio que permite comprobar la presencia de anticuerpos en la sangre.

Sida	Término que se aplica a los estadios más avanzados de la infección por VIH y se define por la presencia de alguna de las más de 20 infecciones oportunistas o de cánceres relacionados con el VIH.
Sífilis	Infección bacteriana causada por <i>Treponema pallidum</i> que da lugar a una morbilidad y mortalidad sustanciales.
Sífilis activa	Se considera sífilis activa al título de anticuerpos mayor o igual 1:8 presentes en sangre periférica.
Sífilis latente	Se considera sífilis latente al título de anticuerpos de 1:4 a 1:1 presentes en sangre periférica.
Sífilis maligna	Forma infrecuente de sífilis secundaria asociada a la infección por el VIH, caracterizada clínicamente por nódulos necróticos y lesiones ulceradas generalizadas.

1. Marco conceptual

1.1 Virus de Inmunodeficiencia Humana

1.1.1 Generalidades y biología del virus

El Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus de ARN de cadena simple con sentido positivo (*ssRNA+*), su genoma comprende 9,75 kilobases (kb) y se encuentra envuelto dentro de la cápside viral. Este virus infecta células del sistema inmunitario que presenten el receptor de superficie CD4, tales como: macrófagos, células dendríticas y linfocitos T cooperadores (Th) ((Expasy, 2020)). Se transmite por vía sexual, transfusión de sangre infectada, de manera vertical (madre a hijo) o incluso por el uso compartido de agujas. La infección por VIH produce un deterioro inmunitario importante ya que la función de las células se ve inmunocomprometida y en ausencia de tratamiento suele progresar a un estadio avanzado, conocido como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Sida). El Sida se define por la presencia de alguna de más de 20 infecciones oportunistas o de algún tipo de cáncer asociado con VIH (Ver tabla 1), tales como: Citomegalovirus (CMV), Tuberculosis (TB), Sarcoma de Kaposi, Toxoplasmosis, entre otros (ONUSIDA, 2020).

Tabla 1. Infecciones oportunistas y cáncer asociado a Sida

Infecciones bacterianas recurrentes
Candidiasis en bronquios, tráquea o pulmones.
Candidiasis esofágica
Cáncer cervicouterino invasivo
Coccidiomicosis extrapulmonar
Criptosporidiosis intestinal crónica (duración mayor a 1 mes)
Citomegalovirus (hígado, bazo, ganglios linfáticos y/o pérdida de la visión)
Encefalopatía relacionada a VIH
Virus del Herpes Simplex, ulceración crónica
Histoplasmosis, diseminada o extrapulmonar
Isosporiasis, crónica intestinal (duración mayor a 1 mes)
Sarcoma de Kaposi
Neumonía linfoide intersticial
Linfoma de Burkitt
Linfoma inmunoblástico
Linfoma primario en cerebro
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> diseminado o extrapulmonar
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , cualquier sitio

Mycobacterium
Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i>
Neumonía recurrente
Leucoencefalopatía progresiva multifocal
Septicemia recurrente por <i>Salmonella</i>
Toxoplasmosis en cerebro
Síndrome de pérdida de peso por infección por VIH

Fuente. Elaboración propia

1.1.2 Replicación viral e historia natural de la enfermedad

La infección por VIH requiere de la interacción de un hospedero infectado y otro sano, de modo que el virus puede infectar las células diana del sistema inmunitario. Sin embargo, para una infección exitosa, requiere de un co-receptor como CCR5 o CXCR4, presente en linfocitos Th y células presentadoras de antígeno (CPA) respectivamente. Las glicoproteínas de la cápside, gp120 y gp41 se unen a CD4 y CCR5 presentes en la membrana de los linfocitos. La internalización del virus ya sea por fusión de membrana o por endocitosis mediada por clatrina (Bosch et al. 2008; Permanyer, Ballana, y Esté 2010), permite la activación para la retrotranscripción del genoma viral, es decir que el *ssRNA* (+) se copia a ADN de doble cadena (*dsDNA*) lineal mediante la enzima viral transcriptasa reversa. Posteriormente, el *dsDNA* se integra de forma covalente y aleatoria al genoma celular mediante la integrasa viral, y así permitir la replicación viral de manera segura y efectiva. El siguiente paso es el ensamblaje del virión en la membrana celular del hospedero, el empaquetamiento del genoma viral de RNA y la liberación de los viriones al medio extracelular. El paso final, consiste en el procesamiento proteolítico de las poliproteínas precursoras de la proteasa viral, esto permite la maduración del virión para infecciones posteriores (Expasy, 2020)(Altfeld y Gale Jr 2015).

El cuadro clínico difiere según la etapa de la infección. El pico máximo de replicación viral, suele ser los primeros meses y algunas veces la persona infectada no manifiesta ningún síntoma, mientras que, en otras ocasiones, suelen presentar un cuadro “pseudogripal” caracterizado por fiebre, cefalea y dolor de garganta. A medida que la infección progresa, esta debilita al sistema inmune y el cuadro clínico suele presentarse como inflamación de ganglios, pérdida de peso, diarrea y tos. Es importante mencionar que en ausencia de tratamiento, suele progresar a Sida tras varios años (hasta 10 años) y presentar una o más infecciones oportunistas (Altfeld y Gale Jr 2015).

1.1.3 Epidemiología de VIH

La infección por VIH sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en los países de bajos y medianos recursos. Debido al uso de terapia antirretroviral (TAR), las personas con VIH pueden vivir por más tiempo y mejorar la calidad de vida, además que el uso de TAR evita la transmisión del VIH.

Al cierre de 2016, la ONUSIDA estimó 36.7 millones personas vivían con VIH, de los cuales solo 19.5 millones tenían acceso al tratamiento antirretroviral. En comparación con 2015, esta cifra aumento 14% (17.2-20.3 millones) y 15.3% en comparación con 2010 (7.7 millones). Para 2016, se registraron 1 millón de personas en todo el mundo fallecidas a causa de enfermedades relacionadas con el Sida. Sin embargo, esta tasa de mortalidad por VIH ha disminuido en 48% *versus* 2005 (1.9 millones) y 33% en 2010 (1.5 millones). En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó 20.9 millones de personas que recibían TAR a nivel mundial.

De acuerdo al reporte de ONUSIDA en 2020, a nivel mundial existen 37.7 millones de personas que viven con VIH, de estos, el 84% sabe que vive con VIH y el 66% de personas que viven con el VIH (PVV) tienen niveles indetectables del virus. Al cierre de 2020, se registraron 1.5 millones de personas que contrajeron la infección. Se ha reportado que el riesgo de contraer VIH es 25 veces mayor en Hombres que tienen Sexo con Hombres (HSH). Al menos 6,1 millones de personas en 2020, no conocían su estado seropositivo respecto a VIH.

Para 2020, se registró que 87% de las personas que conocían su estado seropositivo, tenían acceso a TAR y el 90% de estas, han logrado supresión viral. Desde el pico registrado en 2004, las muertes relacionadas con Sida se redujeron un 47%. Sin embargo, en 2020, cerca de 680 000 personas murieron por enfermedades relacionadas con Sida alrededor del mundo, en comparación con 1.9 millones en 2004 y 1.3 para 2010.

En México, de acuerdo al informe epidemiológico del VIH/Sida en la Ciudad de México en 2013, se estimó que, del total de personas de todas las edades con VIH, el 77% correspondían a hombres. En diciembre de 2016 se estimó para México que 220 mil personas vivían con VIH (200 - 240 mil). Para 2020, se estima que esta cifra ascenderá a 250 mil donde al menos 57% de las personas conocerán su estado serológico. La tasa de mortalidad por VIH se reportó de 3.8 por cada 100 mil habitantes (1.3 en mujeres y 6.4 en hombres) para el cierre de 2016.

En México, la prevalencia de VIH en la población de 15-49 años de edad es del 0.3%, es decir, 3 de cada mil personas vive con VIH. México tiene una epidemia concentrada, con poblaciones clave en la respuesta a la epidemia. Esta población clave, son HSH con una prevalencia de 17.3%, entre personas que se inyecten drogas con 5.8%, mujeres trabajadoras sexuales con 0.7% y hombres trabajadores sexuales con 24.1%, así como mujeres trans que varían entre 15 al 20%. De acuerdo al resumen de información de vigilancia epidemiológica, al 30 de septiembre de 2020, se registraron 6 478 casos nuevos diagnosticados de VIH, con una proporción de casos positivos en hombres de 85.3%. Además, se reporta que Quintana Roo, Colima, Yucatán, Veracruz y Baja California Sur, son los estados con mayor tasa de casos nuevos diagnosticados con VIH en 2020 (Ramírez 2020).

El aumento de la vulnerabilidad a VIH y otras infecciones de transmisión sexual (ITS) suele estar asociado a diversos factores, ya sean legales y/o sociales, esto aumenta la exposición a factores de riesgo y crean brechas para la accesibilidad a servicios de prevención, detección y tratamiento eficaz, de calidad y oportuno. Tales determinantes suelen ser: edad, género, comportamiento sexual, la accesibilidad a un centro de salud, los métodos de protección utilizados durante un encuentro sexual, el uso de fármacos o drogas, el nivel socioeconómico, nivel educativo e incluso la presencia de otra infección de transmisión sexual. El VIH puede transmitirse por diferentes vías, tales como: contacto sexual sin protección, exposición a sangre infectada ya sea por compartir agujas y jeringas contaminados, recepción de tejidos trasplantados, transmisión vertical (madre a hijo), exposición laboral (como los sexoservidores) (OMS, 2020; ONUSIDA 2020).

Para el año 2019, el *Global Burden Disease (GBD)* (Carga Global de la Enfermedad <https://vizhub.healthdata.org/lbd/hiv-mort-la>) estimó que las muertes causadas por VIH/Sida en hombres de entre 15 a 49 años de edad era de 6.11% (Ver Figura 1). En América latina, la tasa de mortalidad atribuida a VIH/Sida en varones de todas las edades varía de 6.9 a 8.7 defunciones por cada 100 000 habitantes. Mientras que, en Morelos, esta tasa es de 8 por cada 100 000 habitantes, en Cuernavaca se reporta de 10.6 por cada 100 000 habitantes.

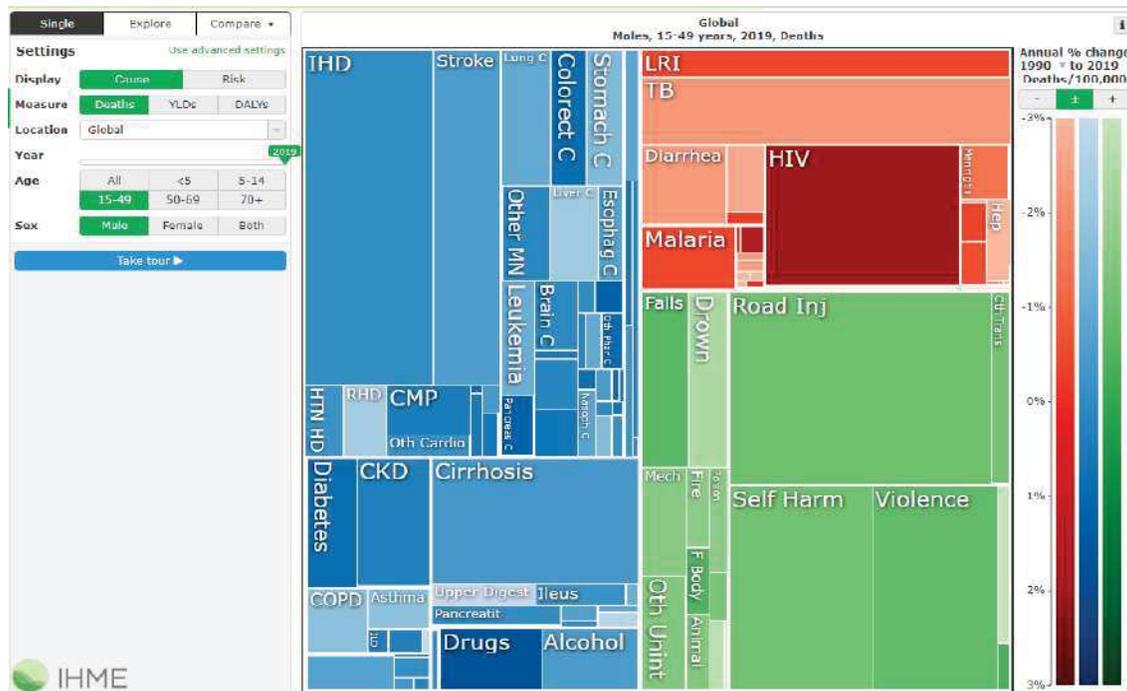


Figura 1Carga Global de la Enfermedad en hombres de 15-49 años de edad en 2017 (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>).

Para el año de 2025, la ONUSIDA estima que se necesitarán 29 000 millones de dólares americanos para la respuesta al Sida en países de bajos y medianos ingresos, incluyendo países que se consideraban altos, con el objetivo de eliminar al Sida como amenaza para la salud pública a nivel mundial (ONUSIDA, 2021).

1.1.4 Diagnóstico

Los eventos biológicos del propio virus y la respuesta serológica del hospedero tras la infección después de la exposición, producen una ventana de tiempo variable llamada “periodo de eclipse” en el que ninguna prueba diagnóstica es capaz de detectar el VIH. El ARN viral es el marcador más confiable para diagnóstico, ya que al menos el 50% de las personas infectadas tienen ARN plasmático detectable entre los 12 días post-infección y alcanzan un pico máximo entre los 20 y 30 días. A partir del día 15, la proteína p24 de la cápside viral, alcanza niveles detectables en el plasma. Esta proteína viral aumenta durante el primer mes, por lo que la respuesta inmunitaria genera anticuerpos anti-VIH (IgM y posteriormente IgG) para el día 50 y el antígeno con frecuencia se elimina del torrente sanguíneo. Esto complica el diagnóstico, dada la corta duración de p24 (Branson 2015; Delaney et al. 2017).

Fue en 1985 que la Administración de drogas y alimentos (FDA) de EEUU aprobó la primera prueba diagnóstica para VIH, y hasta el día de hoy se han desarrollado cuatro generaciones adicionales de pruebas de anticuerpos. Los de primera y segunda generación son capaces de detectar solo IgG. En este tipo de pruebas, los IgG de las muestras séricas de las PVV se unen a antígenos recombinantes o sintéticos inmovilizados en una fase sólida, usualmente son las glicoproteínas 41 y 36 del virus. Las pruebas de tercera generación se basan en la detección de IgM y el principio es el mismo que se utiliza para la primera y segunda generación. Estas pruebas se les denominan Ensayos ligados a enzimas (ELISA) de tipo “sandwich”. Por último, están las pruebas combinadas, antígeno - anticuerpo (Ag - Ab) conocidas como de cuarta generación. Esta última, combina la prueba de anticuerpos IgG e IgM para detección de p24 (Branson 2015; Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) et al. 2014).

En México, la Guía de Práctica Clínica señala que todas las personas de grupos vulnerables y/o con signos y síntomas de probable infección de VIH, se les debe realizar pruebas de ELISA y una segunda prueba confirmatoria que es el *Western Blot* o inmunofluorescencia indirecta. Una vez establecido el diagnóstico, se debe iniciar con un tratamiento inmediato y llevar un registro inicial de biometría hemática y química sanguínea, examen general de orina, pruebas de VDRL, hepatitis B y C, serología para CMV, carga viral y cuenta de linfocitos. Para la realización, el paciente con diagnóstico deberá continuar el estudio en una unidad de atención ambulatoria especializada o en un hospital de segundo nivel de atención, con recursos suficientes para estas pruebas y monitoreo (Hurt et al. 2017; Instituto Mexicano del Seguro Social 2017).

1.1.5 Tratamiento

Una vez diagnosticada la persona con VIH, se debe evaluar el estadio clínico e inmunológico y virológico de la infección para determinar el inicio de terapia antirretroviral. De acuerdo a CENSIDA y a la GPC de México, el tratamiento antirretroviral se debe iniciar en toda persona con enfermedad definitiva de Sida, en mujeres embarazadas, personas con nefropatías asociadas a VIH, personas co-infectadas con el virus de la hepatitis B y personas con infección crónica sintomática. Es indispensable evaluar de manera personalizada a cada persona para definir el momento adecuado para el inicio de TAR. La GPC recomienda el inicio de TAR en todas las personas infectadas por VIH, esto con el fin de evitar la o disminuir la transmisión del virus y limitar el efecto nocivo de posibles morbilidades (Instituto Mexicano del Seguro Social 2017).

El TAR consiste en el uso de medicamentos contra VIH para disminuir la carga viral. Por lo general, el régimen de tratamiento inicial incluye tres o más medicamentos contra VIH de por lo menos dos clases diferentes. En la tabla 2 se resumen las características de dichos tratamientos aprobados por la FDA.

Tabla 2. Tratamiento antirretroviral para VIH

Clase de medicamento	Nombre
Inhibidores de la transcriptas inversa análogos de los nucleósidos (ITIN)	
Bloquean la transcriptas inversa y evita que el VIH se replique	Abacavir (sulfato de bacavir, ABC); Emtricitabina (FTC), Lamivudina (3TC), Fumarato de disoproxili de tenofovir (tenofovir DF, TDF); Zidovudina (azidotimidina, AZT, ZDV).
Inhibidores de la transcriptas inversa no análogos de los nucleósidos (ITINN)	
Altera la transcriptas inversa viral.	Doravirina (DOR); Efavirenz (EFV); Etravirina (ETR); Nevirapina (nevaripina de liberación lenta, NVP); Rilpivirina, RPV).
Inhibidores de la proteasa (IP)	
Bloquean la proteasa del VIH, impide la maduración del virión.	Atazanavir (sulfato de atazanavir, ATV); Darunavir (etalonato de darunavir, DVR); Fosamprenavir (fosamprenavir cálcico, FOS-APV, FPV); Ritonavir (RTV), Saquinavir (mesilato de saquinavir, SQV); Tipranavir (TPV)
Inhibidores de fusión	
Impide que el VIH interactue de manera eficaz al linfocito CD4	Enfuvirtida (T-20)
Antagonista de CCR5	
Bloquea los correceptores CCR5 en la superficie de los linfocitos CD4	Maraviroc (MVC)
Inhibidores de integrada	
Bloquea la integrada del VIH, por lo que impide que el cDNA retrotranscrito del VIH se integre al DNA celular.	Dolutegravir (DTG, dolutegravir sódico), Elvitegravir (EVG), Raltegravir (potasio de raltegravir, RAL).
Inhibidores de post-fijación	

Clase de medicamento	Nombre
Bloquea los receptores de CD4 en la superficie de los linfocitos.	Ibalizumab-uiyk (Hu5A8, Ibalizumab, TMB-355, TNX-355).
Potenciadores farmacocinéticos	
Incrementa la eficacia de un medicamento contra el VIH	Cobicistat (COBI, c)

Fuente. Elaboración propia

En México, el TAR es de acceso universal y gratuito para las personas con VIH desde 2003, ya que se busca normalizar la supervivencia de las personas con VIH y disminuir la transmisión del virus en 96% y acabar de manera rápida con el Sida. De cada 3 personas con VIH en TAR se atienden en alguno de los 139 servicios especializados en atención del VIH (CAPASITS y SAI), siendo 85, 838 persona en TAR para cierre del primer semestre en 2017. La meta para 2020 era que al menos 81% PVV se encuentren en TAR, con una cifra base de 250 mil PVV en México.

En México, de acuerdo al CENSIDA, al 31 de marzo de 2021, se registraron 112 497 PVV en TAR de los cuales se analizaron 36 836 (32%) que correspondían a PVV en TAR ininterrumpido hasta por 6 meses. De estas PVV se reportó una indetectabilidad del 76%, lo que sugiere buena adherencia al tratamiento. Durante el año 2020, Bictarvy se posicionó como el TAR más empleado en el país, incluyendo Morelos.

1.2 *Treponema pallidum pallidum*

1.2.1 Generalidades

La sífilis es una infección de transmisión sexual causada por la espiroqueta Gram negativa *Treponema pallidum subs pallidum* (Peeling et al. 2017). Durante el siglo XIX, se creían infectados cerca del 10 al 20% de la población europea y americana; posteriormente se descubrió que podría ser tratada con penicilina y con lo cual se estuvo a punto de eliminar la infección en países de occidente. Sin embargo, en la década de 1990 re-emergió y actualmente predomina en HSH (Salado-Rasmussen 2015). Es importante destacar que la infección por *T. pallidum* puede ser una infección crónica y de no ser tratada, causa complicaciones irreversibles neurológicas y/o cardiovasculares (Hook 2017).

1.2.2 Estructura de la bacteria

Treponema pallidum subs. *pallidum* (Tpp) es una espiroqueta que puede llegar a medir 0.15 μm x 6 μm – 15 μm . No es una bacteria que pueda crecer fácilmente en cultivo, sin embargo, hay estudios e investigaciones que han logrado mantener condiciones muy específicas y controladas para la supervivencia de esta bacteria. *T. pallidum* no presenta factores de virulencia que induzca daño al tejido. Sin embargo, posee lípidos, pero es atóxico. No posee toxinas ni libera productos con actividad enzimática. La membrana externa tiene la capacidad de formar una capa anfófica a su alrededor mediante proteínas del hospedero, esto le proporciona la habilidad de evadir al sistema inmune (Edmondson, Hu, y Norris 2018; Hook 2017; Salado-Rasmussen 2015).

1.2.3 Patogénesis e historia natural de la enfermedad

La sífilis al ser una infección de transmisión sexual, la vía de transmisión puede ser sangre o contacto con alguna lesión durante este acto. No obstante, existe la transmisión de madre a hijo la cual se conoce como sífilis congénita (Hook 2017). *T. pallidum* toma aproximadamente 3 semanas de incubación a partir de la inoculación, esta bacteria es capaz de atravesar mucosa, alcanzar vasos linfáticos y sangre, para ser una infección sistémica (Hook 2017; Sánchez Alemán et al. 2015).

Como toda enfermedad, sífilis cuenta con un periodo pre-patogénico, donde una persona infectada con *Treponema pallidum* tiene una relación sexual sin protección con una persona no infectada. Esta interacción da inicio al periodo patogénico o sífilis primaria, donde el microorganismo se incuba de 3 a 90 días hasta la primera aparición de una úlcera genital conocida como chancro, comúnmente única e indolora. La enfermedad se auto-resuelve en cuestión de semanas o meses, por lo que surge un periodo de latencia que, de manera similar, dura algunos meses hasta la reactivación de la bacteria. En este segundo estadio, conocido como sífilis secundaria, el periodo de duración consta de 2 a 6 semanas, caracterizado frecuentemente por la presencia de lesiones mucocutáneas y palmo-plantares. Nuevamente surge un periodo de latencia que puede durar desde algunos meses hasta años, hasta que suceda una segunda reactivación, conocida como sífilis terciaria. Este último estadio, es caracterizado por la forma más severa de la enfermedad, donde el daño se ha diseminado a sistema nervioso central y sistema cardiovascular, provocando complicaciones hasta llegar a la muerte.

Es importante mencionar que, para la prevención de adquisición de sífilis, es necesario el uso de condón o abstinencia. Para el segundo nivel de prevención, se requiere de un diagnóstico precoz y tratamiento oportuno como el uso de antibiótico, monitoreo y análisis periódico, el uso de condón o abstinencia. En el último módulo de prevención, es necesario acudir con un experto

que monitoree y rehabilite a la persona infectada, así como hacer uso constante de condón para evitar la diseminación de la bacteria (Peeling et al. 2017; Hook 2017).

1.2.4 Epidemiología

En 2005, la Organización Mundial de la Salud (OMS) detectó 448 millones de casos nuevos de infecciones de transmisión sexual (ITS) curables entre personas de 15 a 49 años, de los cuales al menos 11 millones correspondían a sífilis, por lo que se estimó una incidencia a nivel mundial de 3.02 y 3.19 en mujeres y hombres respectivamente (Sánchez Alemán et al. 2015).

Para el año de 2016, se estimó 5.6 millones de casos nuevos de sífilis en adolescentes y adultos de 15 a 49 años de edad a nivel mundial, por lo que la tasa de incidencia se calculó de 1.5 casos por cada 1000 mujeres y 1.5 casos por cada 1000 hombres ((«OPS/OMS | Sífilis» 2020)).

Más de 5 millones de casos nuevos a nivel mundial son diagnosticados con sífilis cada año. Al menos 15-20% en EE.UU. ya habían tenido una previa infección (Hook 2017; Peeling et al. 2017). En América, la incidencia es de 5.06 en mujeres y 5.33 en hombres, es decir, 1.05 veces más frecuente en hombres (Sánchez Alemán et al. 2015).

En 2012, en la Región de las Américas había cerca de 1 millón de casos ya existentes de sífilis en mujeres y 992.000 casos ya existentes en hombres. Determinados grupos de población clave como lo son HSH se ven afectados de manera desproporcionadamente alta, pues siguen presentado una carga elevada de sífilis, que de acuerdo a la OMS, este porcentaje varía del 1 al 27% («OPS/OMS | Sífilis» 2020).

En EE.UU. se ha reportado un incremento de ITS entre 2011 a 2015, este aumento es de 18% para sífilis (14.8 a 23.4 casos), gonorrea 13% (103.3 a 123.9 casos) y 6% para clamidia (453.4 a 478.8 casos). Existen registros que reportan a San Francisco como uno de los estados con mayor aumento para estas ITS, sífilis temprana con 77% (84.3 a 149.6 casos), gonorrea 90% (278.9 a 529.8 casos) y clamidia con 53% (587.9 a 899.2 casos). Es importante destacar que la población de HSH tiende a tener tasas elevadas de ITS debido a su comportamiento sexual. Sin embargo, en contraste al aumento de ITS, el número de casos para VIH ha ido disminuyendo en años recientes en San Francisco, en 2012 se contaba con 453 casos y en 2015 este número disminuyó a 265, es decir 41.5% (Chen et al. 2018).

Este último estudio fue realizado entre 2007 a 2014 (Chen et al. 2018) en San Francisco, Estados Unidos, reportó 5,745 casos de sífilis temprana, 66% entre personas co-infectadas con VIH,

donde los HSH fueron mayoría. Para sífilis temprana y la co-infección por VIH, entre los HSH, los latinos fueron más propensos, mientras que los provenientes de Asia/Pacífico tenían menor probabilidad de tener una co-infección por VIH. De acuerdo a esta investigación, la edad avanzada en el momento de diagnóstico y la historia previa de una ITS fueron factores que se asociaron significativamente con sífilis temprana y co-infección por VIH. Personas transgénero, edad avanzada, procedencia (latinos), antecedentes de ITS son más propensos a tener co-infección, mientras que los HSH de Asia tienen menor probabilidad de una co-infección por sífilis, gonorrea o clamidia. Cerca del 40% de las personas diagnosticadas con sífilis temprana, se encontraban infectados con VIH al momento del diagnóstico de sífilis y al menos 3.5-4% de los pacientes VIH negativos se infectan por VIH un año después del diagnóstico por sífilis (Hook 2017). De acuerdo al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), se ha determinado un fuerte incremento de sífilis adquirida en los últimos años de hasta 76% («Reported STDs in the United States, 2017» 2018). Una revisión sistemática y meta análisis realizado por Tsuboi et al. 2021 estimó una prevalencia agrupada en HSH de 10.6% para América Latina y Caribe en los años 2000 a 2020.

La infección por *T. pallidum* en México, es de notificación con carácter obligatorio semanal ante la sospecha de caso, por lo que existen estadísticas año con año. En México, la incidencia como a nivel mundial, ha ido en aumento. En 2003 se registraron 2.13 casos por cada 100 000 habitantes, mientras que para el 2013 aumento a 3.25 (Sánchez Alemán et al. 2015).

Para el cierre de 2019, el anuario de morbilidad de México, reportó una incidencia global de 6.09 casos por cada 100 000 habitantes mayores a un año de edad, concentrándose una mayor incidencia en los grupos de edad de 15 a 44 años. Para el grupo de edad de 15 a 19, se reportó una tasa de incidencia de 8.38 casos, para el grupo de 20 a 24 años de edad fue de 15.82 casos y para el grupo de 25 a 44 fue de 10.05 casos por cada 100 000 habitantes. Por lo anterior, es evidente el ascenso de casos por sífilis adquirida y la importancia de atención en Salud Pública (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2020).

1.2.5 Diagnóstico

El diagnóstico clínico se basa en la detección de signos y síntomas que reporta el hospedero. La sífilis suele manifestarse de múltiples formas y de manera muy sutil, por lo que un diagnóstico clínico pudiera enmascarar a esta enfermedad o bien confundirse con otras infecciones. Las lesiones características de la sífilis primaria pueden ser subdiagnosticadas, ya que pueden aparecer en sitios ocultos como el recto. Además, no todas las personas infectadas suelen acudir

a un especialista en busca de tratamiento, pues podrían sentirse estigmatizadas (Instituto Mexicano del Seguro Social 2009).

Es importante que, además de contar con una revisión clínica, se realicen pruebas directas, esto permite diagnosticar de manera más precisa y oportuna a la infección. Otra ventana de oportunidad es el diagnóstico serológico para personas asintomáticas. Las pruebas serológicas para sífilis se clasifican de manera general en dos tipos: pruebas treponémicas (PT) y pruebas no treponémicas (PNT) (Instituto Mexicano del Seguro Social 2009).

1.2.6 Pruebas treponémicas

Las PT detectan anticuerpos dirigidos contra proteínas de *T. pallidum* y son específicos. Sin embargo, aún con la persistencia de anticuerpos generados a partir de la infección por la bacteria, no es posible distinguir entre una infección activa o curada. Es importante mencionar que estos anticuerpos generados, no son neutralizantes, por lo que no evitarán una re-infección en exposiciones posteriores (Instituto Mexicano del Seguro Social 2009; Peeling et al. 2017).

Las PT se utilizan como prueba confirmatoria en un diagnóstico de PNT positiva. Los resultados de PT son positivos entre los días 6 y 14 después de la aparición del chancro, por lo que es muy útil para detectar sífilis primaria. A continuación, se describen las PT:

- Prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS)
- Ensayo de microhemaglutinación (MHA-TP)
- Prueba de aglutinación pasiva.
- Ensayos de hemaglutinación.
- Pruebas de ELISA.
- Tiras inmunocromatográficas.

Estas pruebas requieren de personal capacitado para determinar si es positivo o negativo, además son relativamente más costosas que las PNT y técnicamente más complejas, ya que requieren equipo y reactivos más especializados. Para aminorar costos, en los últimos años se han implementado técnicas con antígenos recombinantes de *T. Pallidum* en inmunoensayos enzimáticos (ELISA) y de quimioluminiscencia (CIA). Son de gran utilidad ya que son automáticos o semiautomatizados, se leen por espectrofotometría, esto les confiere la ventaja de no ser subjetivos a un técnico especializado, además se procesa mayor número de muestras en un solo ensayo (Instituto Mexicano del Seguro Social 2009; Peeling et al. 2017).

1.2.7 Pruebas no treponémicas

Las PNT detectan inmunoglobulinas séricas (IgG e IgM) producidas en respuesta al material lipídico liberado por *T. pallidum*. Las PNT más utilizadas son:

- Prueba de reaginación plasmática rápida (RPR)
- Prueba de suero rojo sin calentar de toluidina (TRUST)
- Pruebas de laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas (VDRL)

El fundamento de todas estas pruebas consiste en floculación o precipitación que detectan los anticuerpos contra el complejo lipídico en suspensión (lecitina - cardiolíipina - colesterol); esto provoca una reacción cruzada de anticuerpos al no ser específicos contra *T. pallidum*. Esto último, confiere desventajas al detectar falsos positivos. Sin embargo, la ventaja de las PNT es la facilidad de detectar una sífilis activa de acuerdo al título de anticuerpos (Ver tabla 3), aun siendo asintomático, o bien un estadio latente o curado (Pillay 2018a; Peeling et al. 2017; Instituto Mexicano del Seguro Social 2009).

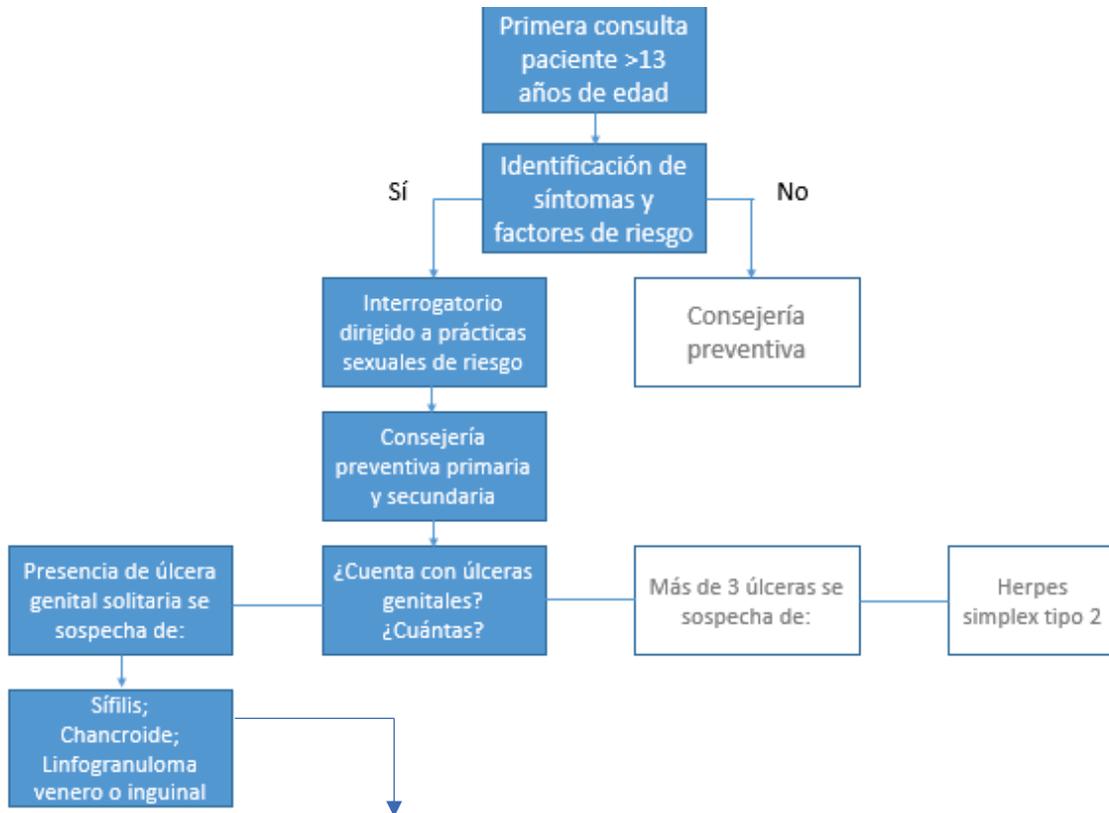
Diagnóstico

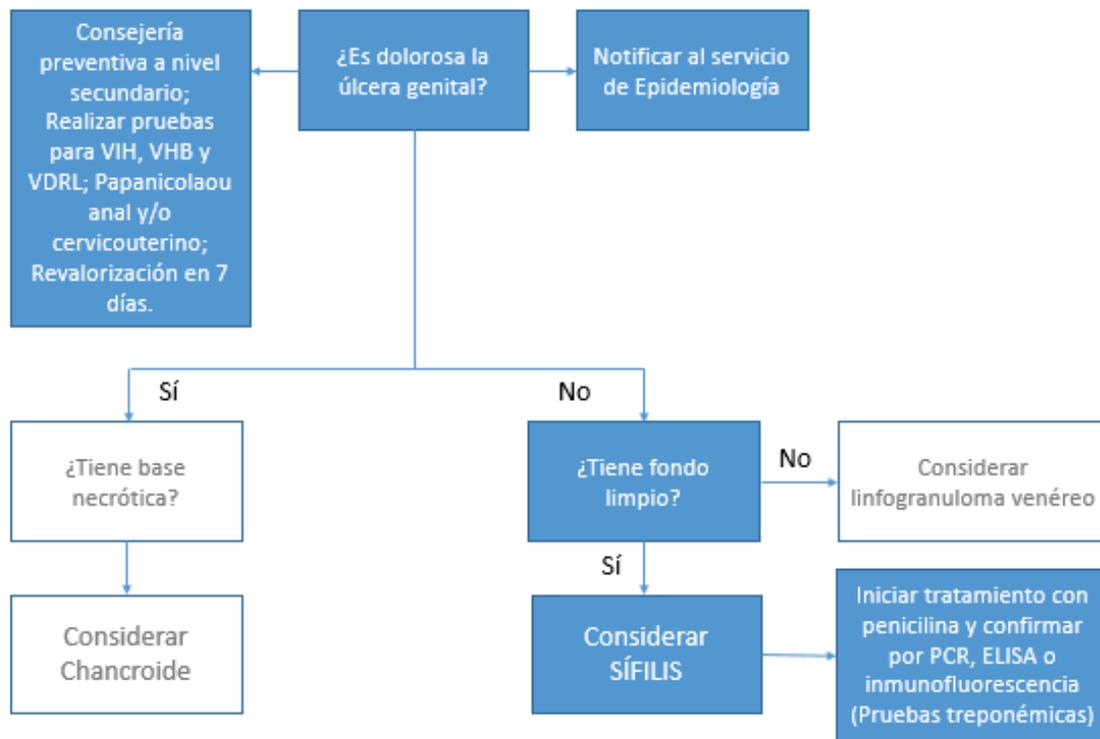


Tabla 3. Tipos de diagnóstico para sífilis
Fuente. Elaboración propia

Cada país cuenta con guías de práctica clínica o consensos dirigidos por expertos, esto, con el fin de establecer un referente nacional para orientar la toma de decisiones clínicas basadas en recomendaciones sustentadas en la mejor evidencia posible. En México, de acuerdo a la Guía de Práctica Clínica (GPC) elaborada por el Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC), recomienda, cuando sea posible, realizar pruebas confirmatorias como: la reacción

en cadena polimerasa (PCR), Pruebas de ensayo luminiscente, hemaglutinación, inmunoensayos para detección de IgG e IgM y prueba de anticuerpos fluorescentes absorbidos. Así como realizar VDRL de manera obligatoria en caso de sospecha y antes del tratamiento para dar un seguimiento preciso posterior al antibiótico recetado (Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud 2009) (Ver Esquema 1). Este algoritmo de detección, es clásico. Sin embargo, en el instituto nacional de salud pública se realiza de manera reversa, recomendado por el CDC, es decir, una prueba no treponémica y se confirma por una treponémica.





Esquema 1. Algoritmo de detección clásico para Sífilis. Tomado y adaptado de GPC Cenetec 2009.

1.2.8 Tratamiento

Desde el descubrimiento (1928) hasta el primer uso (1943) de la penicilina, este ha sido el principal tratamiento para la sífilis. Aunque no se demostró su eficacia y seguridad en ensayos controlados aleatorizados, el uso de penicilina es superior a todos los tratamientos previos, como baños de mercurio o el uso de herbología. Además, no se ha registrado riesgo de resistencia bacteriana a este antibiótico. Debido a que el crecimiento de *T. pallidum* es lento, en comparación con otras bacterias, se requieren mantener los niveles de penicilina en sangre por encima de la concentración inhibitoria durante más de 10 días. La vía de administración es a través de una inyección intramuscular de dosis única de penicilina G de benzatína de acción prolongada. Las personas con sífilis severa (estadio terciario) deben someterse a un tratamiento intensivo. Tanto el Centro de Control de enfermedades (CDC) y las directrices europeas de la Unión Internacional contra Infecciones de transmisión sexual, recomiendan el uso de penicilina para personas con sífilis (Peeling et al. 2017; Pillay 2018a).

En México, la GPC recomienda el uso de penicilina G Benzatínica 2.4 millones de UI IM en dosis única como primera opción. Sin embargo, hay pacientes alérgicos a la penicilina o que prefieren otras vías de administración, a ellos se les recomienda 100 miligramo de doxiciclina vía oral cada

12 horas por 14 días o 1 gramo de ceftriaxona vía intravenosa o intramuscular por 10 días (Instituto Mexicano del Seguro Social 2009). La OMS ha descrito que la preferencia de doxiciclina sobre la ceftriaxona debido a menor costo y administración oral.

2. Antecedentes

2.1. Sistema inmunológico

El sistema inmune es la primera barrera de defensa contra cualquier patógeno. Este sistema está conformado por diversas células con diferentes fenotipos, pero un mismo objetivo: mantener sano al individuo. De manera muy general, este se divide en sistema inmune innato que es la primera línea de defensa, con la que se nace, y la inmunidad adquirida, que se adquiere a través del tiempo y tiene memoria inmunológica. La respuesta inmune innata está conformada por células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos y linfocitos NK (*"Natural Killer"* o células asesinas); mientras que el sistema inmune adaptativo está conformado por Linfocitos T y B. Los linfocitos B son los responsables de secretar anticuerpos, por otro lado, los linfocitos T se subdividen en linfocitos T cooperadores (T_H , por *T helper*) y linfocitos T citotóxicos (T_C) (Kubby 1997; Janeway et al. 1999; ABBAS, LICHTMAN, y POBER 1999).

Los linfocitos T_H expresan el marcador CD4 en superficie, mientras que los linfocitos T_C , CD8. Ambos linfocitos expresan CD3 en superficie, esto los identifica como linfocitos T. Dentro de los linfocitos T_H , aún hay diversas categorías como: T_{H1} , T_{H2} , T_{H3} , T_{H9} , T_{H17} , T_{H22} y T_{H25} . Lo que define la maduración y polarización (es decir, hacia qué perfil se identifica) de estas células, es el impulso por la fuerza de la señal a través del TCR (receptor de célula T), el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC) y la célula presentadora de antígeno. Esto se conoce como presentación canónica. Además, el perfil está estrechamente asociado por las señales ambientales como las citocinas, quimiocinas e interacciones con otras células que no son presentadoras de antígeno (Agosto y Henderson 2018).

Las células T_H1 son características de un perfil proinflamatorio, suele asociarse con fuerte señalización de una presentación canónica. Mientras que las células T_H2 , que pertenecen a un perfil anti-inflamatorio, suelen estar asociados a menor señalización o menor afinidad en la presentación canónica. Las células T_H3 o células T reguladoras (Treg), como el nombre lo indica, regulan respuestas exacerbadas de cualquier perfil, con el fin de mantener un equilibrio celular, pues cualquier señalización extrema no suele tener un buen final. Una señalización más fuerte de lo normal, pudiera segregar células T naïve (vírgenes, o que no han encontrado antígeno) hacia subconjuntos efectores que tienen una vida relativamente corta. Una señalización muy débil en respuesta al antígeno, puede conducir a anergia (Agosto y Henderson 2018; Caza y

Landas 2015). Este reconocimiento antigénico perfectamente equilibrado se conoce como sinapsis infecciosa. Para determinar la polaridad celular de linfocitos T, es necesaria esta sinapsis infecciosa, pues de acuerdo al estímulo que reciban tanto ambiental como las interacciones celulares, determinaran hacia qué perfil se caracteriza, esto a través de factores de transcripción que son canónicos (exclusivos) del linfocito T (Ver

Tabla 4).

Tabla 4. Linaje de linfocitos T y características generales

Linfocito	Factor de transcripción	Citocinas efectoras	Función
T_H1	T-bet/STAT1	IFN- γ , TNF, linfotóxina A	Inmunidad celular; Activa macrófagos. Respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH); Eliminación de patógenos intracelulares y células tumorales.
T_H2	Gata-3	IL-4, IL-5, IL-13, IL-10	Inmunidad humoral; Estimula eosinófilos, basófilos y mastocitos. eliminación de bacterias y parásitos. Estimula células B para producir IgE e IgA.
T_H3 (T_{reg})	Foxp3	IL-10, TGF- β 1	Suprime respuesta inmune pro y anti inflamatoria (regula). Mantiene tolerancia/protección contra autoinmunidad.
T_H9	BATF	IL-9, IL-10	Protección contra infecciones por parásitos, gusanos/helminetos. Promueve reclutamiento mastocitos. Promueve expansión celular.
T_H17	ROR γ t	IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF e IL-10	Protección en superficie de mucosas. Promueven reclutamiento de neutrófilos. Eliminación de bacterias extracelulares y hongos.
T_H22	Receptor aril-hidrocarbon / STAT3	IL-22, IL-13, FGF, CCL15, CCL17, TNF.	Inmunidad en mucosas. Prevención de traslocación de microbios en superficie epitelial. Promueve reparación epitelial.
T_H25	Act1	IL-25, IL-4, IL-5, IL-13.	Inmunidad de mucosas; Estimula células no linfoides para la producción de IL-4; Limita la inflamación mediada por Th1 y Th17.

T_Hf (T foliculares)	MAF	IL-21, OX40, ICOS	Estimulan a las células B a producir anticuerpos con mayor afinidad. Guían la migración a centros germinales.
---	-----	-------------------	---

Fuente. Elaboración propia a partir de (Caza y Landas 2015; Agosto y Henderson 2018).

2.1.1 Inmunología viral

Dentro de la historia natural de la infección por VIH, diversos autores han considerado esencial el estudio de la respuesta inmune celular y humoral del hospedero. La alta activación del sistema inmune tiene un papel fundamental en la patogénesis del VIH. Diversos estudios han asociado la activación inmune elevada con la eliminación o disminución de células T CD4+ y la progresión a Sida. Durante la infección primaria por VIH, la carga viral puede alcanzar valores de más de 1 millón de copias de RNA viral por mililitro, lo que origina una disminución de células T CD4+ por la infección del virus a los linfocitos. Esto ocurre de la siguiente manera, en la infección primaria, posterior a la activación de la retro-transcripción viral, la proteína IFI16 (proteína inducible por interferón gamma), actúa como un sensor intracelular de DNA y activa una cascada inflamatoria. Posteriormente se produce piroptosis inducida por la caspasa 1 y la liberación de IL-1 β . Esta citocina (IL-1 β) provoca un ambiente proinflamatorio, mismo que altera a las células adyacentes e induce su muerte programada, debido a una reacción en cadena e inducir un estado de inflamación crónico conocido como “tormenta de citocinas”. Si el virus logra evadir a IFI16 e integra el DNA viral al DNA celular, la proteína PK puede detectar este cambio y causar apoptosis. Por otro lado, si el DNA viral se integra de manera exitosa y se liberan múltiples copias del virus, la caspasa 8 detecta este problema e induce la vía de apoptosis (Altfeld y Gale Jr 2015).

Los anticuerpos también tienen una participación relevante. La generación de anticuerpos (IgG anti VIH) al cabo de un mes de infección, pueden marcar a la célula infectada (opsonización) para ser destruidas por otras células fagocíticas, como los macrófagos. Una vez que la célula expresa proteínas virales en su superficie, las células T CD8 (células citotóxicas) pueden detectarla como infectada y destruirla (Figura 1).

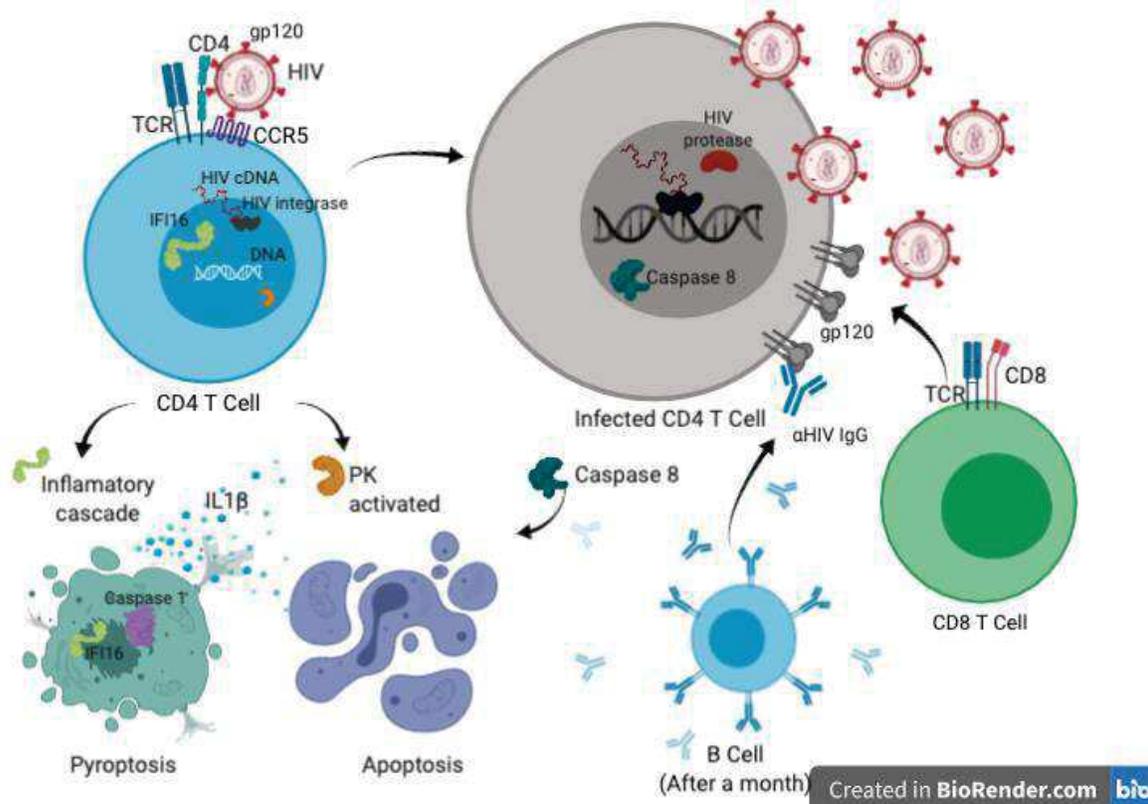
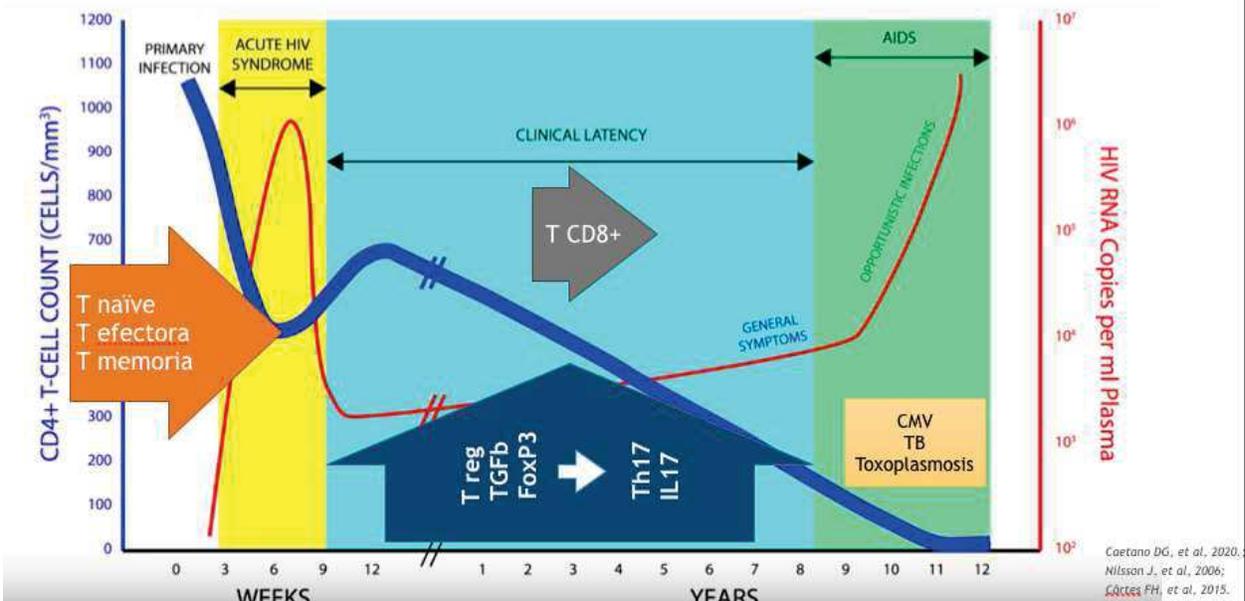


Figura 2. Respuesta inmune contra VIH. Elaboración propia

Durante la enfermedad, se ha descrito que, aunque haya disminución de linfocitos T CD4, el sistema inmune cuenta con diversos mecanismos de compensación. Sin embargo, no todos los mecanismos suelen ser benéficos. Se ha reportado que la infección por VIH disminuye células T *naïve*, las cuales no maduraran a células T efectoras ni de memoria. En el transcurso de la enfermedad, el VIH se ha asociado con la sobre activación del factor de transcripción canónico FoxP3, que permite la polaridad de las células T hacia un perfil regulador (T_{H3} o T_{reg}), se ha reportado que el porcentaje de células Treg se incrementa hasta 3 veces más que en aquellos que no tienen infección. Además, estas células suelen expresar citocinas muy características como IL-10 y TGF- β 1 (Caruso et al. 2019; Kolte et al. 2009; Nilsson et al. 2006). Se ha descrito que estas citocinas aumentan y regulan la respuesta del sistema inmune, sin embargo, esto favorece la progresión de la enfermedad y estimula la polarización de células T_{H17} mediante el factor de transcripción ROR- γ t (RORc). Esta última subpoblación de células T, se ha descrito que tienen un papel proinflamatorio caracterizado por la secreción de IL-17 en etapas tardías de la enfermedad, aún con TAR o en aquellos que controlan la enfermedad (Caruso et al. 2019; Nilsson et al. 2006; Caetano et al. 2020) (Figura 2).

Figura 3. Progresión de la enfermedad de VIH

Progresión de la enfermedad



Fuente. Modificado a partir de (Epstein et al. 1993)(Caetano et al. 2020; Nilsson et al. 2006). Elaboración propia

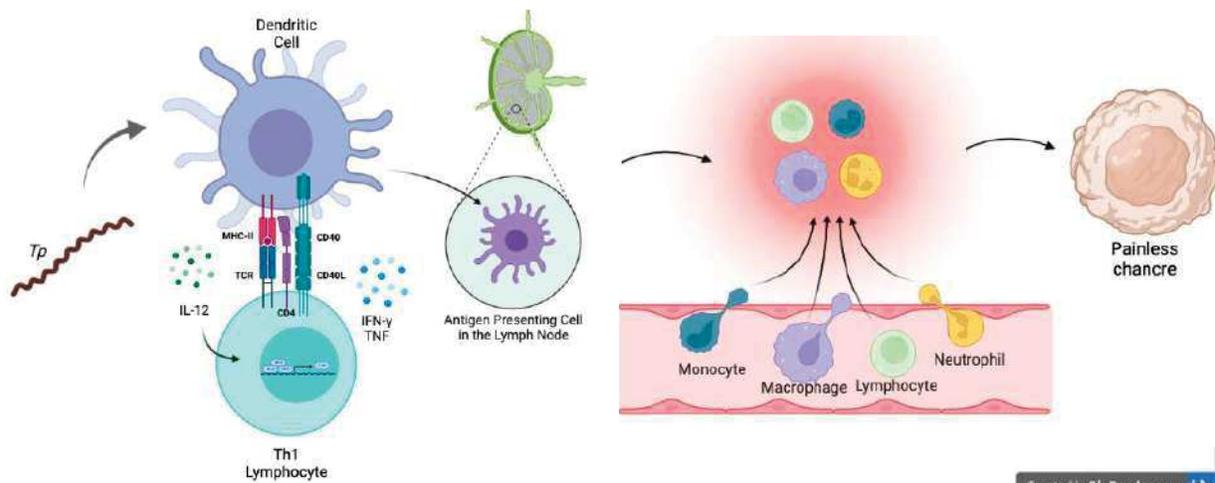
2.1.2. Inmunología de sífilis.

Mucho se conoce sobre la historia natural (HN) de la sífilis y su manifestación clínica, pero poco se sabe acerca de la interacción de *Treponema pallidum* subs. *pallidum* con el sistema inmune. Dentro de las características más importantes se sabe que *T. pallidum* es un organismo de doble membrana, con un ciclo de replicación extra celular. Ya que carece de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) como lipopolisacáridos (LPS) en la membrana externa, esto le confiere la habilidad de evasión al sistema inmune innato. Sin embargo, la membrana interna tiene estos LPS, los cuales pueden ser reconocidos mediante receptores de tipo *toll* (TLR) 1 y 2, ya que en conjunto estos reconocen lipoproteínas, las lipoproteínas de membrana de *T. pallidum* forman un complejo que mimetizan la cardiolipina, lecitina y colesterol, lipoproteínas humanas. Esto podría suponer un problema importante, ya que se estarían generando anticuerpos contra estas lipoproteínas y más tarde desarrollar algún tipo de autoinmunidad. Asimismo, es conocido que esta bacteria activa la vía clásica de complemento, misma que al formar el poro en la membrana bacteriana, deja al descubierto la membrana interna.

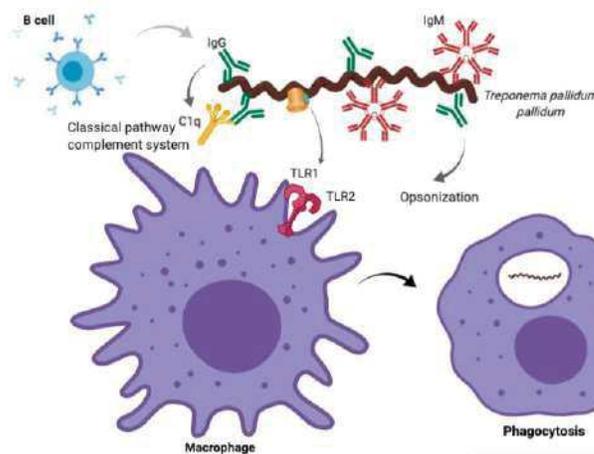
Durante la HNE de sífilis, se conoce que el primer contacto con el sistema inmune es mediante una célula presentadora de antígeno que capta y procesa a *T. pallidum* para que los antígenos

sean presentados a la célula T cooperadora (Th) mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II). La célula presentadora de antígeno secreta interleucina 12 (IL-12) como primera citocina que tiene el papel de estimular a la célula Th para producir una respuesta pro-inflamatoria productora de IFN- γ y TNF. Estas citocinas se han correlacionado y asociado de manera clínica con la presencia de chancro e inflamación de ganglios linfáticos inguinales (Roberts y Klausner 2016) (Ver Figura 4). Debido a la baja densidad de proteínas de membrana externa bacteriana, la respuesta de anticuerpos es limitada y poco probable que sea suficiente para controlar la replicación y evitar la diseminación. El papel de los anticuerpos es oponizar a la bacteria para aumentar la captación y degradación de esta en los tejidos y permitir la interacción de PAMP's y TLR's que recubren la vacuola fagocítica (Cruz et al. 2012).

Figura 4. Presentación de *Treponema pallidum pallidum* e inmunología de sífilis



Created in BioRender.com bio



Created in BioRender.com bio

Fuente. Elaboración propia.

Como parte de la HNE de la sífilis se describen tres estadios: sífilis primaria, secundaria y terciaria. Se conoce bien el cuadro clínico de las tres fases de la enfermedad, sin embargo, no queda claro qué permite pasar de un estadio al otro. De acuerdo a una revisión sistemática de

literatura previa, se ha reportado que, dentro de una infección primaria, predomina una respuesta proinflamatoria donde las células T_H1 y Treg son responsables de controlar y eliminar la infección al estimular la actividad fagocítica de macrófagos, a través de la secreción de IFN- γ e IL-10. Esta última citocina es importante para no generar una respuesta inflamatoria exacerbada. Por otra parte, la respuesta de células T_H2 parece no ser significativa, ya que no se asoció ninguna citocina no inflamatoria responsable del control de la infección (Leader et al. 2007) por lo que pareciera no jugar un papel crucial en la HNE. Al estudiar una respuesta secundaria por sífilis, se encontró nuevamente que las células responsables de controlar la infección son tanto Th1 como Treg y células *Natural killer* (NK) se suman a esta respuesta. Este último grupo celular, se detecta a nivel local de la infección, es decir, donde se encuentre la úlcera, mientras que las Th1 y Treg se encuentran predominantemente a nivel sistémico (Leader et al. 2007; Carlson et al. 2011; Cruz et al. 2012; Babolin et al. 2011; Zhao et al. 2016). En un estadio terciario, se logró identificar que la respuesta de células Th17 y secreción de IL-17 es alta, a diferencia de un estadio primario donde se reportó que había una respuesta baja (Zhao et al. 2016; Wang et al. 2014; Li et al. 2017) a nivel sistémico, mientras que en líquido cerebroespinal (CSF) se ha reportado la presencia de anticuerpos tipo IgM e IgG (He et al. 2015; Yu et al. 2017) en personas con neurosífilis.

2.1.3. Sistema inmune durante la co-infección VIH/sífilis.

Como parte de una revisión sistemática de literatura realizada previamente, se encontraron artículos que describen la HNE de la co-infección (Ver Anexo 2). Es importante notar que son pocos los estudios referentes a esta co-infección y que la interacción entre ambos aún no queda clara, por lo que surgen preguntas a investigar y problemas por resolver. Al menos 4 estudios de los 87 artículos de interés, hablan sobre la interacción de sistema inmune y la co-infección entre sífilis y VIH.

De acuerdo a Kotsafti et al. 2016, la respuesta de células T CD4⁺ presentó un decremento del 85% y 80% en personas con tratamiento antirretroviral (TAR) y sin TAR respectivamente. En este estudio retrospectivo, el objetivo fue evaluar si la infección por sífilis temprana (duración no mayor a 2 años) afectaba o no los marcadores de infección por VIH, es decir, células T CD4 y la carga viral en 160 pacientes VIH positivos. De estos 160 pacientes, al menos el 70% recibían TAR. Ellos describen que la infección por sífilis tuvo un impacto negativo en el recuento de células T CD4⁺ y que después del tratamiento contra sífilis, estos niveles se re-establecieron en ambos grupos de pacientes (con TAR y sin TAR).

Knudsen (Knudsen, Benfield, y Kofoed 2009), describió que la co-infección primaria de 36 pacientes se asoció con el aumento de IL-10 y, que en conjunto con TNF disminuyen su concentración después del tratamiento contra sífilis. Knudsen y colaboradores, estudiaron en 36 pacientes co-infectados muestras séricas antes, durante y después de la infección por sífilis. En las muestras se detectó la presencia de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ y TNF. Ellos reportaron que los niveles de IL-10 aumentaron significativamente en pacientes con sífilis primaria/secundaria desde una mediana de 12.8 pg/ml (intervalo intercuartil (IQR), 11-27.8) antes de la infección, a 46.7 pg/ml (IQR, 28.4-78.9) a momento del diagnóstico y descendió a 13 pg/ml (IQR, 6.2-19.4) después del tratamiento antibiótico. Para TNF se obtuvieron valores no significativos antes y durante la infección, con una mediana de 3.9 pg/ml y 9 pg/ml respectivamente (IQR, 3.3-9.6 y 5.4-12.6, respectivamente; $p=0.31$). Sin embargo, TNF se asoció con un decremento post-tratamiento de sífilis, con una mediana de 4.2 pg/ml (IQR, 2.7 a 6.8; $p<0.001$). También reportan que no encontraron cambios significativos durante un estadio de sífilis latente y que los valores de ARN viral se correlacionan de manera positiva con los niveles de concentración de IL-10 y TNF en plasma de pacientes co-infectados.

Kenyon (Kenyon et al. 2017a), realizó un estudio prospectivo con 79 PVV y 12 personas sin infección por VIH, con nuevo diagnóstico de sífilis. A través de muestras de sangre periférica, detectaron los niveles de IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 e IL-17a al inicio del tratamiento antibiótico y 6 meses después. Reportan que el nivel de IL-10 fue significativamente mayor (9 veces mayor) en sífilis primaria/secundaria (co-infectados) en comparación con aquellas personas sin VIH (25.3 pg/ml y 2.73 pg/ml, respectivamente). Los valores de IL-10 disminuyeron, pero no volvieron a los valores de referencia de control a los 6 meses post-tratamiento.

Por otro lado, Li et al. 2017, reclutaron una cohorte de Beijing de 57 PVV, de los cuales 33 estaban co-infectados con sífilis. Ellos realizaron un análisis de células T $\gamma\delta$ séricas mediante citometría de flujo para determinar la función de este fenotipo celular vestigial en personas co-infectadas con VIH-1 y sífilis. Este grupo reporta que la co-infección por sífilis podría revertir el desequilibrio de la relación V δ 1 y V δ 2 en infecciones agudas por VIH. Además, la infección por sífilis produce una disminución de la activación de las células T $\gamma\delta$ en la infección crónica por VIH. Estas últimas PVV crónicas, tienen mayor número de células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 en comparación con aquellos PVV agudos, independientemente del estadio de sífilis. El porcentaje de células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 se correlacionó de manera positiva con el porcentaje de neutrófilos; esto último sugiere que está estrechamente vinculado a la progresión de VIH.

Guo et al. 2019, evaluaron los cambios inmunológicos en subconjuntos de monocitos y células T reguladoras y cualquier asociación entre ellas en cuatro diferentes grupos: personas no infectadas, personas que viven con VIH, personas que tienen sífilis, y aquellas personas que tienen la co-infección. Ellos reportan que la frecuencia de monocitos clásicos es mayor en aquellos que solo padecen sífilis que en las personas sanas y aquellas que viven con VIH. De manera general, observaron y reportaron que el responsable de orquestar la respuesta inmunológica del hospedero, se atribuye de manera significativa a la infección por VIH. De modo que, los cambios en células T reg en personas co-infectadas se asocia a la infección viral más que a sífilis. Sin embargo, quedan muchos huecos que resolver para la coinfección y sobre todo en personas asintomáticas para sífilis, debido a la dificultad de establecer un modelo animal que esclarezca las interacciones moleculares del patógeno y el hospedero.

En este estudio, se pretende caracterizar el perfil inmunológico de HSH que viven con VIH y que está infectados con sífilis, sintomática y asintomática. De modo que, los resultados generados a partir de este trabajo, darán luz para entender por qué ciertos hospederos presentan diversas formas de una misma enfermedad, así como entender el papel del sistema inmunológico, sea protector o no. Además, evaluar si variables sociodemográficas contribuyen o no a este estado de enfermedad.

2.2. Epidemiología de la co-infección VIH-Sífilis

El presentar sífilis aumenta al menos 2.3 veces el riesgo de adquirir VIH, esto debido a que las lesiones ocasionadas por sífilis exponen a las células blanco del VIH: linfocitos Th (Roberts y Klausner 2016). En 2017, el Centro para Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estimó que al menos el 58% de los casos de sífilis primaria y secundaria corresponde a hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y que la mitad de ellos tienen VIH (Pillay 2018b). Una característica importante de la infección en esta población, es que presentan múltiples chancros y lesiones primarias y secundarias de manera simultánea, de forma que diferenciar el estadio de la enfermedad resulta complicado. Se ha reportado que al menos el 42% de HSH con sífilis no presenta síntomas, mientras que aquellos HSH con sífilis y VIH los asintomáticos corresponden al 34% (González-Domenech 2015). Es común que la sífilis se sub-diagnostique y muchos casos sigue avanzando hasta llegar a una fase terciaria con complicaciones aún más graves en el sistema nervioso central y cardiovascular en menor tiempo. Los HSH que viven con VIH son más propensos a desarrollar neurosífilis durante la etapa temprana, con una incidencia de 2.1% en comparación con aquellos que son VIH negativos (Lynn y Lightman 2004 y Taylor et al. 2008,).

Todo lo anterior pone de manifiesto que la historia natural de la sífilis se ve afectada por la co-infección con VIH.

3. Planteamiento del problema

La sífilis sigue siendo un problema de salud pública y durante los últimos años ha re-emergido, con un incremento de hasta 76% especialmente entre HSH («Reported STDs in the United States, 2017» 2018). La co-infección VIH-sífilis altera la historia natural de ambas enfermedades, se ha reportado un incremento de casos de sífilis terciaria y neurosífilis, además de que las personas con VIH tardan menos tiempo en llegar a Sida. Aún no se ha descrito de manera específica la respuesta inmunológica en HSH que viven con VIH.

4. Justificación

Es de suma importancia conocer y caracterizar la respuesta inmune en pacientes inmunosuprimidos, ya que no existe suficiente información para determinar por qué ciertos pacientes presentan signos y síntomas, mientras que otros no. Dentro de la revisión sistemática de literatura previamente realizada, se encontraron tan solo cuatro artículos que mencionan linfopenia de CD4⁺ en personas co-infectadas por el binomio sífilis-VIH; sin embargo, se desconoce si el ambiente inmunológico, mediado por citocinas reguladoras o pro-inflamatorias promueve o no la progresión de la enfermedad de cada uno. Se necesitan datos que describan la interacción de *T. pallidum* con el sistema inmune, por lo que estudiar la respuesta en HSH con VIH y TAR resulta imprescindible para determinar qué marcadores son más prevalentes en diferentes etapas de la enfermedad. Caracterizar la co-infección por VIH y sífilis en el sistema inmune a través de perfiles de citocinas mediados por células T podría ayudar a orientar recursos y diseñar estrategias de control, así como identificar factores asociados con la co-infección, ya que en menor tiempo evoluciona a etapa terciaria y el conocer estas características podría mejorar el pronóstico de enfermedad.

5. Pregunta de investigación

¿Qué citocinas y células efectoras están presentes en los diferentes estadios de sífilis, sintomáticos y asintomáticos, entre HSH que viven con VIH?

6. Hipótesis

Los HSH asintomáticos tendrán mayor presencia de citocinas reguladoras (IL-10 y TGF- β 1) secretadas por T_{reg} en comparación con aquellos sintomáticos, quienes presentarán mayor producción de citocinas pro- inflamatorias (TNF, IL-17 e IFN- γ) secretadas por T_H1 y T_H17, en los diferentes estadios de sífilis en HSH que viven con VIH.

7. Objetivo general

Evaluar la respuesta de células T cooperadoras y el perfil de citocinas con los diferentes estadios de sífilis entre HSH que viven con VIH.

8. Objetivos específicos

- a) Evaluar la presencia de citocinas proinflamatorias (TNF, IFN- γ e IL-17) y reguladoras (TGF- β 1 e IL-10) en diferentes estadios de sífilis entre HSH que viven con VIH.
- b) Asociar el tipo de célula T cooperadora por factores de transcripción canónicos (STAT1/T-bet para células T_H1, ROR- γ t para células T_H17 y Foxp3 para células T_{reg}) que se presenten en diferentes estadios de sífilis en HSH que viven con VIH.
- c) Determinar la asociación entre células T cooperadoras y citocinas efectoras con los diferentes estadios de sífilis, considerando las variables sociodemográficas y clínicas de los HSH que viven con VIH.

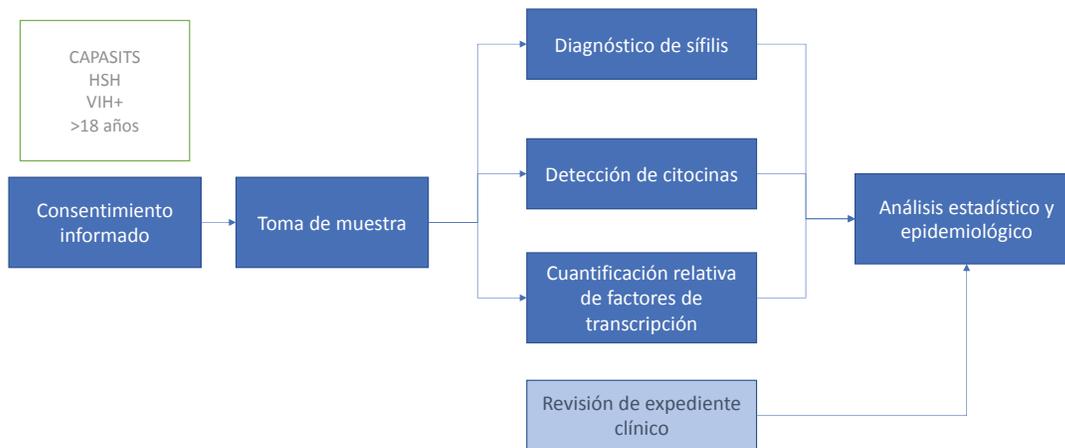
9. Materiales y métodos

9.1. Diseño de estudio

Se realizó un estudio transversal, por lo que se tomó muestra de sangre periférica una única vez en Vacutainer con EDTA previamente autorizado mediante el consentimiento informado a HSH que acudieron al CAPASITS de Cuernavaca durante marzo a octubre 2022.

En enero de 2022 se obtuvieron las aprobaciones de los tres comités institucionales; Comité de bioseguridad, Comité de bioética y Comité de investigación. En febrero se tuvieron algunas reuniones previas con el personal y directivo de CAPASITS Cuernavaca con el fin de organizar la mejor logística posible para la toma de muestra y no entorpecer sus actividades, así como la aprobación de Secretaría de Salud. Finalmente, el miércoles 27 de abril se dio inicio al proyecto de manera oficial, reclutando a las personas que viven con VIH y que asisten de manera rutinaria los días miércoles y jueves para estudios de rutina como carga viral y conteo de CD4. Los días lunes y viernes se realizó la revisión de expedientes para la formación de base de datos de todos los pacientes reclutados.

Esquema 2 Estrategia metodológica general



9.2. Tamaño de muestra

De acuerdo a la revisión, se tomó como referencia el artículo más similar a la población de estudio (Knudsen, Benfield, y Kofoed 2009) que son personas con sífilis pero que no viven con VIH. Se calculó un tamaño de muestra de 41 personas para cada grupo y evaluar cada citocina. Este tamaño de muestra se determinó mediante la fórmula de diferencia de medias con varianzas desiguales (<https://epitools.ausvet.com.au/twomeanstwo>) considerando un $\alpha=1.96$, $\beta=0.9$, dos colas, concentración de TNF en sífilis activa 9 ± 7.2 y de 4.6 ± 4.8 en sífilis latente. Por otra parte, se tienen información de que el 37% de las personas que viven con VIH tienen sífilis (12% sífilis curada, 10.2% sífilis latente, 15% sífilis activa), para obtener a 41 personas con sífilis latente, es necesaria una muestra de 411 HSH que viven con VIH.

9.3. Implicaciones éticas y de bioseguridad

Este estudio fue sometido al comité de Ética de Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública (CI 1739). Se protegió la confidencialidad de la información y se recabó consentimiento informado. La información es anónima y cada participante en el estudio recibió sus resultados en un periodo de dos semanas. La sangre de los voluntarios participantes de este estudio fue obtenida dentro de la misma agenda de recolección de muestra en CAPASITS Cuernavaca, por lo que solo se agregó un tubo vacutainer con EDTA de 4ml durante el mismo pinchazon, por lo que el participante no sufrió por otro piquete o procedimiento invasivo. La toma de muestra la realizó personal capacitado y entrenado del mismo CAPASITS. Dentro de las implicaciones de bioseguridad, las muestras fueron manejadas con guantes, equipo de protección personal como bata debidamente cerrada y calzado cerrado. Debido a la pandemia de SARS CoV-2, se tomaron las medidas sanitarias necesarias como el uso apropiado de cubrebocas KN95 y uso de alcohol al 70% para lavado de manos en todo momento. El llenado de consentimiento informado se realizó de manera individual, así como la resolución a cualquiera de las dudas de los participantes.

9.4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Aquellos participantes que se incluyeron son: PVV, mayores de 18 años de edad, contar con TAR, historial clínico completos, haber firmado el consentimiento informado, contar con pruebas treponémicas y no treponémicas. No se tomarán en cuenta aquellos HSH que hayan utilizado penicilina, doxiciclina, azitromicina o ceftriaxona 15 días previos a la toma de muestra sanguínea. Se eliminaron aquellos casos con muestra insuficiente para el análisis. La información recopilada se utilizó exclusivamente para esta investigación. Se conformaron cuatro grupos: Sífilis activa, sífilis latente, sífilis tratada y sin sífilis, como grupo de referencia. Con base al título

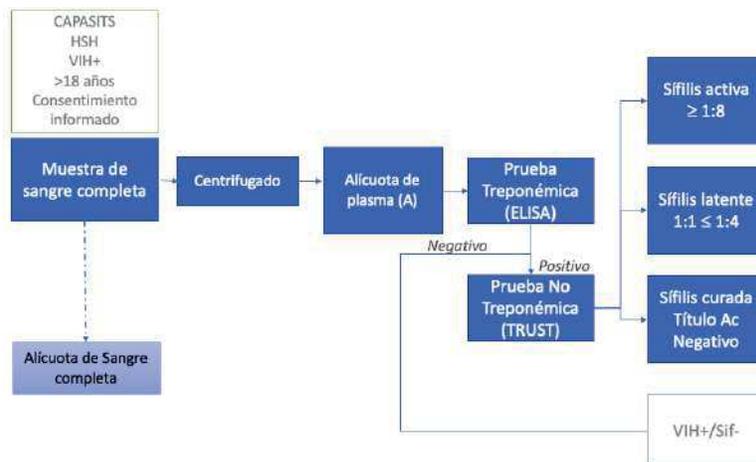
de anticuerpos por VDRL se determinó cada grupo. Las variables clínicas como conteo de linfocitos T CD4⁺, la carga viral, el uso de antiretrovirales serán tomados en cuenta para en análisis de correlación de perfil inmunológico y estadio de enfermedad (ver *Esquema 3*).

9.5. Procesamiento de muestras

El tubo extra obtenido de los participantes fue alicuotado en 5 tubos para diferentes estudios y generación de un biobanco de muestras. En un tubo *Eppendorf* se alicuotaron 300 ul de sangre completa y se resguardaron a -20°C para su posterior procesamiento para extracción de RNAm, síntesis de cDNA y detección de factores de transcripción. Posteriormente se centrifugaron los tubos de EDTA con la muestra restante a 1500 rpm por 5 minutos. En dos tubos conico de taparosca, se alicuotaron 500 ul de plasma (cada uno) a -20°C para la detección de sífilis por algoritmo reversa y el segundo tubo para detección y cuantificación de citocinas. En otro tubo conico de taparosca se alicuotaron 500 ul de paquete globular como “*back up*” del primer tubo para extracción de RNAm y se almacenará a -20°C. Todos los tubos fueron debidamente rotulados con un folio que identifica a cada participante (CP-0000).

9.6. Detección de sífilis

De los tubos de plasma previamente rotulados y resguardados, se realizó la detección de sífilis por algoritmo reversa. De modo que, a través de una prueba de ELISA (PT) se determinó caso positivo o negativo. Si el resultado fue positivo, este se confirmó a través de un VDRL (PNT) y título de anticuerpos, donde >1:8 se consideró como sífilis activa, 1:1<=1:4 estadio latente y con un VDRL negativo, se consideró sífilis tratada. Finalmente, se entregaron los resultados en un periodo de dos semanas al personal de CAPASITS para archivo de los expedientes de los participantes.



Esquema 3. Estrategia de detección de sífilis en PVV

9.7. Respuesta de células T cooperadoras y perfil de citocinas

9.7.1. Detección de citocinas

Una vez obtenidos los casos positivos y revisión de historial clínico exitoso, de los tubos de plasma previamente resguardados y rotulados debidamente, se procedió al análisis de perfil de citocinas pro inflamatorias: IL-17, IFN- γ y TNF, así como también citocinas de perfil regulador: TGF- β 1 e IL-10 mediante ELISA cuantitativa del estuche comercial PicoKine™ (96 Tests) (BOSTER Biological Technology, Pleasanton, CA, USA) (Ver protocolo en anexos). Este inmunoensayo determinó los niveles de citocina de interés. Esta reacción se lee por espectrofometría a 450 nm.



Esquema 4. Estrategia metodológica para perfil de citocinas

9.7.2. Cuantificación relativa de factores de transcripción por RTqPCR

Posterior al análisis de citocinas, se realizó el análisis de factores de transcripción mediante RT qPCR (cuantificación relativa), con el objetivo de definir qué células predominan en la respuesta contra la co-infección en esta población (Ver Anexo). Para esto, del tubo *Eppendorf* previamente rotulado y resguardado a -20°C, se extrajo el RNA total de la alícuota de sangre completa mediante columna del estuche comercial OMEGA, siguiendo el protocolo E.Z.N.A. del mismo estuche, específico para sangre completa. Se utilizó GAPDH como gen endógeno y de referencia (control). Una vez purificado y eluido el RNA se procedió a realizar un RT PCR para obtener cDNA, para la generación de un banco de muestras para estudios futuros o repeticiones. Una vez que se obtuvo el cDNA, se procedió a realizar qPCR para cada factor de transcripción (T-bet, STAT1, RORc y Foxp3) y se cuantificó de manera relativa con base a la expresión de GAPDH. Estas técnicas fueron estandarizadas en el laboratorio 6 planta baja del CISEI (Ver protocolo en anexo).



Esquema 5 Estrategia metodológica para detección y cuantificación relativa de factores de transcripción canónicos de célula T CD4⁺.

9.8. Operacionalización de variables

En la Tabla 5 se resumen y describen las variables a analizar durante el proyecto.

Nombre	Definición	Instrumento de medición	Tipo y escala de medición	Unidades y/o categorías de medición	Forma de análisis
Carga viral	Número de copias virales que se calculan por la estimación de RNA amplificado por RT q PCR.	RT q PCR (Datos disponibles en el expediente clínico)	Cuantitativa; dicotómica	Detectable: ≥41 copias/ml Indetectable: ≤40 copias/ml	Se tomará la información a partir del cuestionario aplicado Frecuencia relativa de cada uno (%)
Conteo CD4+	Número de células T CD4+ (Tcooperadoras) en suero.	Datos disponibles en expediente clínico	Cuantitativa; dicotómica	Bajo: <300 células/mm ³ Normal: >300 células/mm ³	Se tomará la información a partir del cuestionario aplicado Frecuencia relativa de cada uno (%)
Tratamiento antirretroviral	Tratamiento(s) contra VIH otorgado en la clínica	Datos disponibles en cuestionario (expediente clínico)	Cualitativa; nominal	Se tomará la información a partir del cuestionario aplicado	Se tomará la información a partir del cuestionario aplicado Frecuencia relativa (%)
Orientación sexual	Preferencia sexual	Datos disponibles en cuestionario (expediente clínico)	Cualitativa; nominal, dicotómica.	Homosexual: hombre que tiene sexo solo con hombres Bisexual: hombre que tiene	Se tomará la información a partir del cuestionario aplicado Frecuencia relativa de cada uno (%)

				sexo con hombres y mujeres	
Parejas sexuales	Número de parejas sexuales en los últimos 12 meses	Datos disponibles en cuestionario (expediente clínico)	Cuantitativa, discreta	1 = pareja monógama 2 o más= múltiples parejas sexuales.	De acuerdo a los datos que se obtendrán en el cuestionario y expediente clínico, se propone realizar análisis de intervalos intercuartílicos. (ej. 2 a 4; 5 a 7; 8 o más)
Edad	Tiempo que ha vivido la persona.	Datos disponibles en cuestionario (expediente clínico)	Cuantitativa; discreta	años	Promedio de edad entre todos los participantes. (rango de 18 en adelante)
Título de anticuerpos contra <i>T. pallidum</i>	Cantidad de anticuerpos crosreactivos diluidos aglutinantes contra un complejo de cardiolipina-colesterol y lecitina	VDRL (PNT)	Cuantitativa; discreta	$\geq 1:8$ $1:1 \leq 1:4$ Negativo	$\geq 1:8$ activa $1:1 \leq 1:4$ latente Negativo: Sífilis tratada Frecuencia (absoluta y relativa) de cada uno. Frecuencia de sintomáticos activos vs. Asintomáticos activos.
Prueba treponémica	Forma directa de medir la presencia o ausencia de anticuerpos específicos contra <i>Treponema pallidum</i> . Se utiliza como prueba confirmatoria.	ELISA	Cualitativa; dicotómica	Positivo Negativo	Positivos sintomáticos vs. Positivos asintomáticos
Concentración de citocinas	Número de citocinas extracelulares circulantes en sangre periférica	ELISA individual para cada citocina (TNF, IL-10, IL-17 y TGF β)	Cuantitativa; continua.	pg/ml	De acuerdo a los datos que se obtendrán, se propone analizar por valor intercuartil. Promedio de concentración de TNF

					<p>Promedio de concentración de IL-10</p> <p>Promedio de concentración de IL-17</p> <p>Promedio de concentración de TGFβ</p>
Tiempo de diagnóstico para VIH	Meses en los que el HSH conoce su estado seropositivo	Datos disponibles en cuestionario (expediente clínico)	Cuantitativa; discreta.	meses	De acuerdo a los datos disponibles y la distribución del tamaño de muestra, se propone analizar por valor intercuartil.
Subtipo de Célula T CD4+	Subpoblación de linfocitos T CD4+ caracterizado por la expresión de diferentes factores de transcripción	RT q PCR (Cuantificación relativa)	Cualitativa; nominal. Cuantitativa; continua.	Número de veces que el factor de transcripción canónico de subpoblación de célula T amplifica con respecto al gen endógeno (GAPDH).	<p>Frecuencia de amplificación: Tbx21/STAT1 = Th1</p> <p>Foxp3=Treg</p> <p>RORc=Th17</p> <p>Promedio de cada uno vs. Grupo de referencia (VIH+ Sífilis-)</p>
Signos y síntomas	Manifestaciones clínicas de la enfermedad	Datos disponibles en cuestionario (expediente clínico)	Cualitativa; dicotómica	Sintomático Asintomático	<p>Para los sintomáticos se subdivide en estadios de sífilis de acuerdo a las manifestaciones clínicas correspondientes de cada etapa.</p> <p>Promedio de participantes que presente síntomas vs. Asintomáticos.</p>
Estadio de sífilis	Etapas de la enfermedad de sífilis.	Datos disponibles en cuestionario (expediente clínico)	Cualitativa; ordinal.	Primaria/Secundaria Terciaria Asintomática	<p>Chancro y rash maculopapular = Primaria/secundaria</p> <p>Paresia, problemas cardiovasculares, problemas en sistema nervioso central = terciaria</p> <p>Sin síntomas pero positivo a VDRL y ELISA = asintomático</p>

Tabla 5. Operacionalización de variables.
Elaboración propia.

9.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron softwares de acceso libre en línea. Una vez obtenidos los datos tanto de expediente clínico, resultados de laboratorio (ELISA para sífilis, VDRL, ELISA para citocinas y RT-qPCR) se generó una base de datos en Microsoft Office Excel y se utilizó *DataTab* (<https://datatab.es/statistics-calculator/charts>) para analizar la distribución de datos y *Statics Kingdom* (<https://www.statskingdom.com/kruskal-wallis-calculator.html#vmes>) para la comparación entre los distintos grupos. Ambos programas de acceso libre y en línea. En *DataTab* se sintetizaron los resultados de manera simple en medidas de resumen como promedio, frecuencias simples y valor intercuartil. Se calculó la prevalencia de sífilis activa, latente y curada de acuerdo al título de anticuerpos obtenidos. Como grupo de referencia se tiene VIH+ Sífilis negativos. Para variables cualitativas se utilizaron frecuencias y para variables cuantitativas los promedios. Se tomaron intervalos de confianza de 95% y corrección de Bonferroni (0.0083). Para la comparación de expresión sérica de citocinas se realizó la prueba Kruskal-Wallis, ya que el valor de P en la prueba Shapiro Wilk indicó una distribución no normal (P=0). Para obtener los intervalos de confianza, se utilizó prueba de Fisher, disponible en *GraphPad*. Se calcularon las proporciones de positivos para la expresión de factores de transcripción y se utilizó la prueba de Chi² para determinar si había diferencias significativas entre los grupos de interés.

10.Resultados

10.1. Revisión sistemática de literatura: inmunología de sífilis

Se realizó una revisión sistemática de literatura en la base de datos de PubMed, Cochrane, Redalyc y Scopus, durante septiembre 2018 a junio 2022, con el fin de encontrar toda la información relevante y asociada a la respuesta inmune contra sífilis. Se encontraron 13,016 artículos, de los cuales 87 fueron de interés. De estos, al menos 11 se utilizaron para elaborar una idea clara sobre la respuesta inmune sobre la historia natural de la sífilis, la cual se resume en el Anexo 1.

Esta revisión sistemática fue publicada en octubre de 2022 en la revista *Biomolecules* de MDPI. Esta revista cuenta con un factor de impacto 6.06 para el año en curso y el artículo con el siguiente DOI: 10.3390/biom12101472.

10.2. Prevalencia de sífilis adquirida en CAPASITS Cuernavaca

Durante abril a octubre 2022, se captaron 883 muestras entre hombres y mujeres. De estos, el 80.5% (711) corresponden a hombres, 17.5% (155) a mujeres y 2.4%(21) indefinido. Indefinido debido a que se registraron con apellidos. De todos estos participantes, se realizó el algoritmo reverso de detección al 100%, de los cuales el 44% son positivos a sífilis por ELISA (PT). De todos los casos positivos, se confirmó mediante un VDRL donde el 23.4% (91) corresponden a sífilis activa, 37.3% (145) a un estadio latente y 38.8% (151) ya fueron tratados previamente.

Entre los casos positivos de hombres (711 registrados), el 53% resultó positivo a la prueba de sífilis por ELISA. De estos, el 24% (89) tienen sífilis activa; 37% (136) latente y 39% (141) sífilis tratada (Figura 5).

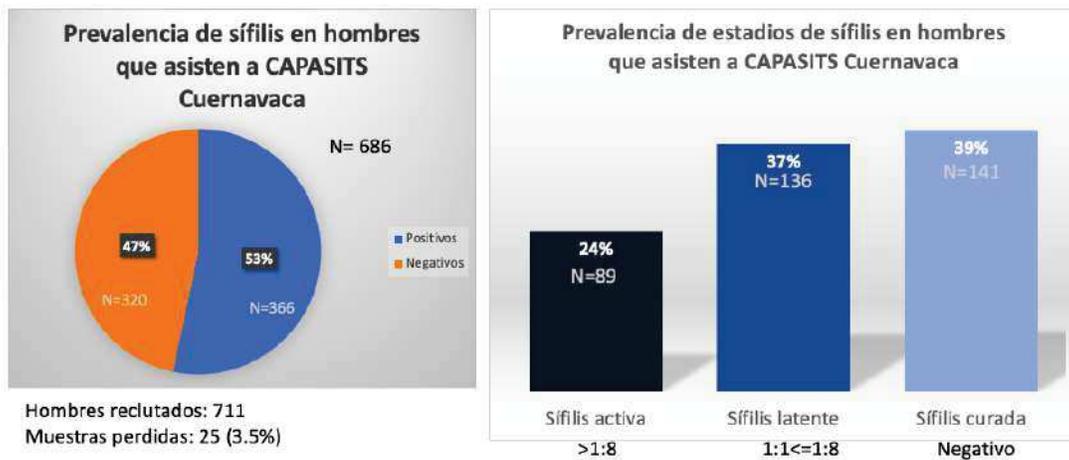


Figura 5. Prevalencia de sífilis adquirida y sus estadios en hombres con VIH de CAPASITS Cuernavaca.

Con los datos obtenidos a través de los expedientes (423 expedientes hasta el 20 de junio de 2023), se ha podido caracterizar a la población con frecuencias simples de cada variable:

Characteristics	
MSM	174 (47)
No data	196 (53)
Age by syphilis stage:	
Without syphilis	37.3 (18-81)
Active syphilis	37.4 (19-65)
Latent syphilis	38.8 (20-67)
Cured syphilis	37.6 (20-66)
Civil status:	
Single	243(65.6)
Married	19(5.1)
Divorced	7(1.8)
Widowed	3(8.1)
Concubinage	57(15.4)
No data	41(11)
Education level:	
No education	3 (0.8)
Elementary	20(5.4)
High School	181(48.9)
College	123(33.2)
No data	43 (11.6)
Occupation:	
Employed	267 (72.1)
Unemployed	60 (16.2)
No data	43 (11.6)
Alcohol:	
Yes	232 (62.7)
No	90 (24.3)
No data	48 (12.9)
Smoking:	
Yes	188 (50.8)
No	134 (36.2)
No data	48 (12.9)

Usage of any drugs:	
Yes	78 (21)
No	228 (61.6)
No data	64 (17.3)
<hr/>	
Clinical signs associated to syphilis¹:	
Yes	33 (8.9)
No data	337 (91.1)
<hr/>	
Other STI:	
None	80 (21.6)
One STI	59 (15.9)
Two or more	59 (15.9)
No data	172 (46.5)
<hr/>	
Time with HIV diagnosed (years)	
≤ 5 years	124 (33.5)
>5 years	202 (54.6)
No data	44 (11.8)
<hr/>	
Co-morbidities²	
Yes	161 (43.5)
No	95 (25.6)
No data	114 (30.8)
<hr/>	
Viral Load (copies/mL)	
Undetectable (≤40)	274 (74)
Detectable (>40)	96 (26)
<hr/>	
Cells/mm³:	
CD4+	157 (42.4)
<500	166 (44.8)
≥500	47 (12.7)
No data	
<hr/>	
Tuberculosis:	
Yes	8 (2.1)
No	259 (70)
No data	103 (27.8)
<hr/>	

Tabla 6. Características de hombres asistentes a CAPASITS Cuernavaca

HSH= Hombre que tiene sexo con hombres; ¹Tratamiento; Co-morbididades incluye diabetes tipo 2, hipertension y síndrome metabólico (Enfermedades crónicas degenerativas); ²Infecciones de Transmisión Sexual.

De manera que, con los datos anteriores se pudo estratificar por grupos de interés, la adherencia al tratamiento antirretroviral. En la *Tabla 7*, se resume en conteo de células mayor o igual a 500 células por mm³ (sistema inmune reestablecido y sano) y carga viral indetectable (menor de 40 copias virales por mL).

		Sin sífilis	Sífilis activa	Sífilis latente	Sífilis tratada
Células T CD4 ⁺	≥500 cells/mm ³	52.5 (45.8-59.1)	47 (31.4-63.2)	42.6 (31.5-54.4)	61.4 (49.7-71.9)
Carga viral (copias/mL)	Indetectable	86 (80.4-90.3)	84.8 (68.6-93.8)	92.1 (82.6-97)	82.8 (71.6-90.3)

Tabla 7. Adherencia al tratamiento antirretroviral entre HSH con VIH por estadio de sífilis

Con la información recopilada, se pudo dividir en dos grandes grupos hombres con VIH y hombres co-infectados (VIH y *T. pallidum*). Se buscó analizar si existía alguna relación con el número de células T CD4⁺ versus infección. Encontramos un efecto espejo (Ver Figura 5), por lo que adquirir sífilis en hombres que viven con VIH, produce linfopenia. Este dato resultó no ser significativo pero con un valor P limítrofe de 0.064, por lo que quizás con tamaño de muestra más grande, este podría ser significativo.

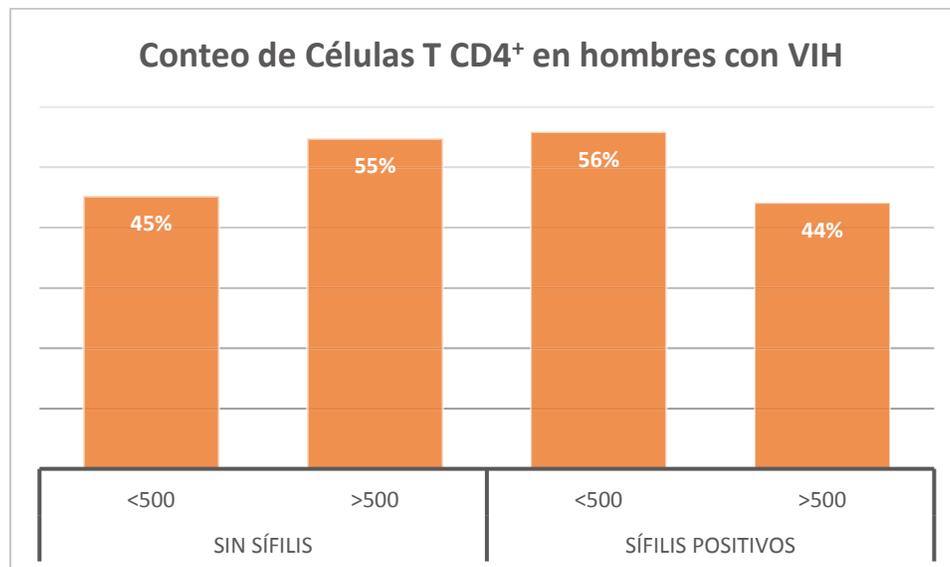
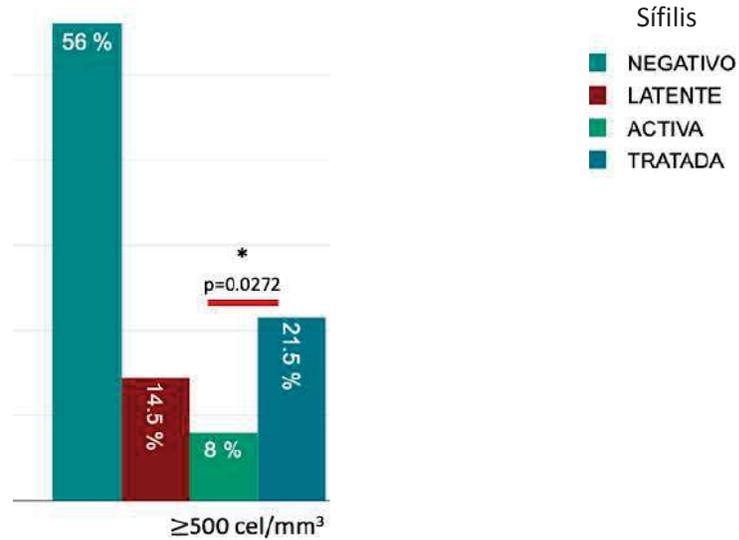


Figura 5. Conteo de células T CD4⁺ en hombres con VIH

Con los datos anteriores se propuso graficar tan solo aquellos con conteo de células T CD4⁺ mayores a 500 células por mm³ y estratificar por grupo de interés (Ver Figura 6). Se obtuvo que una sífilis latente produce linfopenia en comparación con una sífilis tratada, donde los linfocitos ya se reestablecieron. Esta diferencia resultó ser significativa ($p=0.0272$), por lo que se puede atribuir a la progresión de la sífilis.

Conteo de células T CD4⁺ en hombres con VIH



Linfopenia durante una sífilis latente vs tratada en HSH con VIH

Figura 6. Conteo de células T CD4⁺ en hombres con VIH por grupo de interés

Dentro de todos los hombres con VIH con carga viral indetectable, observamos que el número de copias aumenta en aquellos co-infectados. Esto podría atribuirse al efecto sostenido de la linfopenia, provocando una desregulación más que evasión inmunológica. Sin embargo, ninguna de estas disminuciones mostró ser significativa (Ver).

Carga viral en hombres con VIH

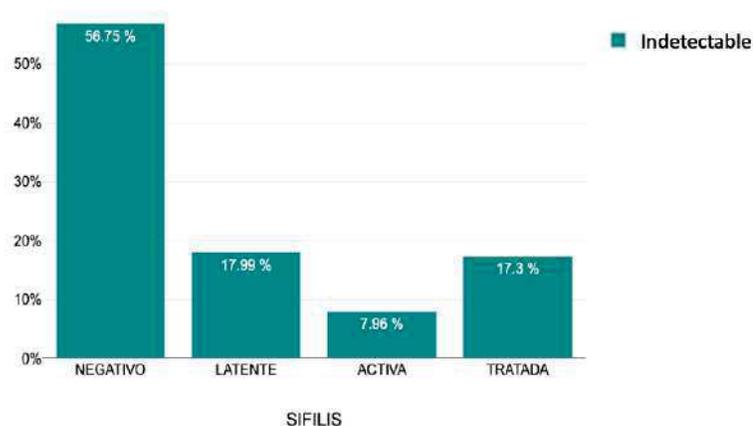


Figura 7. Carga viral indetectable por grupo de interés en hombres con VIH

10.3. Detección de citocinas séricas en hombres con VIH

Se realizó la cuantificación de citocinas séricas con el estuche comercial previamente descrito y con el protocolo establecido (Boster ELISA). En la *Tabla 8*, se reporta la proporción de positivos a cada citocina analizada y la probable célula responsable de cada una. En la *Figura 8*, corresponde a la cuantificación (pg/ml) de concentración de citocinas y analizadas con la prueba estadística Kruskal-Wallis. TNF en hombres con sífilis activa resultó ser significativa en comparación con los demás grupos de interés. Por el otro lado, IFN- γ en el grupo de sífilis activa versus sífilis tratada fue mayormente expresado. Por lo anterior, esto sugiere que el perfil de respuesta primaria es predominantemente pro-inflamatoria y probablemente mediada por células T_{H1}, lo que corresponde de acuerdo a lo publicado previamente por Van Vhooris en 1996 y Leader en 2007 en infección de conejo. Para el caso de IL-17, no obtuvimos cuantificación alguna. Esto podría indicar que tanto el grupo de hombres con VIH como los co-infectados con *T. pallidum*, podrían estar controlando las infecciones sin progresión de ninguna. También podría ser un indicador de buena adherencia al TAR. Para la evaluación de citocinas reguladoras mediadas por T_{reg}, encontramos que la expresión de IL-10 es similar a la tendencia reportada por Kenyon y colaboradores en 2017. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los grupos analizados.

Subtipo de célula T CD4 ⁺	Citocina	Sin sífilis	Sífilis activa	Sífilis latente	Sífilis curada
T _{H1}	IFN- γ	1.8 (0.3-5.4)	6.8 (2.8-14.3)	2.2 (0.4-6.6)	0.7 (<0.01-4.3)
	TNF	1.2 (0.05-4.5)	7.8 (3.6-15.6)	1.5 (0.07-5.5)	2.1 (0.4-6.4)
T _{reg}	IL-10	9 (5.4-14.5)	14.6 (8.6-23.5)	14 (9.1-21)	11.5 (7-18.2)
	TGF- β 1	49.7 (42.2-57.1)	49.4 (39.1-59.7)	55.8 (47.4-63.9)	44.6 (36.6-52.9)

Tabla 8. Proporción de positivos para cada citocina sérica expresada

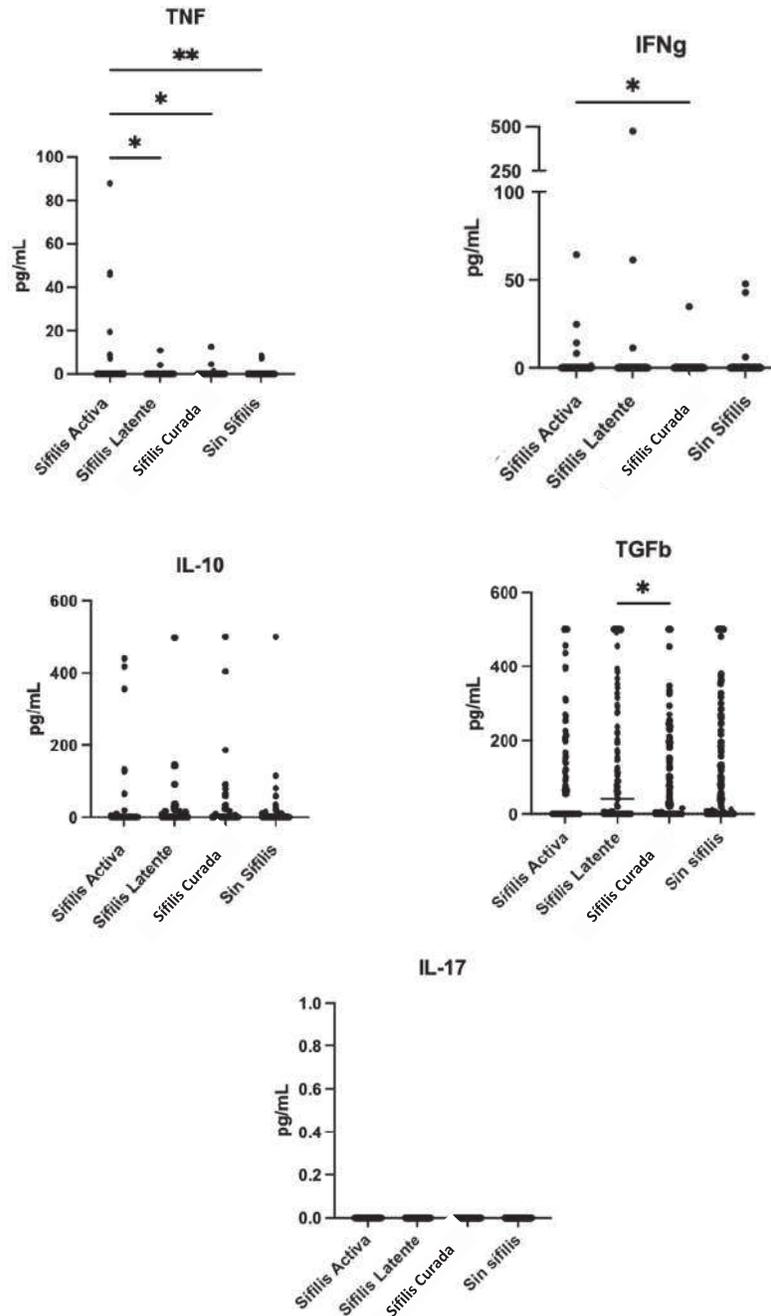


Figura 8 Expresión sérica de citocinas evaluadas. Todas las citocinas fueron evaluadas mediante una ELISA directa, protocolo descrito en ANEXOS. Para el caso de TNF, este marcador demostro ser significativo en una sífilis activa versus los demás grupos. Para IFN, demostró ser altamente expresado de igual forma en una sífilis activa versus una sífilis curada. Para las citocinas reguladoras, se observa que aumenta la expresión de IL-10 en aquellos que tienen sífilis sin importar el estadio, versus los hombres que no la tienen. Para TGF β , se observo que una sífilis latente tiene mayor expresión en comparación con una sífilis curada. Para IL-17 no se observó expresión en ninguno de los participantes.

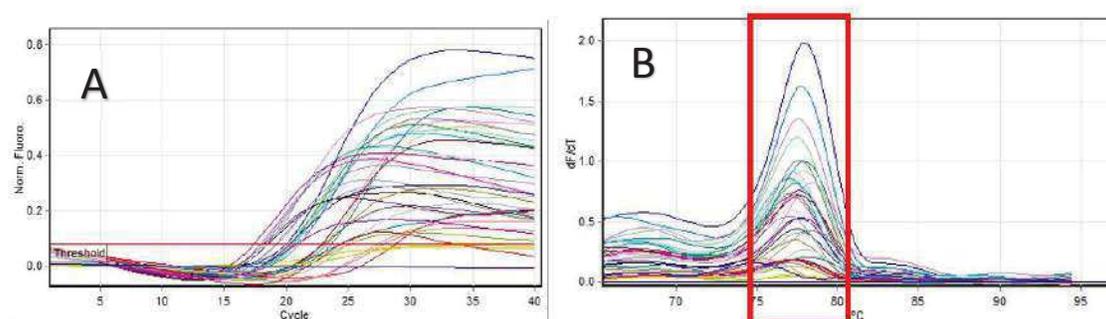
10.4. Expresión de factores de transcripción en hombres con VIH de CAPASITS

Una vez estandarizada toda la metodología para RT-qPCR 2 Step (Ver Anexo Protocolos), se implementó toda la metodología a las muestras recolectadas. Se realizó una corrida de qPCR por cada factor de transcripción y 8 muestras por cada grupo (N=32) en conjunto con un control positivo (duplicado) y negativo (duplicado NTC (agua)). Esta reacción se realizó con las condiciones previamente estandarizadas en el equipo *Rotor-Gene Q* con un rotor para 36 muestras y se analizó con el *software Q-Rex* de Qiagen. En la *Tabla 9*, se muestra en promedio el Ct de amplificación de cada gen por grupo de estadio de infección por sífilis.

Estadio	Promedio de Ct				
	GAPDH	STAT-1	TBX21	FOXP3	RORC
Sin sífilis	18.90	27.00	32.50	26.90	31.00
Sífilis activa	21.8	29.8	33	29.7	22.8
Sífilis latente	22.7	30.8	30	33	0
Sífilis tratada	21.45	29.5	35.5	30.5	18.3

Tabla 9 Promedio de Cts de amplificación por grupos de interés

La expresión de GAPDH se demostró en todas las muestras analizadas (Ver Figura 9), por lo que el material genético extraído era viable para medir la expresión relativa de los factores de transcripción de interés.



Todas las muestras fueron positivas a GAPDH, por lo tanto, todas cuentan con cDNA viable.

Figura 9. Expresión de GAPDH en hombres con VIH. En el panel A, se muestran los ciclos de amplificación (Ct) para cada muestra. La curva de disociación (panel B) para el producto endógeno de interés es la misma en todas las muestras amplificadas, por lo tanto todas las muestras cuentan con cDNA viable para su análisis.

Al aplicar la fórmula de cuantificación relativa para cada factor de transcripción en comparación con el gen endógeno, encontramos que para el caso de STAT-1 fue expresado hasta 3.4 más veces que GAPDH en un participante con sífilis latente. Sin embargo, al realizar el análisis por

proporciones de expresión cualitativa, observamos que, de todas las muestras procesadas, el 69% expresó STAT-1 y que previo a la infección por *T. pallidum* es mayormente expresado, y este gen disminuye su expresión cuando se enfrenta contra la espiroqueta (Figura 10).

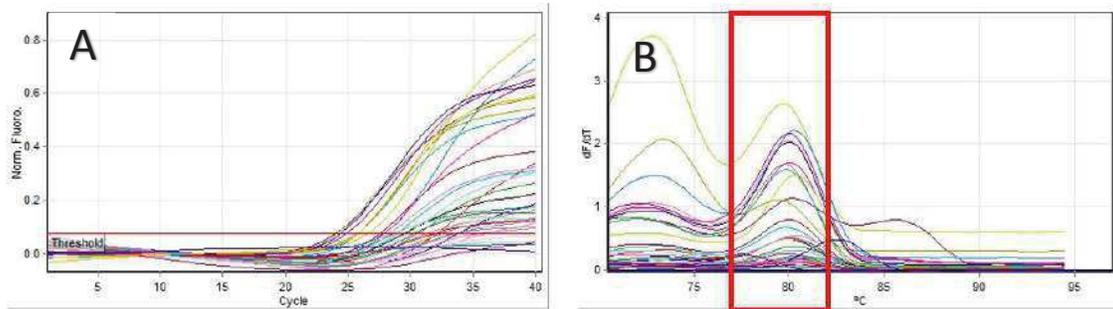


Figura 10 Expresión de STAT-1 en hombres con VIH. En el panel A, se muestran los ciclos de amplificación (Ct) para cada muestra. El valor de temperatura de disociación para STAT-1 es de 78°C, por lo que se tomaron como positivas todas aquellas en las que el producto disociara exactamente en esa temperatura. En algunas muestras se observan curvas menores a la temperatura específica del amplicon, esto se debe a la dimerización de la reacción al no tener suficiente cDNA específico de STAT-1.

Por otro lado, al realizar la cuantificación de T-bet y normalizando los valores, encontramos que este se expresó 1.4 más veces que GAPDH en un participante con sífilis activa. La prevalencia global de expresión fue del 41%. Al realizar el análisis por proporciones cualitativas, encontramos que este factor se expresa mayormente frente a la infección por *T. pallidum* con 37% y disminuye una vez recibido el tratamiento antibiótico (12.5%) (Ver Figura 11). Si bien las células T CD4⁺ no son las únicas que expresan T-bet, otra población que pudiera estar funcionando como responsable de este factor podrían ser las células T CD8⁺ y estar distinguiendo antígenos no viables extracelulares de la espiroqueta mediante presentación por MHC-I. Aunque también ha sido hipotetizado por Leader en 2007, que fungan un papel de reservorio de espiroquetas presentes en las lesiones.

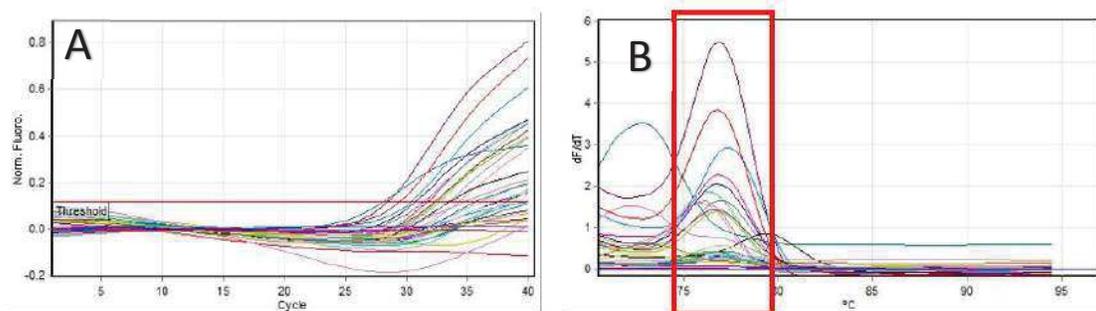


Figura 11. Expresión de T-bet en hombres con VIH. En el panel A, se muestran los ciclos de amplificación (Ct) para cada muestra. La temperatura específica de disociación (Panel B) para este amplicon es de 77°C. En rojo se señalan aquellas muestras que aplican para este factor transcripcional. Algunas muestras mostraron dimerización en temperaturas más bajas.

Al analizar la expresión de Foxp3, nos encontramos que, de manera global tiene una prevalencia del 50% y al realizar la cuantificación relativa, se expresa 1.1 veces más en un estadio latente que el endógeno y hasta 19 veces más en una sífilis activa. Esto podría indicar que al menos 50% de las células analizadas son T_{reg}, y el restante podría deberse a células B. Al realizar la estratificación por estadio y proporciones cualitativas, se demuestra que Foxp3 frente a la infección por VIH es altamente expresado (62.5%) y al encontrarse co-infectados aumenta 12.5%, esto quizás para controlar la respuesta por T-bet. Sin embargo, durante un estadio latente, este disminuye y se compensa una vez recibido el tratamiento (Ver Figura 12).

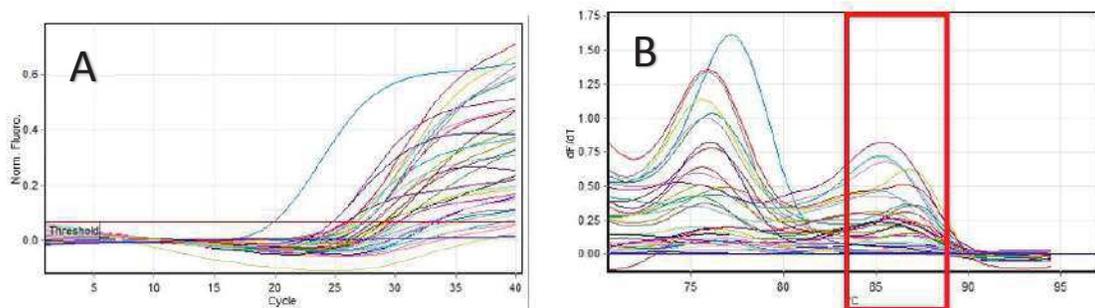


Figura 12. Expresión de Foxp3 en hombres con VIH. En el panel A, se muestran los ciclos de amplificación(Ct) para cada muestra. La temperatura de disociación para el aplicón de Foxp3 es de 86°C. El 50% de todas la muestras, sin importar estadio de infección, expresaron este marcador. Aquellas que no expresaban Foxp3, demostraron dimerizar en temperaturas menores a 77°C.

Aunque no obtuvimos respuesta de IL-17, se analizó RORc. De manera global este fue expresado en el 13% de las muestras analizadas. Este fue observado durante una sífilis activa, eliminado en estadio de latencia y nuevamente expresado post-tratamiento (Ver Figura 13).

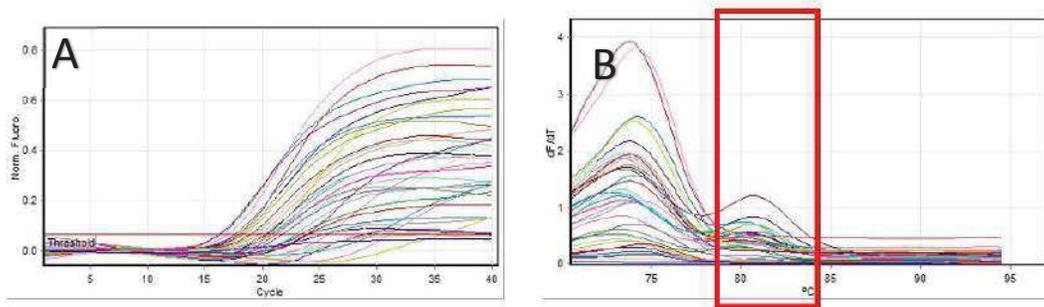


Figura 13. Expresión de RORc en hombres con VIH. En el panel A, se muestran los ciclos de amplificación(Ct) para cada muestra. Tan sólo 6 muestras amplificaron el factor transcripcional RORc, se observa que la curva de disociación corresponde a 83°C (Panel B). Aquellas muestras que no amplificaron este marcador, dimerizaron por debajo de los 75°C.

Finalmente, se analizó la proporción de expresión por estadio de infección (Ver Tabla 12) y se propuso una cinética teorica de comportamiento para células T CD4⁺ (Ver Figura 16). En ambas, es posible observar que tanto STAT-1 como Foxp3 ya están expresadas previo a la infección por

T. pallidum. Durante una sífilis activa se observa que STAT-1 disminuye su expresión en 12.5% mientras que Foxp3 aumenta el mismo porcentaje. T-bet se activa durante una respuesta primaria y se mantiene durante la infección sin importar el estadio. A medida que avanza la infección a un estadio latente, se observa que STAT-1 se mantiene expresado en 62.5% y Foxp3 disminuye drásticamente en 60%. Esto podría indicar que los linfocitos de perfil regulador ya no se encuentran de manera sistémica y si en organos linfoides secundarios. Durante una sífilis curada, se reestablecen todas las poblaciones, sin embargo se requieren de estudios futuros para discernir como se da la respuesta sistémica y/o localizada.

	Sin sífilis	Sífilis activa	Sífilis latente	Sífilis curada
STAT-1	75 (40-93.6)	62.5 (30.3-86.5)	62.5 (30.3-86.5)	37.5 (8.5-75)
T-bet	0 (0-37.2)	37.5 (8.5-75)	37.5 (8.5-75)	12.5 (0.3-52.6)
Foxp3	62.5 (30.3-86.5)	75 (40-93.6)	12.5 (0.3-52.6)	50 (21.5-78.4)
RORc	0 (0-37.2)	25 (6.3-59.9)	0 (0-37.2)	25 (6.3-59.9)

Tabla 12. Proporción de expresión de citocinas en sangre periférica en hombres con VIH.

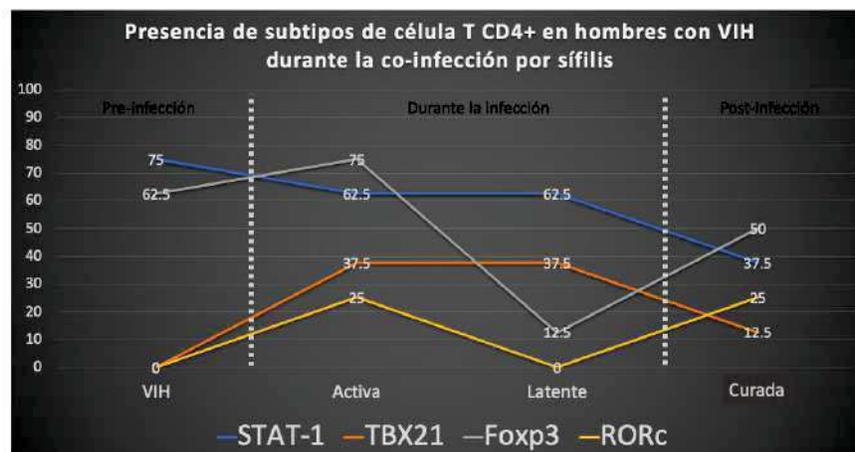


Figura 16. Cinética teórica de comportamiento de linfocitos T CD4+ en sangre completa de hombres que viven con VIH. Es posible observar la respuesta hipotética previo a la infección por T. pallidum, durante la infección y post-infección.

10.5. Manuscrito con resultados originales

Con los datos anteriores se escribió el siguiente manuscrito científico para su envío en Agosto 2023.

Journal of Infection and Public Health	
Serum expression of cytokines as key to understand syphilis in men living with HIV	
--Manuscript Draft--	
Manuscript Number:	
Article Type:	Original Article
Keywords:	HIV; Syphilis; cytokines; person living with hiv
Corresponding Author:	Miguel Angel Angel Sanchez-Aleman, D. Sc. Cuernavaca, MEXICO
First Author:	Adriana Hernández-Pliego
Order of Authors:	Adriana Hernández-Pliego Santa García-Cisneros Dayana Nichte Vergara-Ortega Fernando Esquivel-Guadarrama Antonia Herrera-Ortiz Cairo Toledano-Jaimes Miguel Angel Angel Sanchez-Aleman, D. Sc.
Abstract:	<p>Background: Treponema pallidum is the etiological cause of syphilis, in recent years has been reported to be re-emerging, especially in men who have sex with men (MSM) and people living with HIV (PLWH). Certain cytokines may be playing as hallmark biomarkers in the progression of syphilis in PLWH, it becomes important to study how the immune system works against T. pallidum, especially in people living with HIV, whose immune system is compromised. Here, we evaluate the serum expression of IFN, TNF, IL-10, TGF- and IL-17 from men living with HIV and its association in distinct stages of syphilis (active, latent, and treated). Methods During March to October 2022, we recruit men living with HIV. A blood sample was requested, syphilis was detected using the reverse algorithm, and antibodies were titrated to determine the stage. Four groups were established: active syphilis, latent syphilis, cured syphilis and without syphilis. Each of the cytokines studied was quantified by commercial ELISA tests. Results: The following groups were formed: active syphilis (n=81), latent syphilis (n=136), cured syphilis (n=141), and without syphilis (n=165), all men living with HIV.</p>

Dear Dr. Miguel Angel Angel Sanchez-Aleman,

We have received your article "Serum expression of cytokines as key to understand syphilis in men living with HIV" belonging to "ARTICLE_TYPE" for consideration for publication in Journal of Infection and Public Health.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://www.editorialmanager.com/ji-ph/>
2. Enter these login details:
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

By submitting your paper to Journal of Infection and Public Health you agree and acknowledge the journal is an Open Access journal. If your paper is successful and accepted by the Editor your article will be subject to an article processing fee.

An invoice will be issued post acceptance.

More information about the journal and the APC can be found here: <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-infection-and-public-health/1876-0341/guide-for-authors>

11. Discusión

La frecuencia de sífilis adquirida está en aumento a nivel mundial, como se mencionó previamente. En este estudio, la población de interés demostró una alta prevalencia a nivel general con 44% (IC95% 40.8-47.3) (hombres y mujeres), como en HSH con 53% (IC95% 49.6-57). Algo a destacar es la prevalencia de sífilis latente, ya que se encontró casi 4 veces más de la previamente reportada en México (10% vs. 37%). Esto, podría deberse a diversos factores tales como: subdiagnóstico clínico, personas asintomáticas y/o resistencia antimicrobiana por el uso terapéutico de antibióticos de segunda y tercera línea. Este último, ha cambiado el paradigma que se tenía con *T. pallidum*, debido a que esta bacteria carece de plásmido y genes de resistencia. Sin embargo, en recientes años se ha detectado que contiene ciertas mutaciones puntuales que le confieren resistencia contra macrólidos y tetraciclinas (Orbe-Orihuela et al. 2022). En nuestro estudio, al menos el 80% de positivos a sífilis recibieron penicilina, por lo que el 20% restante podría estar condicionando presión de selección a la espiroqueta y presentar resistencia en un futuro, además de continuar con la transmisión.

De acuerdo a la revisión sistemática realizada y publicada (Hernández-Pliego et al. 2022), de manera estratégica se seleccionaron las citocinas a evaluar para este estudio. De modo que fueran estas mismas, las citocinas características de una subpoblación T CD4+ específica y corroborar esto con la amplificación y cuantificación relativa de factores de transcripción canónicos.

Aunque TNF demostró significancia estadística en sífilis activa versus los demás grupos, biológicamente no funge como posible biomarcador de acuerdo a la proporción de positivos, ya que, de 89 hombres positivos a sífilis activa, tan solo 6 (7%) de ellos cualificaron como positivos para esta citocina. Por lo tanto, sin importar el tamaño de muestra, no tiene relevancia biológica. De manera similar, sucede con IFN- γ , siendo su mayor pico de expresión en una sífilis activa versus tratada. Proporcionalmente hablando, tampoco funge como biomarcador de progresión. Pareciera que ambas citocinas pro-inflamatorias se encuentran comprometidas en órganos linfoides secundarios, cumpliendo quizás, su función efectora frente a la infección por *T. pallidum*. Por otro lado, IL-10 podría estar suprimiendo la respuesta de IFN- γ durante una sífilis activa, aunque no lo suficiente, ya que avanza a un estadio latente. IL-10 es conocida como una citocina supresora maestra y el papel efector durante la infección por *T. pallidum* aún no queda claro. Aquí demostramos que la expresión de IL-10 no varía con respecto al tamaño de muestra y que los resultados obtenidos tienen la misma tendencia que aquellos reportados por Kenyon y colaboradores en 2017 (Kenyon et al. 2017b). Aunque la expresión de IL-10 podría deberse por una respuesta sostenida por VIH y el mecanismo de compensación de células Treg

mediadoras de la cascada de inflamación. Quizás otra fuente de producción de IL-10, sean los macrófagos M2, sin embargo, falta estudiar esta parte del sistema inmunológico.

Diversos autores (Amarnath et al. 2007; Elrefaei et al. 2010; Lazdins et al. 1991; Lewis et al. 2016), han propuesto a TGF- β 1 como posible marcador de progresión en la infección por VIH a Sida. Por otro lado, Babolin y colaboradores en 2011, reportaron 8 veces mayor expresión durante una sífilis secundaria (activa) versus participantes sanos. Sin embargo, se desconoce el papel de esta citocina durante la co-infección. En este estudio, es la primera vez que se evalúa bajo el contexto de VIH-Sífilis. Demostramos que, la expresión sistémica de TGF- β 1 no solo es alta, si no que la diferencia entre una sífilis latente y tratada es estadísticamente significativa. Esto sugiere que, el papel de TGF- β 1 podría estar conteniendo la infección por *T. pallidum* durante un periodo de latencia a manera de controlar la respuesta pro-inflamatoria mediada por TNF. Mismo dato que se corrobora, con la eliminación de TNF durante el periodo de latencia. La expresión exacerbada de TGF- β 1 desregula la homeostasis, esto repercute en la salud del hospedero y comunicación intercelular. Algunos autores (Lazdins et al. 1991; Letterio y Roberts 1998; Tiemessen 2003) han descrito que, el exceso de producción de TGF- β 1 sin importar la fuente, altera la maduración de linfocitos B en cualquier estadio (pro-pre y plasmáticas), así como la producción de anticuerpos, por lo que este aumento podría estar relacionado en una memoria inmunológica deficiente (Ver Figura 17) (Lebman y Edmiston 1999) Por lo anterior, esto podría justificar el por qué las personas siguen infectándose con *T. pallidum* y cursar de novo toda la enfermedad. Por otro lado, el aumento de esta misma citocina inhibe la producción de óxido nítrico por macrófagos M1, por lo que estas células se vuelven deficientes en el proceso de eliminación de la bacteria. Esto podría sostener la hipótesis elaborada, más que evasión, sigue siendo un desajuste inmunológico que lejos de proteger al hospedero, lo vuelve resistente a sus mismas citocinas, por lo que no recibe señales de daño durante un estadio latente. Por lo tanto, a mayor concentración de TGF- β 1, menor respuesta celular efectora contra la espiroqueta y mayor progresión de la enfermedad.

Al realizar el análisis de factores de transcripción, observamos que, de los cinco genes canónicos, STAT-1 está altamente expresado en el 75% del grupo de hombres con VIH sin sífilis. Mientras que en los grupos co-infectados, la expresión disminuye en 13% y se reestablece después del tratamiento contra *T. pallidum*. Contrario a lo que sucedió con la expresión de T-bet. Este no se encontró expresado en hombres con VIH sin sífilis, mientras que, durante la infección se expresó en el 37% de las muestras analizadas. Al finalizar la infección por *T. pallidum* y recibir tratamiento, este factor de transcripción disminuyó, pero no se eliminó. Esto sugiere que la

respuesta pro-inflamatoria dependiente de T_{H1} STAT-1⁺ se encuentra activada para la infección de VIH, sin embargo, cuando se co-infectan con sífilis, T-bet aumenta. Por lo que este último factor de transcripción podría estar activado por otra subpoblación linfocitaria como células T CD8⁺ e inhibiendo la respuesta de T CD4⁺. Li y colaboradores en 2014 reportaron que la principal fuente de expresión de IFN- γ en personas con VIH y co-infectadas con *T. pallidum*, son los linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, en nuestro estudio, al realizar el análisis de proporciones de células T CD8⁺ no encontramos diferencia alguna entre grupos, por lo que esta hipótesis se descartó. Al realizar el análisis de células T_{H1} STAT-1⁺ T-bet⁺ TNF⁺, encontramos que solo el 3% lo estaban expresando en una sífilis tratada. Esto podría deberse a algún efecto secundario de la reacción Jarisch Herxheimer de manera sostenida, donde la inflamación es mediada por T_{H1} -TNF⁺ (Butler 2017).

Por otro lado, la prevalencia de Foxp3 fue del 50% en todas las muestras analizadas por lo que, células reguladoras están altamente representadas. Esto podría indicar que, ante una respuesta pro-inflamatoria exacerbada contra VIH y sífilis, juegan un papel importante y crucial para el control de manifestaciones clínicas y homeostasis celular linfoide. Se destaca que, esta respuesta es alta, previo a la infección por *T. pallidum*, y en un estadio de latencia esta disminuye. Esto podría indicar que, aunque los linfocitos estén presentes y secretando citocinas en altas concentraciones, probablemente estos genes canónicos se apagan, dejando en estado de anergia y sin actividad efectora a las células T_{reg} . Además, encontramos que de estas células Foxp3⁺, el 50% expresan TGF- β 1, por ende, al menos el 50% de estas son T_{reg} Foxp3⁺ TGF β 1⁺ y el restante podrían ser células B CD45⁺. Debido a esto se analizó la proporción de células B CD45⁺ en los diferentes estadios de la enfermedad, sin embargo, no encontramos diferencias significativas. Para el caso de RORc, aún no expresando IL-17 de manera sérica, se analizó la expresión del transcrito para T_{H17} . Tan sólo el 13% de todas las muestras analizadas expresó este factor de transcripción. Pudimos observar que, de estos, solo lo expresaban durante una sífilis activa y posterior a recibir el tratamiento antibiótico. Esto podría ser un efecto de Foxp3 como antagonista de RORc. Esto podría ser también un efecto sostenido de la adherencia al TAR, lo que inhibe la progresión de VIH.

Sin olvidar que la infección por *T. pallidum* carece de un modelo animal que asemeje la historia natural de la infección y el cultivo en biorreactor es complejo y de difícil acceso, aún falta mucho por estudiar y entender sobre las interacciones moleculares que permiten que progrese o no la enfermedad. En este trabajo destacamos la importancia de algunos biomarcadores canónicos expresados de manera sistémica y la utilidad de técnicas moleculares para caracterizar el perfil inmunológico de esta población. Si bien la citometría de flujo es la más utilizada para caracterizar

células, la logística de análisis por muestra incrementa la probabilidad de error. Por lo anterior, la amplificación de material genético por qPCR se vuelve una herramienta mucho más sofisticada y específica. Si bien requiere de seguir con parámetros establecidos (MIQE (Bustin et al. 2009)) para una correcta estandarización, esto vuelve a la técnica mucho más rigurosa que otras, para finalmente analizar en una sola corrida, tantas muestras sean posible, bajo un mismo parámetro, sin la necesidad de estar seleccionando o compensando de acuerdo a la muestra. En este trabajo, se logró estandarizar de manera correcta y bajo todos los parámetros reportados por las guías MIQE para el análisis riguroso de cada factor de transcripción canónico de cada subpoblación linfocitaria. Esto podría abrir nuevos horizontes al análisis de biomarcadores y con menor cantidad de muestra y menor tiempo de análisis.

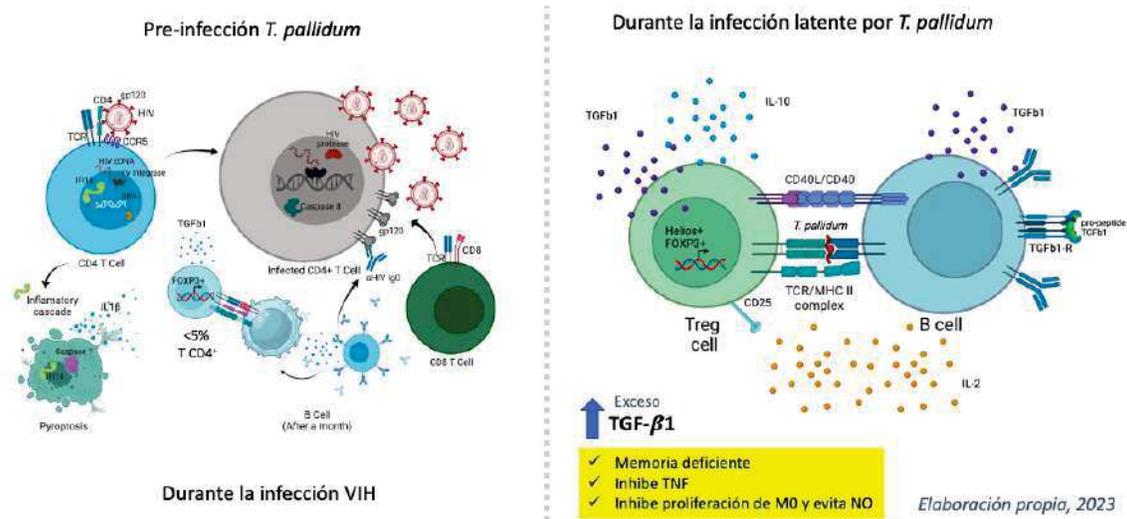


Figura 17. Desajuste intermolecular por TGF-β1 durante la sífilis. Durante una infección por VIH, el 5% de linfocitos T CD4+ sobreviviente a la cascada de inflamación por IL-1β, polariza a un perfil regulador mediado por Helios+ y Foxp3, de modo que secretan tanto IL-10 como TGFβ para contrarrestar la respuesta pro-inflamatoria contra el virus. Después de haberse infectado con *T. pallidum*, la expresión de TGFβ por células T_{reg} y células B CD45⁺ aumenta, produciendo un desajuste intermolecular entre poblaciones celulares del sistema inmune, probablemente en órganos linfoides secundarios como bazo o ganglios linfáticos.

12. Conclusiones

- La prevalencia de sífilis adquirida fue de 44% en PVV y 56% en Hombres exclusivamente.
- Se detectaron los estadios de sífilis en hombres a través de TRUST con una prevalencia de:
 - Sífilis activa 24%
 - Sífilis latente 37%
 - Sífilis tratada 39%
- Se logró evaluar la presencia de citocinas pro-inflamatorias y reguladoras, así como cuantificar cada una de ellas en hombres con VIH.
- TGF- β 1 podría estar jugando un papel importante en contra del mismo hospedero al desencadenar una respuesta supresora a la inflamación durante una sífilis latente. Por lo tanto, a mayor TGF- β 1, menor memoria inmunológica por linfocitos B, menor señalización de daño por macrófagos y mayor carga treponémica.
- Se logró estandarizar las técnicas moleculares para la detección de factores de transcripción canónicos de subpoblaciones de células T CD4⁺, así como implementar esta tecnología en los participantes del estudio y obtener un acercamiento para caracterizar la respuesta inmunológica de hombres con VIH.
- Al menos el 50% de los participantes expresa Foxp3⁺ TGF- β 1⁺, lo que podría estar indicando que las células T_{reg} son las responsables de esta respuesta. Sin embargo, otra probable fuente de esta citocina reguladora podrían ser células B (CD45⁺) o macrófagos (CD11c⁺). No obstante, la participación de neutrófilos (CD64⁺) reclutados por esta citocina podría tener un papel fundamental en la resolución de la sífilis.

13. Problemas y limitaciones

Es importante mencionar las limitaciones del estudio al no poder controlar variables como:

- Adherencia al tratamiento antirretroviral;
- Los resultados obtenidos son reflejo de una respuesta sistémica y no local.
- Presencia de otras infecciones de transmisión sexual u oportunistas, así como enfermedades cronicodegenerativas que mantienen un perfil pro-inflamatorio como Diabetes mellitus 2, hipertensión y obesidad.

14. Perspectivas

- Analizar el papel de TGF- β 1 como biomarcador monitoreando a la población estudiada en este trabajo.
- Cuantificar los niveles de óxido nítrico en el suero de los participantes y correlacionar esta información con aquellos linfocitos CD3⁺CD4⁺ (posibles macrófagos).
- Estudiar la respuesta de células B CD45⁺Foxp3⁺, así como también linfocitos T CD8⁺ TBX21⁺ y productores de IFN- γ .
- Corroborar si estos resultados son congruentes al realizar citometría de flujo.

15. Bibliografía

- ABBAS, AK, AH LICHTMAN, y JS POBER. 1999. *Inmunología celular y molecular*. Tercera. Interamericana McGraw Hill.
- Agosto, Luis M., y Andrew J. Henderson. 2018. «CD4⁺ T Cell Subsets and Pathways to HIV Latency». *AIDS Research and Human Retroviruses* 34 (9): 780-89. <https://doi.org/10.1089/aid.2018.0105>.
- Altfeld, Marcus, y Michael Gale Jr. 2015. «Innate Immunity against HIV-1 Infection». *Nature Immunology* 16 (6): 554-62. <https://doi.org/10.1038/ni.3157>.
- Amarnath, Shoba, Li Dong, Jun Li, Yuntao Wu, y WanJun Chen. 2007. «Endogenous TGF- β Activation by Reactive Oxygen Species Is Key to Foxp3 Induction in TCR-Stimulated and HIV-1-Infected Human CD4⁺CD25⁺T Cells». *Retrovirology* 4 (1): 57. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-57>.
- Babolin, Chiara, Amedeo Amedei, Dzintars Ozolins, Aija Zilevica, Mario Milco D'Elis, y Marina de Bernard. 2011. «TpF1 from *Treponema Pallidum* Activates Inflammasome and Promotes the Development of Regulatory T Cells». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (3): 1377-84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100615>.
- Bosch, B, B Grigorov, J Senserrich, B Clotet, J Darlix, D Muriaux, y J Este. 2008. «A Clathrin–Dynamin-Dependent Endocytic Pathway for the Uptake of HIV-1 by Direct T Cell–T Cell Transmission». *Antiviral Research* 80 (2): 185-93. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.06.004>.
- Branson, Bernard M. 2015. «HIV Testing Updates and Challenges: When Regulatory Caution and Public Health Imperatives Collide». *Current HIV/AIDS Reports* 12 (1): 117-26. <https://doi.org/10.1007/s11904-014-0251-7>.
- Bustin, Stephen A, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellems, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. «The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments». *Clinical Chemistry* 55 (4): 611-22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Butler, Thomas. 2017. «The Jarisch–Herxheimer Reaction After Antibiotic Treatment of Spirochetal Infections: A Review of Recent Cases and Our Understanding of Pathogenesis». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (1): 46-52. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0434>.
- Caetano, Diogo G., Hury H. S. de Paula, Gonzalo Bello, Brenda Hoagland, Larissa M. Villela, Beatriz Grinsztejn, Valdilea G. Veloso, Mariza G. Morgado, Monick L. Guimarães, y Fernanda H. Côrtes. 2020. «HIV-1 Elite Controllers Present a High Frequency of Activated Regulatory T and Th17 Cells». Editado por Roberto F. Speck. *PLOS ONE* 15 (2): e0228745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228745>.
- Carlson, J. Andrew, Ganary Dabiri, Bernard Cribier, y Stewart Sell. 2011. «The Immunopathobiology of Syphilis: The Manifestations and Course of Syphilis Are Determined by the Level of Delayed-Type Hypersensitivity». *The American Journal of Dermatopathology* 33 (5): 433-60. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181e8b587>.
- Caruso, María Paula, Juliana Falivene, María Pía Holgado, Diego Hernán Zurita, Natalia Laufer,

- Carina Castro, Ángeles Nico, et al. 2019. «Impact of HIV-ART on the Restoration of Th17 and Treg Cells in Blood and Female Genital Mucosa». *Scientific Reports* 9 (1): 1978. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38547-1>.
- Caza, Tiffany, y Steve Landas. 2015. «Functional and Phenotypic Plasticity of CD4⁺ T Cell Subsets». *BioMed Research International* 2015: 1-13. <https://doi.org/10.1155/2015/521957>.
- Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), Branson Bernard M., Association of Public Health Laboratorie, Owen S. Michele, Wesolowski Laura G., Bennett Berry, Werner Barbara G., Wroblewski Kelly E., y Pentella Michael A. 2014. «Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection : updated recommendations». Centers for Disease Control and Prevention. <https://doi.org/10.15620/cdc.23447>.
- Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. 2009. «Guía de Práctica Clínica. Enfermedades de Transmisión Sexual en el Adolescente y Adulto que producen Úlceras Genitales: Herpes, Sífilis, Chancroide, Linfogranuloma venéreo y Granuloma inguinal. Evidencias y Recomendaciones.» http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/094_GPC_ETSadolescyaadulto/ENF_SEXUALES_EVR_CENETEC2.pdf.
- Chen, Miao-Jung, Susan Scheer, Trang Q. Nguyen, Robert P. Kohn, y Sandy Schwarcz. 2018. «HIV Co-Infection among Persons Diagnosed with Sexually Transmitted Diseases, San Francisco, 2007-2014». *Sexually Transmitted Diseases*, enero, 1. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000789>.
- Cruz, Adriana R., Lady G. Ramirez, Ana V. Zuluaga, Allan Pillay, Christine Abreu, Carlos A. Valencia, Carson La Vake, et al. 2012. «Immune Evasion and Recognition of the Syphilis Spirochete in Blood and Skin of Secondary Syphilis Patients: Two Immunologically Distinct Compartments». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (7): e1717. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001717>.
- Delaney, Kevin P., Debra L. Hanson, Silvina Masciotra, Steven F. Ethridge, Laura Wesolowski, y Sherry Michele Owen. 2017. «Time Until Emergence of HIV Test Reactivity Following Infection With HIV-1: Implications for Interpreting Test Results and Retesting After Exposure». *Clinical Infectious Diseases* 64 (1): 53-59. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw666>.
- Edmondson, Diane G., Bo Hu, y Steven J. Norris. 2018. «Long-Term In Vitro Culture of the Syphilis Spirochete Treponema Pallidum Subsp. Pallidum». *MBio* 9 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01153-18>.
- Elrefaei, Mohamed, Candace M. Burke, Chris A.R. Baker, Norman G. Jones, Stephanie Bousheri, David R. Bangsberg, y Huyen Cao. 2010. «HIV-Specific TGF- β -Positive CD4⁺ T Cells Do Not Express Regulatory Surface Markers and Are Regulated by CTLA-4». *AIDS Research and Human Retroviruses* 26 (3): 329-37. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0149>.
- Epstein, Franklin H., Giuseppe Pantaleo, Cecilia Graziosi, y Anthony S. Fauci. 1993. «The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection». *New England Journal of Medicine* 328 (5): 327-35. <https://doi.org/10.1056/NEJM199302043280508>.
- González-Domenech, Carmen M., Isabel Antequera Martín-Portugués, Encarnación Clavijo-Frutos, Manuel Márquez-Solero, Jesús Santos-González, y Rosario Palacios-Muñoz. 2015. «Sífilis e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana: una endemia en hombres que

- tienen sexo con hombres». *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33 (1): 32-36. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.07.013>.
- Guo, Na, Yongchang Chen, Bin Su, Xiaodong Yang, Qiuyue Zhang, Ting Song, Hao Wu, Cuie Liu, Lifeng Liu, y Tong Zhang. 2020. «Alterations of CCR2 and CX3CR1 on Three Monocyte Subsets During HIV-1/Treponema pallidum Coinfection». *Frontiers in Medicine* 7 (junio): 272. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00272>.
- Guo, Na, Lifeng Liu, Xiaodong Yang, Ting Song, Guanxin Li, Li Li, Taiyi Jiang, et al. 2019. «Immunological Changes in Monocyte Subsets and Their Association With Foxp3+ Regulatory T Cells in HIV-1-Infected Individuals With Syphilis: A Brief Research Report». *Frontiers in Immunology* 10 (abril): 714. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00714>.
- He, Wei-Qiang, Huan-Li Wang, Dao-Qing Zhong, Lu-Yang Lin, Xiao-Shan Qiu, y Ri-Dong Yang. 2015. «Treponemal Antibody in CSF and Cellular Immunity in Peripheral Blood of Syphilitic Patients with Persisting Positive Rapid Plasma Regain». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (5): 5775-80.
- Hernández-Pliego, Adriana, Dayana Nicté Vergara-Ortega, Antonia Herrera-Ortíz, Cairo Toledano-Jaimes, Fernando R. Esquivel-Guadarrama, y Miguel Ángel Sánchez-Alemán. 2022. «IL-10 and IL-17 as Progression Markers of Syphilis in People Living with HIV: A Systematic Review». *Biomolecules* 12 (10): 1472. <https://doi.org/10.3390/biom12101472>.
- Hook, Edward W. 2017. «Syphilis». *Lancet (London, England)* 389 (10078): 1550-57. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32411-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32411-4).
- Hurt, Christopher B., Julie A.E. Nelson, Lisa B. Hightow-Weidman, y William C. Miller. 2017. «Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers». *Sexually Transmitted Diseases* 44 (12): 739-46. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000719>.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. 2009. «Enfermedades de Transmisión Sexual en el Adolescente y Adulto que producen Úlceras Genitales: Herpes, Sífilis, Chancroide, Linfogranuloma venéreo y Granuloma Inguinal.»
- . 2017. «Tratamiento antirretroviral del paciente adulto con infección por el VIH.» CENETEC. <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/245GER.pdf>.
- Janeway, Ch.A., P Travers, M Walport, y JD Capra. 1999. *Immunobiology: the immune systema in health and disease*. Oxford.
- Kenyon, Chris, Kara Krista Osbak, Tania Crucitti, y Luc Kestens. 2017a. «The Immunological Response to Syphilis Differs by HIV Status; a Prospective Observational Cohort Study». *BMC Infectious Diseases* 17 (1): 111. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2201-7>.
- . 2017b. «The Immunological Response to Syphilis Differs by HIV Status; a Prospective Observational Cohort Study». *BMC Infectious Diseases* 17 (1): 111. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2201-7>.
- Knudsen, Andreas, Thomas Benfield, y Kristian Kofoed. 2009. «Cytokine Expression during Syphilis Infection in HIV-1-Infected Individuals». *Sexually Transmitted Diseases* 36 (5): 300-304. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e318193ca26>.
- Kolte, L., J. C. Gaardbo, K. Skogstrand, L. P. Ryder, A. K. Ersbøll, y S. D. Nielsen. 2009. «Increased Levels of Regulatory T Cells (T_{regs}) in Human Immunodeficiency Virus-Infected

- Patients after 5 Years of Highly Active Anti-Retroviral Therapy May Be Due to Increased Thymic Production of Naive T_{regs}». *Clinical & Experimental Immunology* 155 (1): 44-52.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03803.x>.
- Kotsafti, Ourania, Vassilios Paparizos, Sofia Kourkounti, Argiro Chatziioannou, Electra Nicolaidou, Violetta Kapsimali, y Christina Antoniou. 2016. «Early Syphilis Affects Markers of HIV Infection». *International Journal of STD & AIDS* 27 (9): 739-45.
<https://doi.org/10.1177/0956462415592326>.
- Kubby, J. 1997. *Immunology*. Tercera. Freeman & Co.
- Lazdins, J.K, T Klimkait, E Alteri, M Walker, K Woods-Cook, D Cox, G Bilbe, R Shipman, N Cerletti, y G McMaster. 1991. «TGF- β : Upregulator of HIV Replication in Macrophages». *Research in Virology* 142 (2-3): 239-42. [https://doi.org/10.1016/0923-2516\(91\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0923-2516(91)90063-9).
- Leader, Brandon T., Charmie Godornes, Wesley C. VanVoorhis, y Sheila A. Lukehart. 2007. «CD4+ Lymphocytes and Gamma Interferon Predominate in Local Immune Responses in Early Experimental Syphilis». *Infection and Immunity* 75 (6): 3021-26.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01973-06>.
- Lebman, Deborah A., y Jeffery S. Edmiston. 1999. «The Role of TGF- β in Growth, Differentiation, and Maturation of B Lymphocytes». *Microbes and Infection* 1 (15): 1297-1304.
[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)00254-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)00254-3).
- Letterio, John J., y Anita B. Roberts. 1998. «REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- β ». *Annual Review of Immunology* 16 (1): 137-61.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.137>.
- Lewis, Gavin M., Ellen J. Wehrens, Lara Labarta-Bajo, Hendrik Streeck, y Elina I. Zuniga. 2016. «TGF- β Receptor Maintains CD4 T Helper Cell Identity during Chronic Viral Infections». *Journal of Clinical Investigation* 126 (10): 3799-3813. <https://doi.org/10.1172/JCI87041>.
- Li, Zhen, Xiaofan Lu, Zhiliang Hu, Zhenwu Luo, Wei Jiang, Hao Wu, Yanqing Gao, et al. 2017. «Syphilis Infection Differentially Regulates the Phenotype and Function of $\Gamma\delta$ T Cells in HIV-1-Infected Patients Depends on the HIV-1 Disease Stage». *Frontiers in Immunology* 8: 991.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00991>.
- Lynn, Wa, y S Lightman. 2004. «Syphilis and HIV: A Dangerous Combination». *The Lancet Infectious Diseases* 4 (7): 456-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01061-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01061-8).
- Nilsson, J., A. Boasso, P. A. Velilla, R. Zhang, M. Vaccari, G. Franchini, G. M. Shearer, J. Andersson, y C. Chougnnet. 2006. «HIV-1-Driven Regulatory T-Cell Accumulation in Lymphoid Tissues Is Associated with Disease Progression in HIV/AIDS». *Blood* 108 (12): 3808-17.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-021576>.
- «OPS/OMS | Sífilis». 2020. OPS/OMS | Sífilis. 2020.
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14869:sti-syphilis&Itemid=3670&lang=es#:~:text=En%20el%202016%2C%20la%20OMS,las%20embarazadas%20%5Ben%20ingl%C3%A9s%5D.
- Orbe-Orihuela, Yaneth Citlalli, Miguel Ángel Sánchez-Alemán, Adriana Hernández-Pliego, Claudia Victoria Medina-García, y Dayana Nicté Vergara-Ortega. 2022. «Syphilis as Re-Emerging Disease, Antibiotic Resistance, and Vulnerable Population: Global Systematic Review

- and Meta-Analysis». *Pathogens* 11 (12): 1546. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121546>.
- Peeling, Rosanna W., David Mabey, Mary L. Kamb, Xiang-Sheng Chen, Justin D. Radolf, y Adele S. Benzaken. 2017. «Syphilis». *Nature Reviews. Disease Primers* 3 (octubre): 17073. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.73>.
- Permanyer, Marc, Ester Ballana, y José A. Esté. 2010. «Endocytosis of HIV: Anything Goes». *Trends in Microbiology* 18 (12): 543-51. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.003>.
- Phetsouphanh, Chansavath, Yin Xu, Janaki Amin, Nabila Seddiki, Francesco Procopio, Rafick Pierre Sekaly, John J. Zaunders, y Anthony D. Kelleher. 2013. «Characterization of Transcription Factor Phenotypes within Antigen-Specific CD4+ T Cells Using Qualitative Multiplex Single-Cell RT-PCR». Editado por Derya Unutmaz. *PLoS ONE* 8 (10): e74946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074946>.
- Pillay, Allan. 2018a. «Centers for Disease Control and Prevention Syphilis Summit—Diagnostics and Laboratory Issues». *Sexually Transmitted Diseases* 45 (9S): S13-16. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000843>.
- . 2018b. «Centers for Disease Control and Prevention Syphilis Summit—Diagnostics and Laboratory Issues»: *Sexually Transmitted Diseases* 45 (septiembre): S13-16. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000843>.
- Ramírez, Dr Hugo López-Gatell. 2020. «SISTEMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VIH», 19. «Reported STDs in the United States, 2017». 2018, 3.
- Roberts, Chelsea P., y Jeffrey D. Klausner. 2016. «Global Challenges in Human Immunodeficiency Virus and Syphilis Coinfection among Men Who Have Sex with Men». *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 14 (11): 1037-46. <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1236683>.
- Salado-Rasmussen, Kirsten. 2015. «Syphilis and HIV Co-Infection. Epidemiology, Treatment and Molecular Typing of *Treponema Pallidum*». *Danish Medical Journal* 62 (12): B5176.
- Salazar, Juan C., Adriana R. Cruz, Constance D. Pope, Liliana Valderrama, Rodolfo Trujillo, Nancy G. Saravia, y Justin D. Radolf. 2007. «*Treponema Pallidum* Elicits Innate and Adaptive Cellular Immune Responses in Skin and Blood during Secondary Syphilis: A Flow-Cytometric Analysis». *The Journal of Infectious Diseases* 195 (6): 879-87. <https://doi.org/10.1086/511822>.
- Sánchez Alemán, Miguel A., Antonia Herrera-Ortiz, Felipe J Uribe-Salas, Ma. Leonidez Olamendi-Portugal, Santa García-Cisneros, y Carlos Jesús Conde-Glez. 2015. «Análisis de la tendencia de sífilis adquirida en México durante el periodo 2003-2013». *Salud Pública de México* 57 (4): 335. <https://doi.org/10.21149/spm.v57i4.7577>.
- Shin, Jong Lan, Kee Yang Chung, Jin Moon Kang, Tae Hyung Lee, y Min Geol Lee. 2004. «The Effects of *Treponema Pallidum* on Human Dendritic Cells». *Yonsei Medical Journal* 45 (3): 515-22. <https://doi.org/10.3349/ymj.2004.45.3.515>.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2020. «Anuario 1984-2019». 2020. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.
- Taylor, Melanie M., Getahun Aynalem, Leanne M. Olea, Peter He, Lisa V. Smith, y Peter R. Kerndt. 2008. «A Consequence of the Syphilis Epidemic Among Men Who Have Sex With Men

(MSM): Neurosyphilis in Los Angeles, 2001-2004»: *Sexually Transmitted Diseases* 35 (5): 430-34. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3181644b5e>.

Tiemessen, M. M. 2003. «Transforming Growth Factor- Inhibits Human Antigen-Specific CD4+ T Cell Proliferation without Modulating the Cytokine Response». *International Immunology* 15 (12): 1495-1504. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg147>.

Tsuboi, Motoyuki, Jayne Evans, Ella P Davies, Jane Rowley, Eline L Korenromp, Tim Clayton, Melanie M Taylor, David Mabey, y R Matthew Chico. 2021. «Prevalence of Syphilis among Men Who Have Sex with Men: A Global Systematic Review and Meta-Analysis from 2000–20». *The Lancet Global Health* 9 (8): e1110-18. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00221-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00221-7).

Wang, Cuini, Lin Zhu, Zixiao Gao, Zhifang Guan, Haikong Lu, Mei Shi, Ying Gao, Huanbin Xu, X. Frank Yang, y Pingyu Zhou. 2014. «Increased Interleukin-17 in Peripheral Blood and Cerebrospinal Fluid of Neurosyphilis Patients». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (7): e3004. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003004>.

Yan, Jun, Lian Luo, Jie Han, Dingyan Yan, Binhai Zhang, Zhongdong Zhang, Jinchuan Shi, et al. 2021. «Comparing Noninvasive Predictors of Neurosyphilis Among Syphilis Patients With and Without HIV Co-Infection Based on the Real-World Diagnostic Criteria: A Single-Center, Retrospective Cohort Study in China». *AIDS Research and Human Retroviruses*, agosto. <https://doi.org/10.1089/AID.2021.0085>.

Yu, Qian, Yuanyuan Cheng, Yuanyuan Wang, Cuini Wang, Haikong Lu, Zhifang Guan, Jian Huang, et al. 2017. «Aberrant Humoral Immune Responses in Neurosyphilis: CXCL13/CXCR5 Play a Pivotal Role for B-Cell Recruitment to the Cerebrospinal Fluid». *The Journal of Infectious Diseases* 216 (5): 534-44. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix233>.

Zhao, Jianbin, Jie Ma, Xiaoyan Zhang, Qing Li, y Xueping Yang. 2016. «Equilibrium of Treg/Th17 Cells of Peripheral Blood in Syphilitic Patients with Sero-Resistance». *Experimental and Therapeutic Medicine* 11 (6): 2300-2304. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3178>.

16. Anexos

Sífilis	Personas SIN VIH					
Estadio	Células involucradas	Respuesta	Citocinas o Anticuerpos secretados	Factores de transcripción involucrados	Referencia	ID
Primaria	Th1	Alta	IFN- γ / TNF	STAT1 / T-bet	(Leader et al. 2007; Salazar et al. 2007; Carlson et al. 2011)	17403876; 17299719; 21694502
	Th2	Baja	IL4	GATA3	(Leader et al. 2007)	17403876
	Treg	Alta	IL-10 / TGF- β 1	FoxP3	(Leader et al. 2007; Zhao et al. 2016; Babolin et al. 2011)	17403876; 27284313; 21709157
	Th17	Baja	IL-17Ra	ROR- γ t	(Zhao et al. 2016; Wang et al. 2014; Li et al. 2017)	27284313; 25080350; 28871259
	Mo	Alta	--	--	(Salazar et al. 2007; Cruz et al. 2012)	17299719; 22816000
	CD	Alta	--	--	(Shin et al. 2004; Cruz et al. 2012)	15227740; 22816000
Secundaria	NK	Alta (piel)	IFN- γ	RORa/GATA3	(Cruz et al. 2012)	22816000
	Th1	Alta	IFN- γ / TNF	STAT1/T-bet	(Leader et al. 2007; Salazar et al. 2007; Carlson et al. 2011)	17403876; 17299719; 21694502
	Treg	Alta	IL-10 / TGF- β 1	FoxP3	(Leader et al. 2007; Zhao et al. 2016; Babolin et al. 2011)	17403876; 27284313; 21709157
	CD8	Baja	IFN- γ Granzima B	T-bet	(Leader et al. 2007; Zhao et al. 2016; Babolin et al. 2011)	17403876; 22816000
	CD	Baja	--	--	(Shin et al. 2004; Cruz et al. 2012)	15227740; 22816000
Terciaria	NK	Baja (sangre)	IFN- γ	RORa/GATA3	(Cruz et al. 2012)	22816000
	Th17	Alta	IL-17Ra	ROR- γ t	(Zhao et al. 2016; Wang et al. 2014; Li et al. 2017)	27284313; 25080350; 28871259
	B	Alta	IgM / IgG	NFkb	(He et al. 2015; Yu et al. 2017)	26191296; 28931218
	CD8	Alta	IFN- γ	T-bet	(Leader et al. 2007)	17403876

Fuente. Elaboración propia

Anexo 2 Respuesta inmune en la co-infección de VIH y sífilis: Revisión sistemática de literatura.

Sífilis	Personas con VIH				
Estadio	Células involucradas	Respuesta	Resultados	Referencia	ID
Primaria	CD4	Baja	Se observó un decremento de 85% y 80% en personas con TAR y sin TAR respectivamente. La co-infección primaria se asoció con un aumento de IL-10. Tanto IL-10 como TNF disminuyeron después del tratamiento contra sífilis.	(Kotsafti et al. 2016; Knudsen, Benfield, y Kofoed 2009)	26113517; 19265730
	Tγδ	Alta	Hay mayor número de células Tγδ productoras de IL-17 y hasta 8 veces mayor producción de IFN-γ.	(Li et al. 2017)	28871259
	T reg	Alta	Mayor número de células Treg Foxp3+Helios+CD25+ en comparación con el grupo de referencia.	(Guo et al. 2019)	31024549
	Monocitos	Alta	Mayor presentación de antígeno vía HLA-DR y migración por CCR2 y CX3CR1.	(Guo et al. 2020)	32626718
Secundaria	CD4	Alta	Se reportó 9 veces mayor concentración de IL-10	(Kenyon et al. 2017a)	28143443
Terciaria	CD4	Baja	"linfopenia" como predictor de neurosífilis.	(Yan et al. 2021)	34314231

Fuente. Elaboración propia.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Dirigido a: Hombres que tienen sexo con hombres y que viven con VIH

Título de proyecto: Respuesta de células T cooperadoras y perfil de citocinas asociado a diferentes estadios de sífilis en HSH que viven con VIH.

Nombre del Investigador Principal: Miguel Ángel Sánchez Alemán

Introducción/Objetivo

En las últimas décadas, se ha observado un incremento de sífilis en personas que viven con VIH. Esto representa un problema a enfrentar en salud pública, ya que ambas infecciones actúan de manera sinérgica complicando la salud y calidad de vida de quien lo padece. Ambas al ser infecciones silenciosas, representan un reto para el diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno, por lo que se requieren de nuevas estrategias de diagnóstico para evitar complicaciones a futuro. El objetivo principal de este proyecto es detectar sífilis en hombres que tienen sexo con hombres y que viven con VIH.

Estimado Señor:

El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en colaboración con los Centros Ambulatorios de Prevención y Atención en Sida e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) de Cuernavaca, Morelos, México, está realizando el proyecto de investigación arriba mencionado. El objetivo del estudio es determinar diferentes marcadores inmunológicos, tales como citocinas proinflamatorias y citocinas reguladoras, en diferentes estadios de sífilis, así como identificar qué células producen estas citocinas y los factores sociodemográficos asociados a la co-infección con VIH, durante el año 2020 a 2022.

Usted ha sido invitado a participar en el presente proyecto de investigación, debido a que forma parte de la población HSH que viven con VIH, además es usted mayor de edad (mayor de 18 años).

Para participar en el estudio, es importante que considere la siguiente información. Siéntase libre de preguntar cualquier asunto que no le quede claro.

Procedimientos:

Si Usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente:

1. Se le aplicará un cuestionario para obtener información sobre usted.
2. Le haremos algunas preguntas generales, como edad y lugar de origen, además se le preguntará acerca de su sexualidad. La encuesta tendrá una duración máxima de 20 min y se realizará en una sala privada dentro del Centro Ambulatorio de Prevención y Atención en Sida e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS).
3. Se le solicitará que done una muestra de sangre (aproximadamente una cucharadita, 6 ml), la cual utilizaremos para detectar sífilis.

4. Todas las muestras serán transportadas al laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual en el Instituto Nacional de Salud Pública, para su almacenamiento y procesamiento.
5. Si usted está de acuerdo, una proporción de las mismas será almacenada para generar un biobanco para estudios a futuro relacionados con enfermedades infecciosas de importancia en salud pública. Las muestras serán etiquetadas con número de folio y no con su nombre, para asegurar confidencialidad de datos personales.

Le aclaramos que el cuestionario y la toma de muestra de sangre (de su brazo) serán realizadas por personal capacitado y haciendo uso de equipo de protección personal (guantes, alcohol, bata y cubrebocas). También le aclaramos que estas pruebas no implican un riesgo para usted.

Beneficios: Dos semanas después, se le entregaran resultados de la prueba de sífilis y en caso de ser positiva, se le avisará al médico tratante del CAPASITS.

Confidencialidad: Toda la información que Usted nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

Participación Voluntaria/Retiro: Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Podrá solicitar también que se retire su muestra del estudio sin que ello implique ningún tipo de consecuencia, para ello le pedimos dirigirse al Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán, investigador responsable del estudio, al correo electrónico msanchez@insp.mx.

Riesgos Potenciales/Compensación Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.

Por favor marque **UNO** de los recuadros de abajo para indicar su decisión.

	Mi muestra solo se puede utilizar para este estudio.
	Mi muestra puede ser utilizada para este estudio e investigaciones futuras.

Aviso de Privacidad Simplificado: El investigador principal de este estudio, Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán, es responsable del tratamiento y resguardo de los datos personales que nos proporcione, los cuales serán protegidos conforme a lo dispuesto por la **Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados**. Usted quedará identificado(a) únicamente con un número y no con su nombre, de manera que los datos personales que le solicitaremos no podrán ser vinculados a usted y serán utilizados exclusivamente para las finalidades expuestas en este documento. Usted puede solicitar la corrección de sus datos o que sus datos se

eliminen de nuestras bases o retirar su consentimiento para su uso. En cualquiera de estos casos le pedimos dirigirse al investigador responsable del proyecto a la siguiente dirección de correo msanchez@insp.mx. El aviso de privacidad integral puede consultarse en la siguiente liga: <http://gapsectorpublico.inai.org.mx/Login.aspx>.

Números a Contactar: Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con el/la investigador/a) responsable del proyecto: Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán, al siguiente número de teléfono (777)3293000 ext:2404 en un horario de 9:00 a 17:00 ó al correo electrónico: msanchez@insp.mx.

Si usted tiene preguntas generales relacionadas con sus derechos como participante de un estudio de investigación, puede comunicarse con la Presidente del Comité de Ética del INSP, Dra. Angélica Ángeles Llerenas, al teléfono (777) 329-3000 ext. 7424 de 9:00 am a 16:00 hrs. ó si lo prefiere puede escribirle a la siguiente dirección de correo electrónico etica@insp.mx

Si usted acepta participar en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

Declaración de la persona que da el consentimiento

- Se me ha leído esta Carta de consentimiento.
- Me han explicado el estudio de investigación incluyendo el objetivo, los posibles riesgos y beneficios, y otros aspectos sobre mi participación en el estudio.
- He podido hacer preguntas relacionadas a mi participación en el estudio, y me han respondido satisfactoriamente mis dudas.

Actividades en las cuales usted acepta participar (marque con una X).

- Responder el cuestionario.
- Toma de muestra de sangre venosa para diagnóstico serológico de sífilis.
- Almacenamiento de la muestra de sangre.
- Utilización de la muestra para futuras investigaciones relacionados a ITS (Clamidia y hepatitis B y C).
- Utilización de la muestra de sangre para investigaciones de otras infecciones no relacionadas a esta investigación.

Si usted entiende la información que le hemos dado en este formato, está de acuerdo en participar en este estudio, de manera total o parcial, y también está de acuerdo en permitir que su información de salud sea usada como se describió antes, entonces le pedimos que indique su consentimiento para participar en este estudio.

Registre su nombre y firma en este documento del cual le entregaremos una copia.

Nombre del participante: _____

Firma: _____

Fecha/hora _____

Si es analfabeta (incluir huella digital)

Un testigo alfabetizado (elegido por el participante) debe firmar.

He sido testigo de la lectura precisa del formulario de consentimiento para el posible participante, y la persona ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado su consentimiento libremente.

Nombre: _____

Firma: _____

Relación con la participante: _____

Fecha/hora: _____

Nombre y firma del investigador o persona que obtiene el consentimiento:

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha/hora _____

Extracción de RNA de sangre completa

Método por columna (OMEGA)

1. La clave para desnaturalizar RNAsas es 2-Mercaptoetanol y se debe agregar 200 ul por 1mL de Buffer de lisis NTL. Esta mezcla puede durar 4 semanas a temperatura ambiente. Una alícuota de 1.2 mL rinde 3 muestras de 200ul.
2. Al agregar la muestra a la columna evite tocar la membrana.
3. Añadir 450ml de agua desionizada esteril al buffer ERL 10x

NOTA: Trabajar RAPIDO y a temperatura ambiente.

PROTOCOLO E.Z.N.A.

1. Añadir 5 volúmenes de buffer ERL a 1 de muestra. Ej. 5 ml a 1ml o 1.25 ml a 250 ul de muestra.
2. Reposar por 15 min y vortexear 2 veces durante la incubación. NOTA: Cuando la solución se vuelve traslucida, indica lisis de eritrocitos. Para aquellas muestras con hematocrito elevado o tasa de sedimentación elevada, extiende la incubación por 20 min.
3. Centrifugar a 400 xg a 4°C por 10 minutos para formar un pellet de leucocitos. Retira el sobrenadante.
4. Añade 2 volúmenes de Buffer ERL por volumen de sangre utilizada en el paso 1. Vortexea y disgrega el pellet.
5. Centrifugar a 400 xg a 4°C por 10 min. Retira el sobrenadante.
6. Agrega Buffer de lisis NTL (2:1) de muestra. Ej. 200 a 300 ul de muestra agrega 400 ul de buffer. De 500 a 1000 ul agrega 700 ul de buffer. Disgrega el pellet por vortex.
7. Inserta una columna homogeneizadora a un tubo de colecta de 2mL.
8. Transfiere el lisado celular a la columna (Que quede bien húmeda). NOTA: Si la muestra aún es muy viscosa, añade otro volumen de NTL.
9. Centrifuga a máxima velocidad por 2 minutos.
10. Remueve la columna y guarda el filtrado (líquido).
11. Añade el mismo volumen de etOH 70%, es decir, para 200 ul de muestra añade 200 ul de etOH 70%. Mezcla por vortex.
12. Inserta una columna HiBind RNA Mini a otro tubo de colecta de 2mL.
13. Transfiere el volumen total a la columna.
14. Centrifuga a más de 10 000 xg por 30 segundos.
15. Deshecha el filtrado. Reutiliza el tubo de colecta.
16. Repite si es necesario los pasos 13 al 15. (en caso de ser demasiada muestra).
17. Añade 500 ul de Buffer de lavado I RWF a la columna.
18. Centrifuga a más de 10 000 xg por 30 segundos.
19. Deshecha el filtrado y el tubo de colecta.

20. Transfiere la columna HiBind Mini a otro tubo de colecta.
21. Añade 700 ul de Buffer de lavado II RNA.
NOTA: El buffer de lavado II RNA fue diluido con etOH 100% previamente.
22. Centrifuga a más de 10 000 xg por 30 segundos.
23. Retira el filtrado y reutiliza el tubo.
24. Repite los pasos 21-23 para un segundo lavado con buffer II.
25. Centrifuga a máxima velocidad por 2 minutos hasta secar completamente la columna.
26. Transfiere la columna a un tubo limpio de 1.5 ml.
27. Añade de 50 a 100 ul de agua libre de nucleasas.
NOTA: Precalentar el agua a 70°C ayudara a mejorar la elución de RNA.
28. Centrifuga a máxima velocidad por 2 minutos.
29. El RNA diluido puede ser guardado a -70°C.
NOTA: Alicuotar de 20 ul en 20ul.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Determinar la concentración de RNA calculando la proporción 260/280. Una proporción 2 es considerada puro.

NOTA: El RNA puede cuantificarse por absorbancia sin dilución previa, utilizando espectrofotómetro NanoDrop. La integridad del RNA se puede analizar mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia.

Se procede a generar cDNA por RT-PCR y verificar la integridad del amplicon por electroforesis.

El amplicon de cDNA se almacena para generar el banco de muestras.

Diseño de *primers* para factores de transcripción canónicos

Se requieren ciertos parámetros para el mejor diseño de *primers* específicos para amplificar una región de interés. Tales parámetros se mencionan a continuación:

- Deben ser fragmentos cortos de entre 15 a 20 pb
- Deben tener un contenido de CG entre 50 al 60%
- No deben formar dímeros
- No formar horquillas
- Una temperatura de fusión entre 55 a 65°C
- No se ligan a sitios secundarios

Tomando en cuenta estas características, se utilizará un programa bioinformático como <https://www.idtdna.com/pages/tools> u *OligoAnalyzer Tool*. En estos programas se introduce la secuencia FASTA del RNAm de interés. En este caso, se requiere obtener y analizar los mejores primers para amplificar T-bet y STAT1 para linfocitos Th1; Foxp3 para linfocitos Treg y RORγt para linfocitos Th17. Una vez obtenidos todos los juegos de primers para cada factor de transcripción

canónico, se procede a la retro-transcripción y amplificación cuantitativa por PCR. Como control interno se propone el RNAm de GAPDH.

RT qPCR para la detección de factores de transcripción

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) es basada en la fluorescencia. Posee la capacidad de detectar y medir pequeñas cantidades de ácidos nucleicos. La reverso-transcripción, una variable del PCR convencional, permite amplificar y convertir el RNA a cDNA. De modo que, el RNA mensajero extraído previamente, se retro-transcribe a cDNA y se amplifica para poder cuantificar la presencia del gen de interés.

Esta técnica está basada en fluorocromos. El DNA amplificado en cada ciclo se une a un fluorocromo. Esta unión produce fluorescencia y es captada por el termociclador. Estos fluorocromos hibridan entre el *primer forward* (5'-3') y *primer reverse* (3'-5'). Esta emisión de fluorescencia permite monitorizar y deducir el nivel de amplificación del gen.

Anexo

PROTOCOLO DE ELISA de CITOCINAS Boster PicoKine ELISA

Hoja de Trabajo para documentar el Ensayo de ELISA IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ y ****TGF β 1** (encierre en un círculo cuál realizará)

Lote: _____ Fecha caducidad: _____ Procesó: _____ Fecha de Proceso: _____

ANTES DE EMPEZAR:

Llevar a temperatura ambiente todos los reactivos (18-25°C). El ensayo puede realizarse a temperatura ambiente, sin embargo, la casa comercial recomienda realizarlo a 37°C para mejor consistencia con los resultados. También, la incubación con TMB (15-25 min) está basada a 37°C. Decisión es que se maneja a 37°C. Aprobado por el Dr. Miguel A. S. A. (23/02/23 2:40 P.M.)

IMPORTANTE: Todas las muestras de pacientes serán manejadas por duplicado.

**** El proceso de esta ELISA requiere que las muestras a procesar reciban un tratamiento previo de "activación de TGF β 1" Revise y realice el protocolo de activación, para poder iniciar con la prueba de ELISA. Ver más abajo en ANEXOS el protocolo de preación de sol. "A" y "B" y la Activación del TGF β 1.**

Tipo de prueba a realizar: Semicuantitativo _____ o •Cuantitativo _____ • Revise cuantos y cuales calibradores utilizará en la siguiente hoja.

1. **Remueva** el exceso de pozos de la placa a utilizar y **guarde a 4 °C sellando bien el empaque** Sí _____.
2. **STD-Preparación del estándar:** utilizar a partir del Stok liofilizado a 10 ng/ml., para cada ELISA. Antes de utilizar, **darle un spin gentil** _____. ◆ **Reconstituir el estándar añadiendo** _____ **1 ml de diluyente de muestra. Permita a la solución hidratarse por un mínimo** _____ **de 10 minutos totales en agitación gentil, antes de realizar las diluciones para la curva estándar. NO prepare el estándar con más de 2 hrs. de anticipación.**
3. **Para este punto verifique en los ANEXOS la hoja que necesita imprimir, para su proceso de preparación de STD.**
4. **Diluir las muestras de plasma/suero/células sobrenadantes de cultivo/orina, etc. (verifique en la tabla no.2, qué tipo de muestra puede procesar, dependiendo de la capacidad de detección de la prueba de ELISA que utilizará.)**
A) Prepare las muestras evite congelas y descongelas las muestras y equilibre la temperatura de las mismas (18-25°C) con la dilución que eligió, en una Placa de pozos profundos de Pre-dilución: 1:1 ____ (Muestras integra 100ul., directos a la placa sensibilizada) **1:2** ____ (Muestras ____ 50ul. + ____ 50 ul. de diluyente de muestra) o 1:100 ____ (Muestra 10ul. + 90 ul de diluyente de muestra). **Se autorizó y trabajar con la dilución 1:2 (Dr. Miguel 23/02/23). Con excepción de la prueba **TGF β 1.**

NOTA IMPORTANTE: Utilice inmediatamente las muestras después de su dilución Sí ____ No ____ fue necesario. En general, las concentraciones altas pueden ser diluidas 1:100, concentraciones medias 1:10 y bajas concentraciones 1:2 o directo.

5. Añada _____ 100 ul del estándar, muestras y controles a cada pozo. Al POZO 1-H añada directamente _____ 100 ul de diluyente de muestra (valor-cero). Al menos dos replicados por cada muestra, estándar o control. Sólo se realizó individualmente Sí _____.

NOTA: el tiempo de dosificación para la adición de reactivos o muestras no debe exceder los 10 minutos.

6. Cubrir la placa con el plástico sellador _____ e incubar por _____ 120 minutos a temperatura ambiente (o bien 90 minutos a 37°C) Hora/Tem. INICIO Llenado de placa _____ / _____ Hora/Tem. FINAL _____ / _____

Durante esta primera incubación, con las muestras, PREPARE:

7. Prepare _____ 500 ml de Working Wash Buffer diluyendo _____ 20 ml de Wash Buffer (25X) con _____ 480 ml de agua destilada o desionizada. Si se formaran cristales, caliente a temperatura ambiente y mezcle gentilmente hasta disolver y coloque la solución a la botella del Lavador Sí _____ Letra de la botella _____.

A) Purgue la botella para sacar el agua y que salga de la misma, sólo la sol. Wash 1X Sí _____.

8. ANTICUERPO: Prepara también 20 min. antes de salir de la primera incubación con las muestras el reactivo (Anticuerpo Anti-Human citocina de interés biotilado a 100X) _____ (indicar cuál preparó) inmediatamente antes de su uso en 1:100.

● Prepare: _____ 9,800 ul totales, para la placa completa del anticuerpo añadiendo _____ 98ul de anticuerpo 100X en _____ o 9,702 ul. (placa completa, considerando las 96 reacciones + 2 reacciones extras.) de diluyente de anticuerpo. Mezcle gentilmente. Sí _____ y reserve hasta su uso. Sí _____ Se debe usar inmediatamente o máximo 2 hs después de su preparación Sí _____ Realizado.

Transcurrido el tiempo de esta 1ra. incubación:

9. Remover la cubierta plástica _____ y desechar el líquido _____. (NO Lavar). Sólo descartar el líquido sobre 1 toalla de papel y golpear SUAVEMENTE, para retirar cualquier líquido restante. (Blott-SUAVE).
10. Añadir _____ 100 ul de anticuerpo biotilado previamente preparado en el punto no.8, anti-IL10 o IL17 oTGFbeta1 o TNF o IFNGamma (encierre en un círculo cual utilizó) a cada pozo.
11. Cubrir la placa con el sellador Si _____ e incubar a temperatura ambiente por _____ 90 minutos (o 60 minutos a 37°C). Hora/Tem. INICIO Anticuerpo _____ / _____ Hora/Tem. FINAL _____ / _____

Durante esta 2da incubación, con el anticuerpo, INICIE la preparación del complejo de Avidina-Biotina-Peroxidasa 100X:

12. El complejo de Avidina-Biotina-Peroxidasa 100X. (sólo mida la cantidad de diluyente del Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa)
- Prepare _____ 9,800 ul., totales para la placa completa, añadiendo _____ 9,702 ul. de diluyente del complejo (considerando los 96 pozos de la placa completa +2 reacciones extras). Y RESERVE bien tapado y en un lugar seguro hasta completar la preparación, al final del paso no.14 del lavado. Sí _____.

Transcurrido el tiempo de esta 2da. incubación:

13. **Remover la cubierta plástica**_____ y realice el primer **lavado** bajo las condiciones que se describen a continuación y Vigile que el lavado se realice bien, mientras se lava puede iniciar la preparación del **complejo de Avidina-Biotina-Peroxidasa 100X**:

14. **Lavar la placa** _____ **3 veces** con _____ **300ul.**, de **wash buffer 1X** en cada pozo, para cada lavado.

a) **Retire el líquido de los pocillos**, luego invierta la placa sobre una toalla de papel y realice un **Blott-suave**. Ver para no.3. **“Se recomienda no permitir que los pocillos se sequen por completo en ningún momento”**.

b) **Agregue 300 ul.** de **Wash buffer 1X** a cada pozo e incube por 60 segundos. Entre cada lavado.

c) **Repita los incisos a y b, 2 veces.**

d) **Deseche el líquido** Sí _____. Sólo descartar el líquido sobre 1 toalla de papel y golpear **SUAVEMENTE**, para retirar cualquier líquido restante. (Blott-SUAVE). **“Se recomienda no permitir que los pocillos se sequen por completo en ningún momento”**.

Lavador Automático: Lavador de placas **PKL PPC 152 PKL POKLER ITALIA**, lo utilizó: Sí _____

No. de programa: _____.

15. **CONJUGADO:** concluir la preparación del **complejo de Avidina-Biotina-Peroxidasa 100X** en el último paso del lavado; de absorción de la placa.

• **Añadiendo** _____ **98 ul.**, del **complejo 100X** en los **9,702 ul.**, del **diluyente del complejo**, previamente medidos y reservados para este momento. Sí _____ **Mezcle gentilmente y utilice inmediatamente** Sí _____.

16. **Añadir** _____ **100 ul** del **complejo preparado 1X Avidina-Biotina-Peroxidasa** a cada pozo.

17. **Cubrir con el sellador** Sí _____ e **incubar** _____ **40 min** a temperatura ambiente (o **30 minutos a 37°C**). **Hora/Tem. INICIO CONJUGADO- Complejo** _____ / _____
Hora/Tem. FINAL _____ / _____.

Transcurrido el tiempo de incubación con el CONJUGADO:

18. **Lavar la plaza** _____ **5 veces** con _____ **300ul.**, de **wash buffer 1X** en cada pozo, para cada lavado.

• Repita el proceso del paso no. 8 de LAVADO, hasta completar los 5 lavados, únicamente para esta fase del proceso.

Lavador Automático: lavador de placas **PKL PPC 152 PKL POKLER ITALIA**, lo utilizó: Sí _____

No. de programa _____.

Terminado el último lavado agregar el SUSTRATO-Color Developing:

19. **Añadir** _____ **90 ul** de **reactivo Color Developing** (Listo para usar) a cada pozo.

20. **Cubrir con el sellador** Sí _____ e **incubar** en la oscuridad por _____ **♣20 minutos** a **37°C** (de 15-25 minutos). **♣ Autorizo el Dr. Miguel 23/02/23 2:57 P.M.**

Hora/Tem. INICIO SUSTRATO _____ / _____ **Hora/Tem.**

FINAL _____ / _____

Terminado el tiempo de incubación con el SUSTRATO-Color Developing:

21. **Añadir** _____ **100 ul** de **solución Stop** (lista para usar) a cada pozo. **El color deberá cambiar inmediatamente a amarillo** Sí _____.

Anote Hora/Tem. _____ / _____ **de agregado de sol. STOP.**

22. Durante los primeros 30 min de haber detenido la reacción, se lee la placa a _____ 450 nm.
 Hora/Tem. LECTURA _____ / _____ Lector que utilizó: Thermo SCIENTIFIC Multiskan FC. Sí ___ y Software 6.1.1. Thermo.
 Una vez leído copie y pegue los resultados a la Base en Excel y anote el nombre del archivo: _____

Análisis de los datos

Para analizar usando métodos manuales, siga el proceso a continuación:

- Reste al promedio el valor de D.O. del STD 8 (estándar) a cada D. O de cada muestra Si _____ Valor STD8 _____
- Cree una curva estándar utilizando software de computadora para generar un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (4-PL).
- Alternativamente, represente gráficamente la absorbancia media de cada estándar frente a la concentración. La concentración medida en la muestra: *puede ser interpolado usando regresión lineal de cada D.O. relativa,* contra la curva estándar generada utilizando el software de ajuste de curvas. Esta voluntad genera un ajuste adecuado, pero menos preciso de los datos.
- Para muestras diluidas, *la lectura de concentración de la curva estándar debe multiplicarse por el factor de dilución.* Si _____ No aplica _____

Dilución de citocinas en plasma				
Th1		T reg		Th17
TNF	IFNg	IL10	TGFb	IL17
1:1	1:1	1:1	Reactivar y usar directo.	1:1
En PVV suele estar:				
3.9	2.18 (1.54-4.6)	1.55	Sin dato	1.52

NOTA: De acuerdo a la literatura, las lecturas menores a 2 pg/ml se tomarán como negativas; Se espera que durante la co-infección las lecturas sean mayores.

Para TGFbeta se tiene el dato de expresión por citometría de flujo, siendo 5.3% la expresión de este en células T CD3+CD4+CD25+

Bco = Blanco STD no. 8 (control negativo);

La numeración en la columna 1 indican el tubo de dilución para generar la curva estándar para la citocina que se cuantificará.

Tabla no. 2 Tipos de muestras con las que se puede determinar las diferentes citocinas							
ELISA	Suero	Plasma			Células sobrenadantes de cultivo	Orina	Células lisadas
		EDTA	Heparina	Citrato			
Human TNF	X	X	X	X	X		
Human TGFB1	X	X			X	X	
Human IL17A	X	X	X		X		X
Human IL10	X	X	X	X	X		
Human IFNG	X				X		

A partir de esta hoja usted imprima la que necesita para su proceso de preparación de STD, para el punto no.2. Gracias

ANEXOS

Dilución del estándar para IL-10

1. **Enumere los tubos** _____ 1-7. La concentración final: 1) 500 pg/ml , 2.) 250 pg/ml, 3)125 pg/ml, 4) 62.5 pg/ml, 5) 31.25 pg/ml, 6) 15.63 pg/ml, 7) 7.81 pg/ml, 8) Diluyente 0 pg/ml.
2. Para generar el estándar 1, **añada _____50 ul del stock reconstituido en _____950 ul del diluyente de muestra** (vol. Final 1000 ul). _____ Mezcle.
3. **Añada _____300 ul del diluyente de muestras** en los tubos 1-7.
4. Para generar el tubo 2, **añada _____300 ul del estándar 1 al tubo 2 para un volumen final de 600 ul.**
5. Para generar el tubo 3, **añada _____300 ul del tubo 2 al tubo 3 para un volumen final de 600 ul.**
6. **Continúe diluciones seriadas** hasta el tubo _____7.
7. El **STD no. 8 va directo al pozo 1-H de su placa _____ 100 ul. sólo diluyente de muestra** Sí____ (blanco o valor cero). Vea tabla "A"

Tabla no. A Generación de los 8 STD para curva de concentración para ELISA PicoKine™ ELISA para la cuantificación de IL10 Human en células sobrenadantes de cultivo y suero.								
No. tubo/STD	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8
Diluyente muestra µl	950 µl	300 µl	300 µl	300µl	300 µl	300µl	300 µl	100 µl directo en placa
TNF- STD µl	50 µ Sol. Madre- Reconstituido STD (10ng/ml)	300µl (STD1)	300 µl (STD2)	300 µl (STD3)	300 µl (STD4)	300 µl (STD5)	300 µl (STD6)	No aplica
Concentración	500.00 pg/ml	250.00 pg/ml.	125.00 pg/ml.	62.50 pg/ml.	31.25 pg/ml.	15.63 pg/ml.	7.81 pg/ml.	0.0 pg/ml.
Volumen final	1000 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	8
Mezclar bien entre cada deposito al tubo correspondiente iniciando en el tubo no.1 (STD1) y de allí cambiar punta y tomar la cantidad que se requiere para pasar al otro tubo no. 2 (STD 2), y así continuar hasta terminar con la generación de los 7 STD								

Dilución del estándar para IL-17A

1. **Enumere los tubos** _____ 1-7. La concentración final: 1) 2000 pg/ml , 2) 1000 pg/ml, 3) 500 pg/ml, 4.) 250 pg/ml, 5) 125 pg/ml, 6) 62.50 pg/ml, 7) 31.7 pg/ml, 8) Diluyente 0 pg/ml.
2. Para generar el estándar A, **añada 200 ul** del stock reconstituido de la solución stock 10 ng/ml_____ y en 800 ul del diluyente de muestra ____ (vol. Final 1000 ul). _____ Mezcle.
3. **Añada** _____ **300 ul** del diluyente de muestras en los tubos B-G.
4. Para generar el tubo 2, **añada** _____ **300 ul** del estándar 1 al tubo 2 para un **volumen final de 600 ul**.
5. Para generar el tubo 3, **añada** _____ **300 ul** del tubo 2 al tubo 3 para un **volumen final de 600 ul**.
6. **Continúe diluciones seriadas hasta el tubo** _____ 7.
7. El **STD no. 8 va directo al pozo 1-H** de su placa _____ **100 ul** sólo diluyente de muestra Sí _____ (blanco o valor cero). Vea tabla “B”

Tabla no. B Generación de los 8 STD para curva de concentración para ELISA PicoKine™ ELISA para la cuantificación de IL17A Human en células sobrenadantes de cultivo y suero.

No. tubo/STD	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8
Diluyente muestra μ l	800 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	100 μ l directo en placa
TNF- STD μ l	200 μ Sol. Madre- Reconstituido STD (10ng/ml)	300 μ l (STD1)	300 μ l (STD2)	300 μ l (STD3)	300 μ l (STD4)	300 μ l (STD5)	300 μ l (STD6)	No aplica
Concentración	2000.00 pg/ml	1000.00 pg/ml.	500.00 pg/ml.	250.00 pg/ml.	125.00 pg/ml.	62.50 pg/ml.	31.25 pg/ml.	0.0 pg/ml.
Volumen final	1000 μ l	600 μ l	600 μ l	600 μ l	600 μ l	600 μ l	600 μ l	
Mezclar bien entre cada deposito al tubo correspondiente iniciando en el tubo no.1 (STD1) y de allí cambiar punta y tomar la cantidad que se requiere para pasar al otro tubo no. 2 (STD 2), y así continuar hasta terminar con la generación de los 7 STD.								

Dilución del estándar para TGFbeta1

1. **Enumere los tubos** de STD Sí _____ 1-7. La concentración final: 1) 1000 pg/ml , 2) 500 pg/ml, 3) 250 pg/ml, 4) 125 pg/ml, 5) 62.5 pg/ml, 6) 31.25 pg/ml, 7) 15.63 pg/ml, 8) Diluyente 0 pg/ml.
2. Para generar el estándar A, **añada _____ 100 ul** del stock reconstituido (10ng/ml) en _____ **900 ul del diluyente de muestra** (vol. Final 1000 ul). _____ Mezcle bien.
3. **Añada _____ 300 ul** del diluyente de muestras en los tubos 2-7.
4. Para generar el tubo 2, **añada _____ 300 ul** del estándar 1 al tubo 2 para un **volumen final de 600 ul**.
5. Para generar el tubo 3, **añada _____ 300 ul** del tubo 2 al tubo 3 para un **volumen final de 600 ul**.
6. Continúe diluciones seriadas hasta el tubo no _____ 7.
7. El **STD no. 8 va directo al pozo 1-H de su placa _____ 100 ul sólo diluyente de muestra** Sí _____ (blanco o valor cero).

Preparación de soluciones para activar el TGFb1 en muestras problema:

- **Solución A: HCl 1N** (↗Concen Final): agregue _____ **8.33 ml de HCl 12N** en _____ **91.67 ml de H₂O**.
- **Solución B: NaOH 1.2 N/HEPES 0.5 M**↗: agregue _____ **12 ml de NaOH 10 N** y _____ **11,9 g de HEPES** en _____ **75 ml de H₂O**, agregue **c.b.p.** _____ **H₂O** para ajustar el volumen a _____ **100 ml**. Listo **ya preparado** Sí _____

****NOTA:** Para el análisis de **TGFb1** se deberá **activar la citocina** (en plasma sólo con EDTA) previa al ensayo.

Para **activar TGFb1**: **Añadir _____ 25 ul de solución A** en _____ **50 ul de plasma** y **10 minutos** después **añadir _____ 25 ul de solución B**. Ver tabla "C" Activar 50ul de muestra, para completar el volumen final de 100ul Autorizó Dr. Miguel (23/02/23 2:45 P.M.).

Tabla no. C Generación de los 8 STD para curva de concentración para ELISA PicoKine™ ELISA para la cuantificación de TGFb1 Human en células sobrenadantes de cultivo y suero.

No. tubo/STD	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8
Diluyente muestra µl	900 µl	300 µl	300 µl	300µl	300 µl	300µl	300 µl	100 µl directo en placa
TNF- STD µl	100 µ Sol. Madre-Reconstituido STD (10ng/ml)	300µl (STD1)	300 µl (STD2)	300 µl (STD3)	300 µl (STD4)	300 µl (STD5)	300 µl (STD6)	No aplica
Concentración	1000.00 pg/ml	500.00 pg/ml.	250.00 pg/ml.	125.00 pg/ml.	62.50 pg/ml.	31.25 pg/ml.	15.63 pg/ml.	0.0 pg/ml.
Volumen final	1000 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	
Mezclar bien entre cada deposito al tubo correspondiente iniciando en el tubo no.1 (STD1) y de allí cambiar punta y tomar la cantidad que se requiere para pasar al otro tubo no. 2 (STD 2), y así continuar hasta terminar con la generación de los 7 STD.								

Dilución del estándar para TNF

8. **Enumere los tubos Si** _____ del 1-8. La concentración final: 1.) 1000 pg/ml , 2) 500 pg/ml, 3) 250 pg/ml, 4) 125 pg/ml, 5) 62.5 pg/ml, 6) 31.25 pg/ml, 7)15.63 pg/ml, 8) Diluyente 0 pg/ml.
9. Para generar el estándar A, **añada** _____ **100 ul** del stock reconstituido (10ng/ml) en _____ **900 ul del diluyente de muestra** (vol. Final 1000 ul). _____ Mezcle bien.
10. **Añada** _____ **300 ul del diluyente de muestras** en los tubos 2-7.
11. Para generar el tubo 2, **añada** _____ **300 ul** del estándar 1 al tubo 2 para un **volumen final de 600 ul**.
12. Para generar el tubo 3, **añada** _____ **300 ul** del tubo 2 al tubo 3 para un **volumen final de 600 ul**.
13. Continúe diluciones seriadas hasta el tubo _____ 7.
14. El **STD no. 8 va directo al pozo 1-H** de su placa _____ **100ul. sólo diluyente de muestra** Sí _____ (blanco o valor cero). Ver tabla "D"

Tabla no. D Generación de los 8 STD para curva de concentración para ELISA PicoKine™ ELISA para la cuantificación de Human TNF en células sobrenadantes de cultivo y suero.								
No. tubo/STD	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8
Diluyente muestra μl	900 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	100 μ l directo en placa
TNF- STD μl	100 μ Sol. Madre-Reconstituido STD (10ng/ml)	300 μ l (STD1)	300 μ l (STD2)	300 μ l (STD3)	300 μ l (STD4)	300 μ l (STD5)	300 μ l (STD6)	No aplica
Concentración	1,000.00 pg/ml	500.00 pg/ml.	250.00 pg/ml.	125.00 pg/ml.	62.5 pg/ml.	31.25 pg/ml.	15.63 pg/ml.	0.0 pg/ml.
Volumen final	1000 μ l	600 μ l	600 μ l	600 μ l	600 μ l	600 μ l	600 μ l	
Mezclar bien entre cada deposito al tubo correspondiente iniciando en el tubo no.1 (STD1) y de allí cambiar punta y tomar la cantidad que se requiere para pasar al otro tubo no. 2 (STD 2), y así continuar hasta terminar con la generación de los 7 STD.								

Dilución del estándar para IFN gamma

1. **Enumere los tubos** _____ 1-7. La concentración final: 1.) 1000 pg/ml , 2) 500 pg/ml, 3)250 pg/ml, 4) 125 pg/ml, 5) 62.5 pg/ml, 6) 31.25 pg/ml, 7)15.63 pg/ml, 8) Diluyente 0 pg/ml.
2. Para **generar el estándar 1, añada** _____ **100 ul** del **stock reconstituido** (10ng/ml) en _____ 900 ul del diluyente de muestra (vol. Final 1000 ul). _____ **Mezcle.**
3. **Añada** _____ **300 ul** del diluyente de muestras en los tubos 1-7.
4. Para **generar el tubo 2, añada** _____ **300 ul** del estándar 1 al tubo 2 para un **volumen final de 600 ul.**
5. Para **generar el tubo 3, añada** _____ **300 ul** del tubo 2 al tubo 3 para un **volumen final de 600 ul.**
6. **Continúe diluciones seriadas** hasta el tubo _____ 7.
7. **El STD no. 8 va directo al pozo 1-H de su placa** _____ **100ul.** sólo **diluyente de muestra** Sí _____ (blanco o valor cero). Ver tabla "E"

Tabla no. E Generación de los 8 STD para curva de concentración para ELISA PicoKine™ ELISA para la cuantificación de IFNG Human en células sobrenadantes de cultivo y suero.

No. tubo/STD	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8
Diluyente muestra µl	900 µl	300 µl	300 µl	300µl	300 µl	300µl	300 µl	100 µl directo en placa
TNF- STD µl	100 µ Sol. Madre-Reconstituido STD (10ng/ml)	300µl (STD1)	300 µl (STD2)	300 µl (STD3)	300 µl (STD4)	300 µl (STD5)	300 µl (STD6)	No aplica
Concentración	1,000.00 pg/ml	500.00 pg/ml.	250.00 pg/ml.	125.00 pg/ml.	62.5 pg/ml.	31.25 pg/ml.	15.63 pg/ml.	0.0 pg/ml.
Volumne Final	1000 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl	
Mezclar bien entre cada deposito al tubo correspondiente iniciando en el tubo no.1 (STD1) y de allí cambiar punta y tomar la cantidad que se requiere para pasar al otro tubo no. 2 (STD 2), y así continuar hasta terminar con la generación de los 7 STD.								

Preparación de soluciones para activar el TGFB1 en muestras SUERO y PLASMA (sólo con EDTA) problema:

Parar la solución "A" preparar 150 ml., de HCl 1N para que nos alcance para todas las muestras y sobre un poco.

Parar la solución "B" preparar 20 ml., de NaOH 10N y tener listo el HEPES para pesar y los 11.9gr. en 12 ml. de NaOH 10N, para que nos alcance para todas las muestras y sobre un poco.

- Solución A: HCl 1N (\uparrow Concen Final): agregue _____ 8.33 ml de HCl 12N en _____ 91.67 ml de H₂O.
- Solución B: NaOH 1.2 N/HEPES 0.5 M (\uparrow Concen Final): agregue _____ 12 ml de NaOH 10N y _____ 11,9 g de HEPES en _____ 75 ml de H₂O, agregue c.b.p. _____ H₂O para ajustar el volumen a _____ 100 ml. Listo ya preparado Sí _____

Review > [Biomolecules](#). 2022 Oct 13;12(10):1472. doi: 10.3390/biom12101472.

IL-10 and IL-17 as Progression Markers of Syphilis in People Living with HIV: A Systematic Review

Adriana Hernández-Pliego ¹, Dayana Nicté Vergara-Ortega ¹, Antonia Herrera-Ortíz ¹, Cairo Toledano-Jaimes ², Fernando R Esquivel-Guadarrama ³, Miguel Ángel Sánchez-Alemán ¹

Affiliations + expand

PMID: 36291681 PMCID: [PMC9599307](#) DOI: [10.3390/biom12101472](#)

[Free PMC article](#)

Abstract

Much is known about the natural history of syphilis; however, less is known about the immune response against it, and even less is known about people living with HIV (PLWH). Due to the lack of an animal model to study host-pathogen interactions, it remains unclear how the host eliminates the bacteria. Here, we attempt to elucidate the immune response against infection by summarizing all the reported data in a systematic review. We found that only seven papers included PLWH, and they did not accurately describe the immune response against *Treponema pallidum* since only lymphopenia was reported upon coinfection. On the other hand, at least sixteen papers described the host-pathogen interaction in individual cell populations. Using this information, we established the kinetics of the immune response against syphilis and hypothesized how CD4⁺ T cells, such as Th17 and T rex cells, worsen the progression of the disease in PLWH through their hallmark cytokines, IL-10 and IL-17, and how these two cytokines may play important roles as biomarkers.

Keywords: HIV; Syphilis; co-infection; immune response; people living with HIV (PLWH).

10.4 Detección y cuantificación relativa de factores de transcripción de células T CD4⁺

Lo siguiente a realizar, fue la estandarización de técnicas moleculares para la caracterización de linfocitos T CD4⁺. Debido a esto, se propuso la siguiente metodología para la extracción de RNA total en sangre periférica y su posterior amplificación por RT-qPCR.

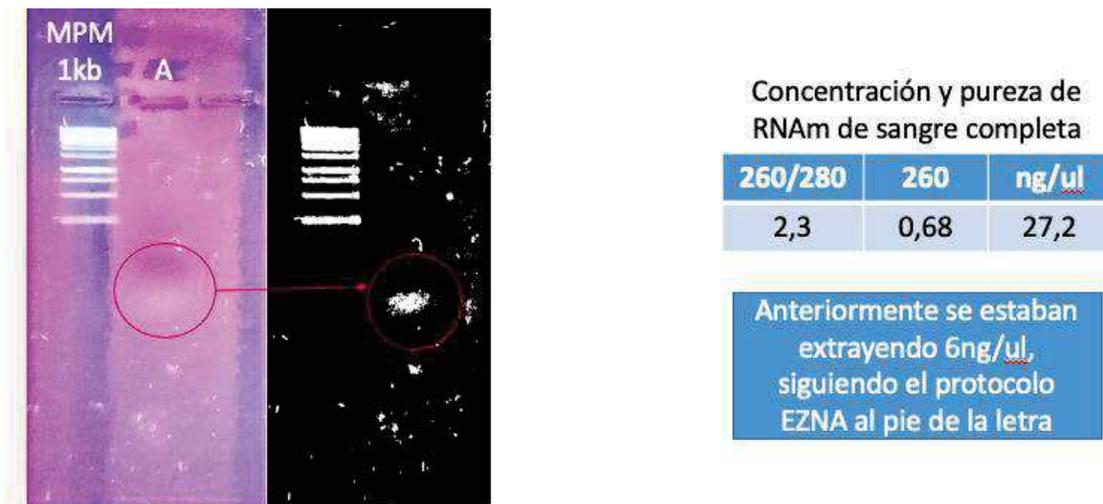
10.4.1 Estandarización de extracción de RNA total por columna

Se estandarizó el protocolo EZNA de Omega Biotek para extracción de RNA total por columna. Se realizaron algunas variaciones como: el centrifugado y la temperatura de elución. El protocolo quedó de la siguiente manera:

- a) Tomar 200 ul de sangre completa y añadir 1 ml de buffer ERL. Se mezcla bien y se incuba a 4°C durante 15 min.
- b) Centrifugar a 400 xg a 4°C por 10 minutos para formar un pellet
- c) de leucocitos. Retirar el sobrenadante.
- d) Añadir 2 volúmenes de Buffer ERL por volumen de sangre utilizada en el paso 1 (a 200 ul de muestra, 400ul de buffer).
- e) Mezclar y disgregar el pellet.
- f) Centrifugar a 400 xg a 4°C por 10 min. Retirar el sobrenadante.
- g) Agregar Buffer de lisis NTL (previamente preparado al 2% con 2-mercaptoetanol para la inactivación de RNAsas), (2:1) muestra. Ej. 200 ul de muestra agregar 400 ul de buffer NTL. Se disgregó el pellet.
- h) Insertar una columna homogeneizadora a un tubo de colecta de 2mL.
- i) Transferir el lisado celular a la columna.
- j) Centrifugar a 1500 xG por 2 minutos.
- k) Remover la columna y guardar el filtrado (líquido).
- l) Añadir el mismo volumen de etanol 70%, es decir, para 200 ul de muestra, 200 ul de etOH 70%. Mezclar por pipeteo.
- m) Insertar una columna HiBind RNA Mini a otro tubo de colecta de 2mL.
- n) Transferir el volumen total a la columna.
- o) Centrifugar a 3000 xG por 30 segundos.
- p) Deshechar el filtrado. Reutilizar el tubo de colecta.
- q) Repetir el lavado de etOH 70%.
- r) Añadir 500 ul de Buffer de lavado I RWF a la columna.
- s) Centrifugar a 4500 xG por 30 segundos.
- t) Desechar el filtrado y el tubo de colecta.
- u) Transferir la columna HiBind Mini a otro tubo de colecta.
- v) Añadir 700 ul de Buffer de lavado II RNA.
- w) Centrifugar a 6000 xg por 30 segundos.
- x) Retirar el filtrado y se reutilizar el tubo.
- y) Repetir el lavado con buffer RNA II.
- z) Centrifugar a 6000 xg por 2 minutos hasta secar completamente la columna.
- aa) Transferir la columna a un tubo limpio de 1.5 ml.

- bb) Añadir 50 ul de agua libre de nucleasas.
- cc) Incubar por 10 minutos a 70°C.
- dd) Centrifugar a 10 000xg por 2 minutos.
- ee) El RNAm total se cuantifica por Nanodrop y se realizan dos alícuotas. Una de ellas va directamente a la síntesis de cDNA y la otra se resguarda como “back up” a -70°C.

Una vez estandarizada la extracción, se observó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 2% a 75volts en *low* durante 20 min. Usualmente las técnicas por columna suelen fragmentar al RNA por lo que no se logró observar las bandas ribosomales 28s (5 kb) ni 18s (1.9 kb). Sin embargo, se observa material fragmentado (Ver. Imagen X) en el segundo carril.



A.) Corresponde al RNAm purificado por columna a partir de 200 ul de sangre completa.

10.4.2 Estandarización de síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se realizó mediante el estuche comercial *Maxima h minus first strand cDNA synthesis* de ThermoFischer (Thermo Scientific™ catalog K1652). Todos los reactivos fueron previamente alicuotados para evitar riesgo de contaminación. Se realizaron pruebas con oligoDT y hexámeros, siendo estos segundos la mejor opción dado que el RNA extraído está fragmentado, por lo que ya no conserva la cola PolyA necesaria para la adhesión de oligoDT.

Se preparó la mezcla de reactivos de la siguiente manera:

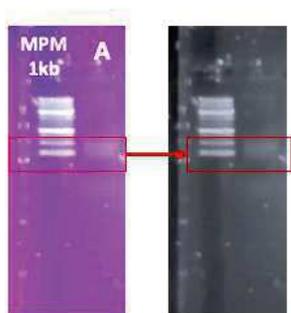
- Hexámeros → 1 ul
- dNTP Mix 10 mM → 1ul (0.5mM)
- H2O libre de nucleasas → 3 ul
- Muestra → 10 ul (0.272 ug/ml)

Para un volumen final de 15 ul para la primer reacción que consta de incubar durante 5 minutos a 65°C para el alineamiento de los hexámeros y dNTP's y posteriormente 5 minutos a 4°C para parar la primer reacción. Seguido de esto, se añaden la segunda mezcla de reactivos:

- Buffer RT 5X → 4ul
- Maxima H Minus Enzume Mix → 1 ul

Para un volumen final de 20 ul por reacción. Esto se llevo a la siguientes condiciones:

- Durante 10 minutos a 25°C.
- Durante 30 minutos a 50°C.
- Durante 5 minutos a 85°C.



Donde :

A.) Es el tubo con hexámeros (inespecíficos).

10.4.2.1 Estandarización de qPCR

Antes de comenzar la estandarización, se realizaron diversos ensayos *in silico*, con el objetivo de verificar y/o determinar la información a obtener como: tamaño de amplicón, curva de disociación esperada, especificidad de los oligos, asegurar que solo se alinean con cDNA, análisis de exones e intrones.

10.4.2.1.1. Diseño de oligos

Posterior al análisis de información en la revisión sistemática de literatura, se detectó que ningún estudio analiza de manera profunda la linfopenia causada por la co-infección. Por lo que se propone realizar estudios moleculares que permitan correlacionar la respuesta inmune de subpoblaciones de células T CD4⁺ de manera específica en cada estadio de sífilis en HSH. De manera que, para cada subpoblación se conoce que expresan factores de transcripción canónicos, es decir, característicos para cada tipo de respuesta. Es por esto que se revisaron artículos científicos publicados donde se haya caracterizado la respuesta de células T CD4⁺ mediante RT-qPCR y se encontró que Phetsouphanh et al. 2013, lograron describir y caracterizar diferentes poblaciones de linfocitos T a través de la expresión de sus diferentes factores de transcripción mediante esta técnica. Este

método es una herramienta que se puede utilizar para estudiar la heterogeneidad de las células T CD4⁺ en poblaciones de células extremadamente pequeñas y donde el número es limitado. Debido a que este grupo utilizó un RT-qPCR múltiple, se utilizarán los oligos reportados (Ver Tabla 10).

Tabla 10. Oligos de factores de transcripción canónicos de células T CD4⁺

Célula	Primer	Secuencia	Longitud	Tm
T_H1	Tbx21	F= CAC CTG TTG TGG TCC AAG TTT	84	55.7°C
		R= TGA CAG GAA TGG GAA CAT CC		54.6°C
	STAT1	F= GAG CTT CAC TCC CTT AGT TTT TGA	84	57.4°C
		R= CAC AAC GGG CAG AGA GGT		57.5°C
T_{reg}	Foxp3	F= GAC CAA GGC TTC ATC TGT GG	125	52.8°C
		R= CAG CAA ACA GGC TGT CAG G		53.4°C
T_H17	RORC	F= CAG AGC GTC TGC AAG TCC	129	56°C
		R= CCA CAT CTC CCA CAT GGA C		55.4°C
Ctrl	GAPDH*	F= CAG GGC TGC TTT TAA CTC TGG TAA	101	60°C
		R= GGG TGG AAT CAT ATT GGA ACA TGT		52.5 °C

Fuente. Elaboración propia. Modificado a partir de (Phetsouphanh et al. 2013)

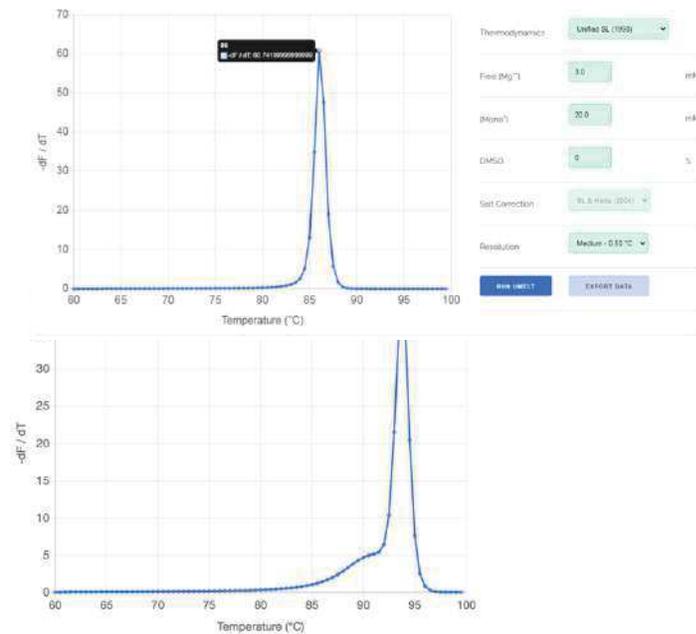
**Donación del Dr. Oscar Peralta, INSP.*

Antes de ser sintetizados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se utilizó el programa online gratuito <https://www.dna-utah.org/umelt/probes/app.php> para determinar la curva de disociación del amplicon esperado.

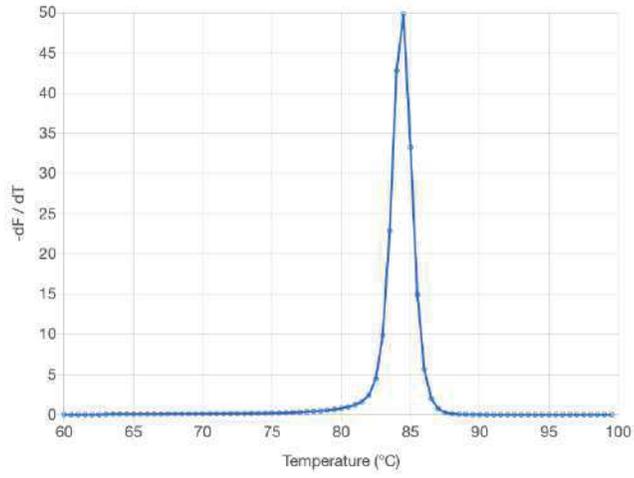
Los resultados fueron los que se muestran a continuación:

Para el producto de:

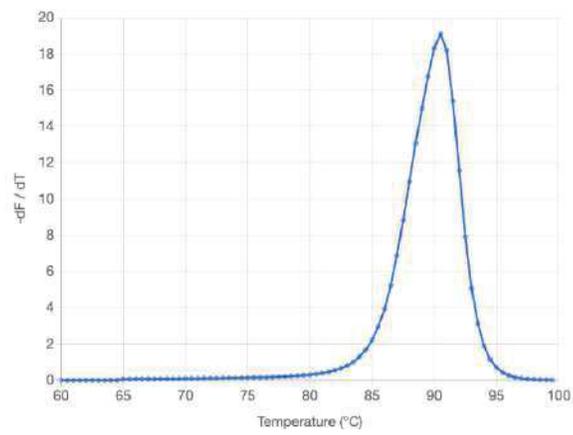
a. GAPDH (86°C)



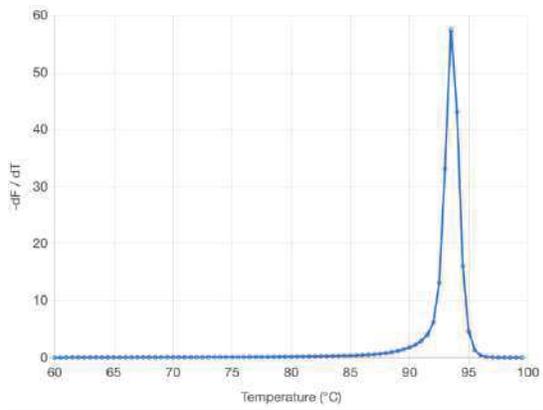
c. STAT-1 (84.5°C)



d. TBX21 (90.5 $^{\circ}\text{C}$)



e. RORc (93.5 $^{\circ}\text{C}$)



16.4.1.1. Reacción de cadena polimerasa

Una vez pasadas estas pruebas, para la estandarización de qPCR, se implemento PCR punto final, con el objetivo de amplificar cada factor de transcripción y lograr ver el producto en un gel de agarosa 2%. La mezcla para una reacción de 25 ul fue la siguiente:

- Sybr Green 2x → 12.5 ul
- Primer FW (10uM) → 1 ul (400 nM)
- Primer RV (10 uM) → 1ul (400 nM)
- cDNA → 2 ul
- H2O → 10.5 ul

Nota: Se utilizó agua como control negativo (NTC) y DNA bacteriano como segundo control negativo, con el fin de evaluar la especificidad de GAPDH.

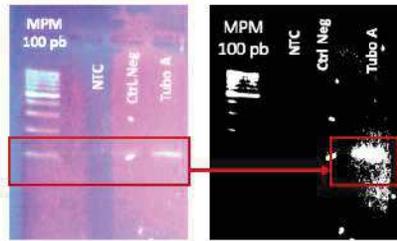
Las condiciones para la reacción fueron las siguientes:

- *Hot start* 95°C durante 10 min.
- 40 ciclos de:
 - Desnaturalización a 95°C durante 15 segundos.
 - Alineamiento a 56°C durante 1 minuto.
 - Elongación a 72°C durante 1 minuto.
- Se para la reacción a 4°C durante al menos 10 minutos para resguardar a -20°C.

- Nota: Se promedió la la temperatura de alineamiento de los 5 factores de transcripción y endógeno a analizar de acuerdo a las temperaturas reportadas por Phetshouphan y colaboradores en 2013.

Amplificación de GAPDH (101 pb)

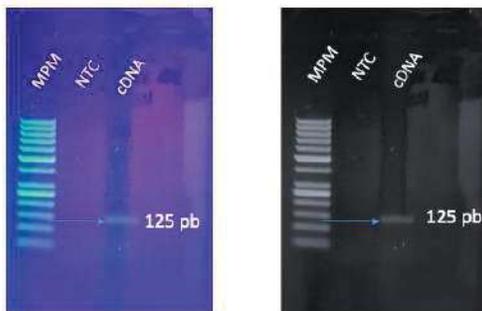
- Se corrieron las muestras en gel de agarosa 2% durante 25 min a 75v en low.



Donde:

- NTC corresponde a agua libre de nucleasas.
- Control Neg es DNA bacteriano (16s).
- Tubo A es el cDNA sintetizado a partir de hexámeros.
- MPM corresponde a marcador de peso molecular de 100 pb

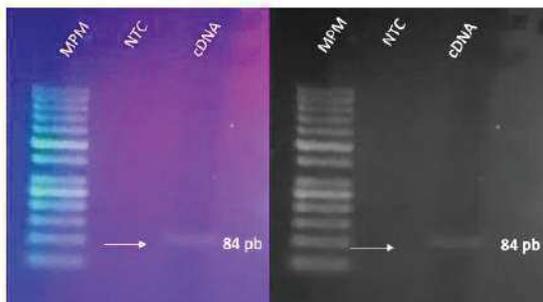
Amplificación de Foxp3 (125 pb)



Donde:

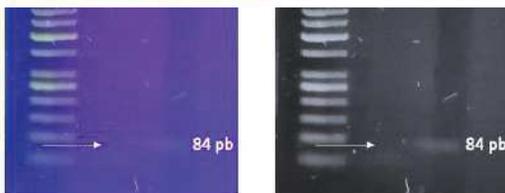
- Carril 1: MPM de 50 pb
- Carril 2: NTC corresponde a agua libre de nucleasas.
- Carril 3: Muestra cDNA corresponde a cDNA sintetizado a partir de la extracción y purificación de RNAm de sangre completa con el protocolo EZNA.

Amplificación de T-bet (84 pb)



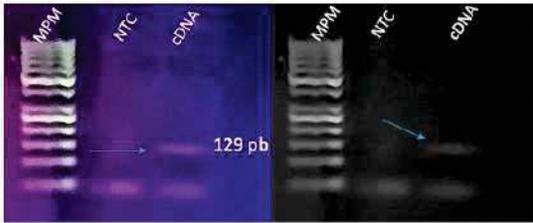
Donde:

- Carril 1: MPM de 50 pb
- Carril 2: NTC corresponde a agua libre de nucleasas.
- Carril 3: Muestra cDNA corresponde a cDNA sintetizado a partir de la extracción y purificación de RNAm de sangre completa con el protocolo EZNA.



- Carril 1: MPM de 50 pb
- Carril 2: NTC corresponde a agua libre de nucleasas.
- Carril 3: Muestra cDNA corresponde a cDNA sintetizado a partir de la extracción y purificación de RNAm de sangre completa con el protocolo EZNA.

Amplificación de RORc (129 pb)



Donde:

- Carril 1: MPM de 50 pb
- Carril 2: NTC corresponde a agua libre de nucleasas.
- Carril 3: Muestra cDNA corresponde a cDNA sintetizado con hexámeros a partir de la extracción y purificación de RNAm de sangre completa con el protocolo EZNA.

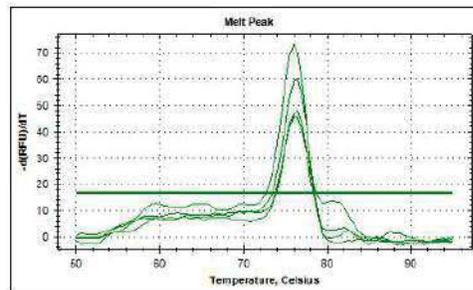
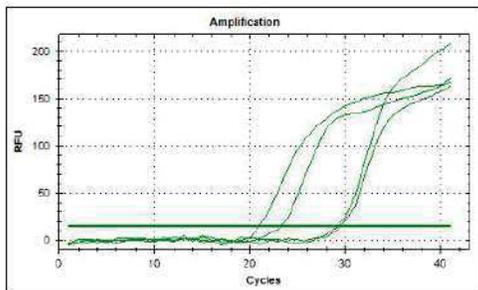
Nota: Se debe ajustar la cantidad de primers ya que se observan dímeros con peso molecular <50 pb.

10.4.2.2 Estandarización de Reacción de cadena polimerasa en tiempo real

Posterior al PCR punto final, se procedió a estandarizar en tiempo real (qPCR). Lo primero fue detectar la curva de disociación para cada producto. Como se mencionó anteriormente, se realizaron ensayos *in silico* para cada templado. Se obtuvo una curva de disociación para GAPDH de 80°C; para STAT1 de 82°C; para T-bet de 81.5°C; para Foxp3 de 90.5°C y para RORc de 88.5°C. Sin embargo, la teoría no se cumplió en la realidad. Todas las curvas de disociación esperadas variaron de 3 a 5°C con la realidad.

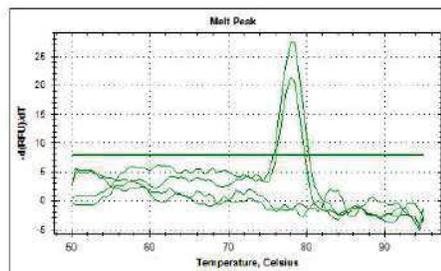
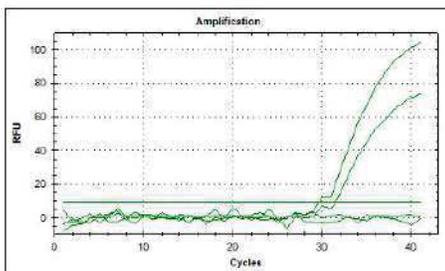
PCR para GAPDH (101 pb y Umelt de 80°C)

Real= 76°C



PCR T-bet (84 pb y Umelt teórica: 81.5°C)

Real: 78°C

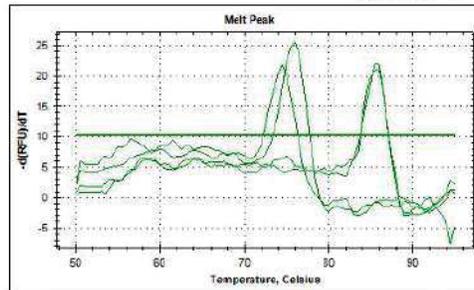
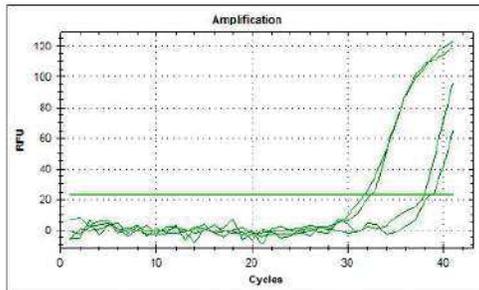


Well	Fluor	Content	Sample	Ct
A01	SYBR	NTC	N/A	
A02	SYBR	Pos Ctrl		29.60
B01	SYBR	NTC	N/A	
B02	SYBR	Pos Ctrl		31.44

Well	Fluor	Content	Sample	Melt Temp
A02	SYBR	Pos Ctrl		78.50
B02	SYBR	Pos Ctrl		78.00

PCR Foxp3 (125 pb y Umelt (teórica) 90°C)

Real: 86°C



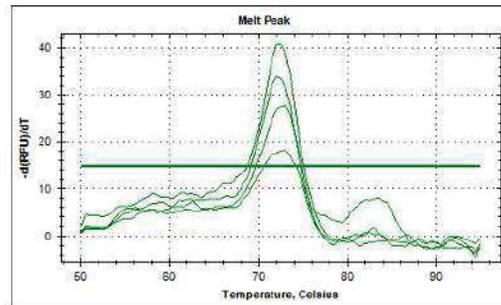
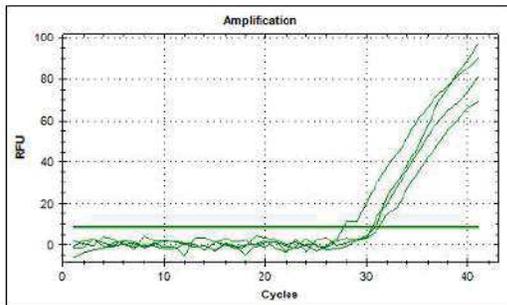
Well	Fluor	Content	Sample	Ct
A01	SYBR	NTC		38.17
B01	SYBR	NTC		39.11
C01	SYBR	Pos Ctrl		32.90
D01	SYBR	Pos Ctrl		32.14

Well	Fluor	Content	Sample	Melt Temp
A01	SYBR	NTC		76.00
B01	SYBR	NTC		74.50
C01	SYBR	Pos Ctrl		86.00
D01	SYBR	Pos Ctrl		95.00

- NTC corresponde a agua libre de nucleasas.
- Pos Ctrl corresponde muestra de cDNA sintetizado a partir de la extracción y purificación de RNAm de sangre completa con el protocolo EZNA y Kit Maxima H RT.

PCR RORc (129 pb y Umelt teórica: 88.5°C)

Real= 83°C

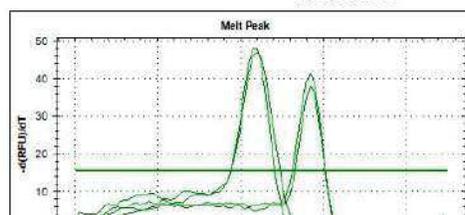
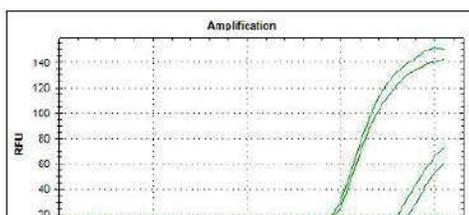


Well	Fluor	Content	Sample	Ct
E01	SYBR	NTC		31.27
E02	SYBR	Pos Ctrl		27.73
F01	SYBR	NTC		30.93
F02	SYBR	Pos Ctrl		30.54

Well	Fluor	Content	Sample	Melt Temp
E01	SYBR	NTC		72.00
E02	SYBR	Pos Ctrl		73.00
F01	SYBR	NTC		72.50
F02	SYBR	Pos Ctrl		73.00

PCR STAT1 (84 pb y Umelt (teórica) 82°C)

Real: 78°C



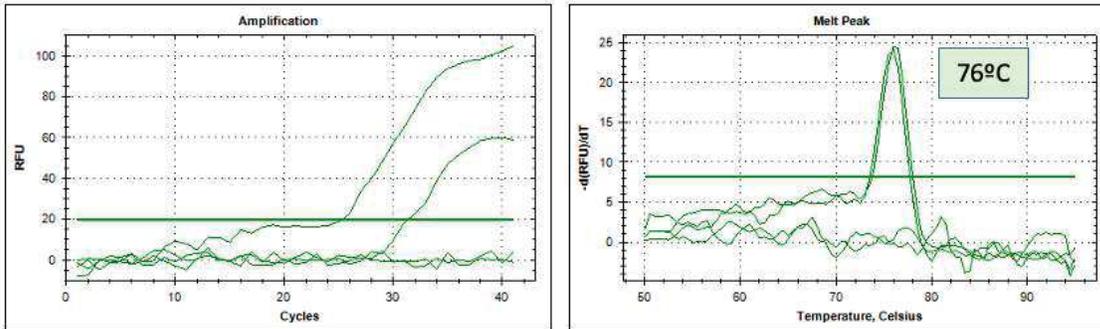
En cuatro productos (GAPDH, Foxp3, RORc y STAT1) se presentó el problema de dimerización de oligos en los pozos de NTC (control negativo cargado con agua), por lo que el siguiente paso fue eliminar el exceso de primers en la mezcla. Se realizó una curva de dilución para estos cuatro factores que iba de 1:1 a 1:1000; siendo 1:1 400 nM como concentración final tanto del oligo Forward como Reverse. En la fila A se colocaron todos los blancos y en la B todos los templados para las diluciones del primer Forward (400nM; 40 nM; 4 nM y 0.4 nM y el Reverse en 400 nM en todos). En la Fila C, nuevamente todos los blancos (agua) pero con la dilución del primer Reverse (400nM; 40 nM; 4 nM y 0.4 nM y el Forward en 400 nM en todos).

Dilución seriada de primers

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	NTC 1	NTC 1	NTC 2	NTC 2	NTC 3	NTC 3	NTC 4	NTC 4
2	1:1	1:1	FW 1:10	FW 1:10	FW 1:100	FW 1:100	FW 1:1000	FW 1:1000
3	NTC 5	NTC 5	NTC 6	NTC 6	NTC 7	NTC 7		
4	RV 1:10	RV 1:10	RV 1:100	RV 1:100	RV 1:1000	RV 1:1000		

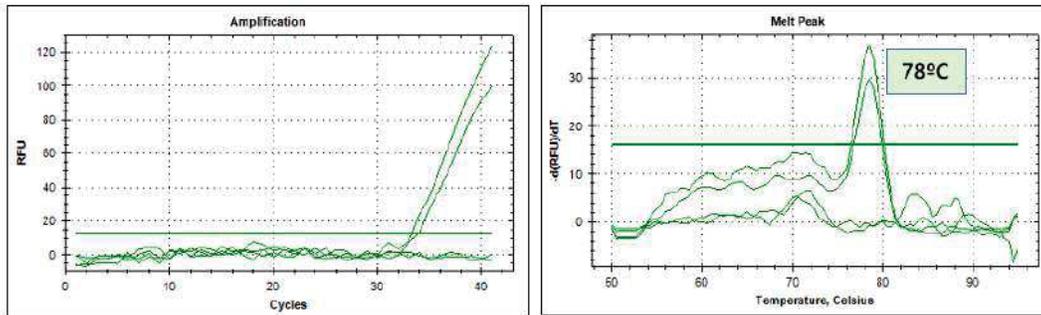
- 1:1 de ambos *primers*
- 1:10 Fw y 1:1 Rv
- 1:100 Fw y 1:1 Rv
- 1:1000 Fw y 1:1 Rv
- 1:1 Fw y 1:10 Rv
- 1:1 Fw y 1:100 Rv
- 1:1 Fw y 1:1000 Rv

Dilución seriada de *primers* para GAPDH



Para el caso de GAPDH, la dilución que funcionó para eliminar dimerización fue 1:1 Fw (400 nM) y 1:100 Rv (4nM).

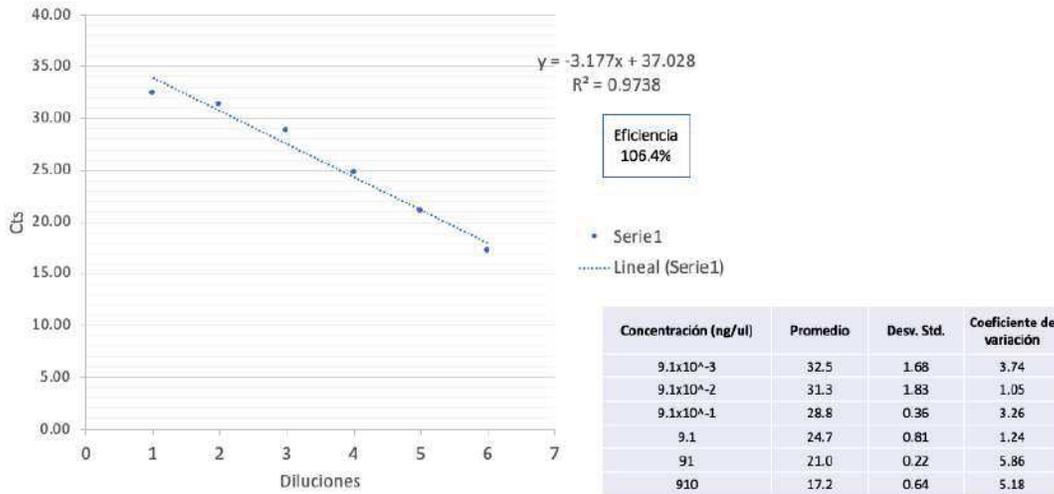
Dilución seriada de *primers* STAT1



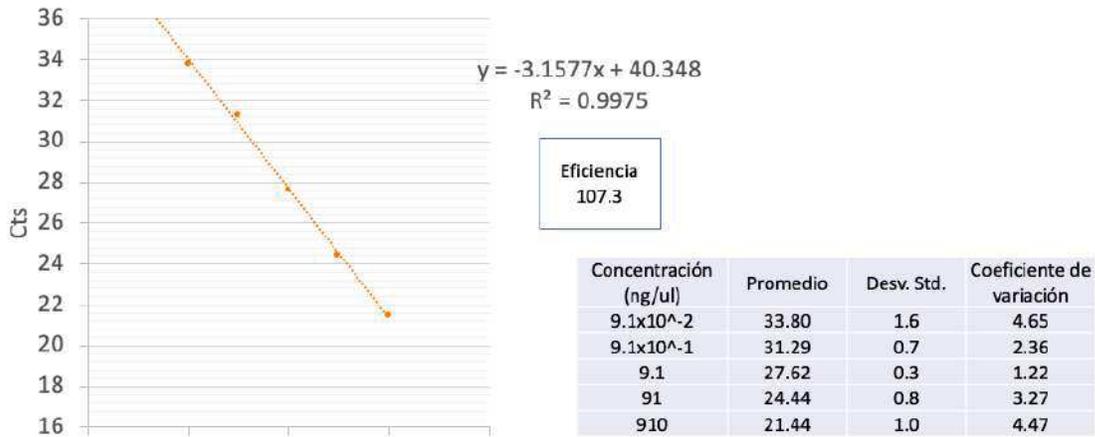
Para el caso de STAT1, la dilución que eliminó la dimerización fue 1:100 Fw (4nM) y 1:1 Rv (400nM).

El siguiente paso a estandarizar es detectar el límite de detección y eficiencia de la reacción por amplicon con una curva estándar. Con una muestra de cDNA con concentración conocida (910 ng/ul) se realizaron las siguientes curvas estándar:

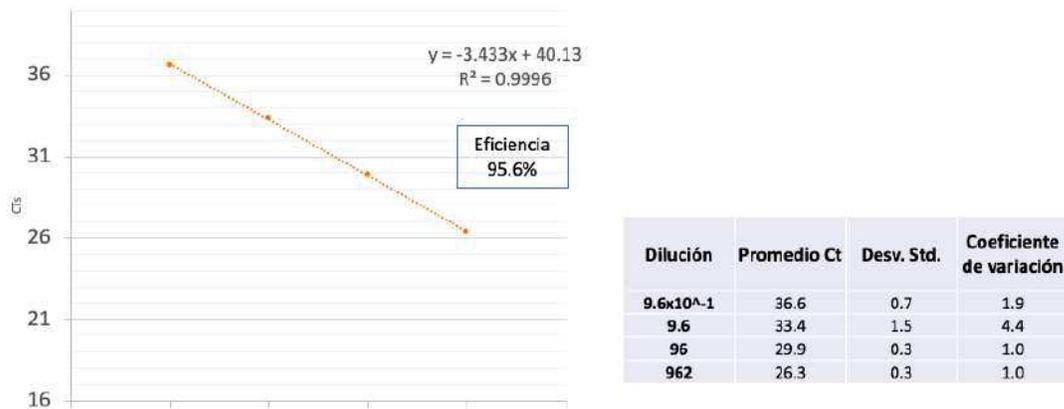
Curva estándar GAPDH



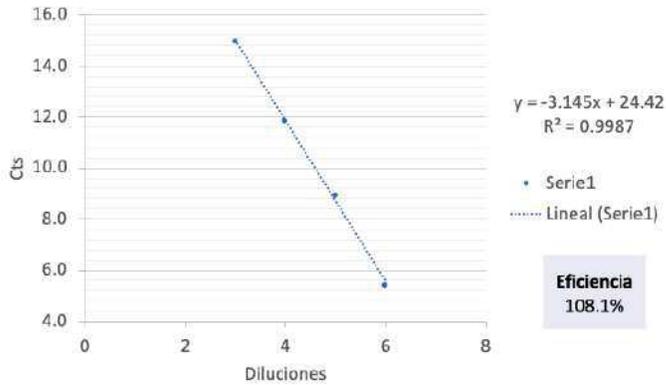
Curva estándar STAT-1



Curva estándar T-BET

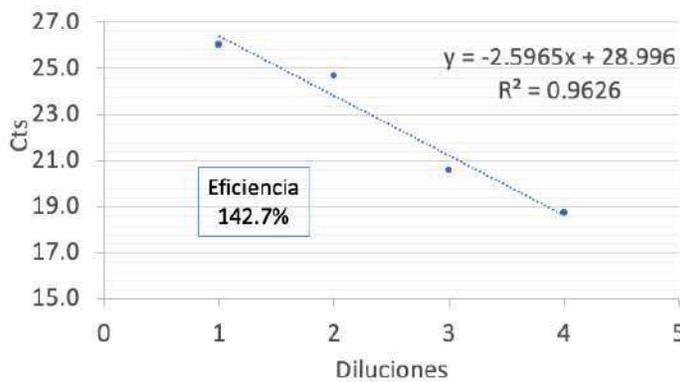


Curva estándar Foxp3



Dilución	Promedio de Ct	Desv. Std.	Coficiente de variación
DIRECTO	1.9	0.42	22.0
10	5.4	0.18	3.4
10 ⁻²	8.9	0.13	1.4
10 ⁻³	11.8	0.77	6.5
10 ⁻⁴	14.9	0.04	0.3

Curva estándar RORc



Dilución	Promedio Ct	Desv Std.	Coficiente de variación
10 ⁻³	18.7	0.1	0.8
10 ⁻⁴	20.6	0.3	1.7
10 ⁻⁵	24.7	0.5	2.2
10 ⁻⁶	26.0	0.8	3.2

Requiere calcular factor de corrección

El límite de detección nos permitió conocer hasta qué punto la reacción está siendo eficiente, sin importar que tan concentrado o diluida esté la muestra. Lo óptimo es obtener al menos 5 puntos por producto, sin embargo, al ser productos que no siempre están expresándose de manera constitutiva como lo es GAPDH, se pudo obtener la curva estándar con al menos 4 puntos para Foxp3, T-bet y muy probablemente para RORc. En las 4 curvas estándar mostradas, la eficiencia es óptima (100±10%). La estandarización de RORc (T_H17) requiere de un factor de corrección de 30%, ya que hasta el momento la eficiencia de la reacción ha sido de 142%.

ANEXO

Folio	ESTADIO	GAPORH CT	STATI CT	Delta CT	2ª. deltaCT	Normalización	Resultado	TBR21 CT	Delta CT	2ª. deltaCT	Normalización	Resultado	FOPI3 CT	Delta CT	2ª. deltaCT	Normalización	Resultado	RORc CT	Delta CT	2ª. deltaCT	Normalización	Resultado	
CF#0007	TRAYADA	20.03	33.83	13.8	0.00007	0.07	NEGATIVO	37.43	17.4	5.782E-06	0.005782	NEGATIVO	33.3	13.27	0.00010124	0.10135296	NEGATIVO	0	-20.03	3070608.81	1070608811	NEGATIVO	
CF#0010	CONTROL	38.25	24.04	5.79	0.01807	18.07	POSITIVO	28.5	10.25	0.0002119	0.01187906	NEGATIVO	25.8	7.55	0.00013629	5.136094753	POSITIVO	0	-18.25	3117431.0	31174310	NEGATIVO	
CF#0016	LATENTE	23.96	35.95	-13	0.00012	0.12	NEGATIVO	0	-27.95	8102861.22	8102861216	NEGATIVO	0	-22.96	8103861.22	8102861216	NEGATIVO	0	-22.96	8102861.22	8102861216	NEGATIVO	
CF#0018	ACTIVA	20.86	27.83	6.97	0.00798	7.98	POSITIVO	30.35	8.49	0.0138067	1.380674019	POSITIVO	0	-20.86	1903105.61	1903105612	NEGATIVO	0	-20.86	1903105.61	1903105612	NEGATIVO	
CF#0021	LATENTE	23.63	28.68	5.05	0.03019	30.19	POSITIVO	28.05	4.43	0.04639136	46.39136158	POSITIVO	0	-23.63	12981916.1	12981916085	NEGATIVO	0	-23.63	12981916.1	12981916085	NEGATIVO	
CF#0022	LATENTE	27.47	25.7	-1.77	3.41039567	3410.39567	NEGATIVO	34.25	6.78	0.00095948	9.095948144	POSITIVO	0	-27.47	385906246	1.85906411	POSITIVO	0	-27.47	385906246	1.85906411	POSITIVO	
CF#0026	LATENTE	20.4	30.58	10.18	0.00086	0.86	NEGATIVO	38.11	17.71	4.664E-06	0.004664003	NEGATIVO	30.2	9.8	0.00112178	1.12175737	POSITIVO	0	-20.4	1385604.33	1385604327	NEGATIVO	
CF#0029	CONTROL	37.96	27.91	9.93	0.00103	1.03	POSITIVO	31.7	13.72	7.410E-05	0.074108574	NEGATIVO	30	12.02	0.00024078	0.240779469	NEGATIVO	0	-17.96	258334.966	258334986.1	NEGATIVO	
CF#0033	CONTROL	38.55	29.5	10.95	0.00051	0.51	NEGATIVO	33.48	14.93	3.303E-05	0.033034811	NEGATIVO	28.9	10.35	0.0007862	0.786195408	NEGATIVO	0	-18.55	383801.281	383801280.7	NEGATIVO	
CF#0121	LATENTE	20.65	28.89	8.24	0.00331	3.31	POSITIVO	39.95	19.3	1.5493E-06	0.015493248	NEGATIVO	38.8	18.15	3.438E-06	0.003437988	NEGATIVO	0	-20.65	16433921.1	1643392110	NEGATIVO	
CF#0122	TRAYADA	23.22	31.95	8.73	0.00136	1.36	POSITIVO	36.22	13	0.00012707	0.127070313	NEGATIVO	0	-23.22	9770493.48	9770493481	NEGATIVO	0	-23.22	9770493.48	9770493481	NEGATIVO	
CF#0137	LATENTE	20.36	28.64	8.28	0.00322	3.22	POSITIVO	32.27	11.91	0.00015986	0.159856002	NEGATIVO	30.6	10.24	0.0008269	0.826899719	NEGATIVO	0	-20.36	13457695.9	1345769594	NEGATIVO	
CF#0156	ACTIVA	20.6	29.71	9.11	0.00181	1.81	POSITIVO	31.8	11.2	0.00042507	0.425073517	NEGATIVO	34.9	14.3	4.9576E-05	0.049575952	POSITIVO	21.7	1.1	0.4665165	466.5164958	POSITIVO	
CF#0164	CONTROL	19.29	31.21	11.92	0.00026	0.26	NEGATIVO	38.18	18.89	2.083E-06	0.020835865	NEGATIVO	27.2	7.91	0.0041577	4.15796025	POSITIVO	0	-19.29	641015625.9	641015625.9	NEGATIVO	
CF#0177	LATENTE	19.18	33.6	14.42	0.00005	0.05	NEGATIVO	33.44	-18.55	383801.281	383801280.7	NEGATIVO	32.5	7.45	0.00571908	5.71908475	POSITIVO	0	-19.18	593957426.5	593957426.5	NEGATIVO	
CF#0186	CONTROL	38.55	28.34	9.79	0.00113	1.13	POSITIVO	34.68	6.76	0.00927651	9.276505167	POSITIVO	26	7.45	251965416	2.51965416	POSITIVO	31	12.45	0.00017872	0.178721388	NEGATIVO	
CF#0196	LATENTE	27.92	35.49	7.57	0.00526	5.26	POSITIVO	32.33	9.45	0.00142977	1.429771187	POSITIVO	35.5	6.62	0.01016673	10.16673235	POSITIVO	0	-27.92	253865416	2.53865416	NEGATIVO	
CF#0212	ACTIVA	23.88	27.53	4.65	0.03983	39.83	POSITIVO	0	-23.32	10471753.6	10471753629	NEGATIVO	29	5.68	0.01960516	19.50516483	POSITIVO	0	-23.88	7719093.49	7719093486	NEGATIVO	
CF#0271	ACTIVA	23.32	25.73	2.41	0.18816	188.16	POSITIVO	32.47	7.3	0.00634572	6.345721847	POSITIVO	28.2	3.03	0.11242754	112.4275372	POSITIVO	0	-23.32	37750698.4	37750698421	NEGATIVO	
CF#0291	TRAYADA	25.17	24.12	-1.05	2.070529848	2070.529848	NEGATIVO	0	-18.22	305327.921	305327921.3	NEGATIVO	33.7	9.24	0.0016538	1.653799438	POSITIVO	0	-18.22	305327.921	305327921.3	NEGATIVO	
CF#0300	CONTROL	38.22	25.82	-12.46	23.07776270	2307.776270	NEGATIVO	0	-18.22	0.0004621	0.462006763	NEGATIVO	0	-20.31	1299927.74	1299927741	POSITIVO	0	-20.31	1299927.74	1299927741	NEGATIVO	
CF#0302	ACTIVA	24.46	24.43	-0.03	0.05751	57.51	POSITIVO	35.59	11.13	0.0004621	0.462006763	NEGATIVO	0	-20.31	1299927.74	1299927741	POSITIVO	0	-20.31	1299927.74	1299927741	NEGATIVO	
CF#0303	CONTROL	20.31	24.43	4.12	0.05913	59.13	POSITIVO	30.71	10.4	0.0007401	0.74009598	NEGATIVO	0	-20.84	1877003.62	1877003618	NEGATIVO	0	-20.84	1877003.62	1877003618	NEGATIVO	
CF#0360	CONTROL	20.84	24.97	4.08	0.05913	59.13	POSITIVO	0	-17.44	177812.842	177812842.4	NEGATIVO	24.7	3.86	0.06886907	68.886906974	POSITIVO	0	-20.84	3877003.62	3877003618	NEGATIVO	
CF#0362	TRAYADA	37.44	0	-37.44	177812.84241	177812.84241	NEGATIVO	0	-17.44	177812.842	177812842.4	NEGATIVO	0	-17.44	0.00652412	6.524124371	POSITIVO	0	-17.44	177812.842	177812842.4	NEGATIVO	
CF#0365	TRAYADA	20.91	0	-20.91	1.97032201256	1.97032201256	NEGATIVO	38.6	17.69	4.7291E-06	0.0472911	NEGATIVO	35.8	14.89	3.2935E-05	0.032935432	POSITIVO	16.2	-4.71	26.1728659	26172.86587	POSITIVO	
CF#0419	TRAYADA	25.05	0	-25.05	34,737,726,489.02	34,737,726,489.02	NEGATIVO	37.28	12.23	0.00000816	0.008162815	NEGATIVO	34.1	9.05	0.00188659	1.886594321	POSITIVO	0	-25.05	34,737,726,489	34,737,726,489	NEGATIVO	
CF#0434	ACTIVA	20.03	33.47	13.44	0.00009	0.09	NEGATIVO	39.52	19.49	1.3181E-06	0.013180815	NEGATIVO	26.5	6.47	0.0112807	11.2806844	POSITIVO	0	-20.03	1070608.81	1070608811	NEGATIVO	
CF#0484	TRAYADA	21.08	32.39	11.31	0.00039	0.39	POSITIVO	31.36	10.28	0.00080429	0.80488103	NEGATIVO	27.3	6.22	0.01341508	13.41508494	POSITIVO	0	-21.08	2167774.98	216777498	NEGATIVO	
CF#0488	ACTIVA	23.01	30.32	7.31	0.00630	6.30	POSITIVO	0	-23.01	8446953.38	8446953381	NEGATIVO	28.9	5.89	0.01686294	16.8629412	POSITIVO	0	-23.01	8446953.38	8446953381	NEGATIVO	
CF#0501	ACTIVA	20.1	31.84	11.74	0.00019	0.19	NEGATIVO	28.4	9.1	0.00158643	1.586150462	POSITIVO	26	5.9	0.01674646	16.7466035	POSITIVO	34	3.9	0.06898384	68.9883841	POSITIVO	
CF#0572	TRAYADA	19	25.7	6.7	0.00961	9.65	POSITIVO	0	-19	334288	334288000	NEGATIVO	0	-19	334288	334288000	NEGATIVO	20.3	1.5	0.33353319	333.5333906	POSITIVO	
MTC		0	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0		0
MTC		0	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0		0