

**PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES
TIPO 2 EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH**

KAROL PATRICIA TORRES YEPES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA-DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2019**

**PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES
TIPO 2 EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH**

KAROL PATRICIA TORRES YEPES

**Trabajo de grado para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

Director

HERMAN JOSE ARTEAGA

MD. Msc. Inmunología, PhD Hematología

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MEDICINA-DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS

MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS

BUCARAMANGA

2019

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa los más sinceros agradecimientos a:

A mi Padre Dios por darme su bendición, amor en todos los momentos de mi vida y la fortaleza cada día para continuar y cumplir con mis metas, además de enseñarme que la última palabra la tiene él. Este trabajo es para su eterna gloria.

Agradezco al hombre de mi vida, mi mentor, hermano y amigo Giovanni Camilo Torres Yepes quien, con su amor, apoyo económico y básicamente porque juntos dimos el paso de fe, me ayudo a concluir la parte experimental de mi maestría.

A mi padre Tobías Torres por sus palabras, sus oraciones y su apoyo incondicional y nunca dudo del cumplimiento de mi meta.

A mi preciosa muñeca mi madre Nohora Yepes quien es el amor y el motor de mi vida que siempre estuvo presente en todos los momentos buenos y no tan buenos incondicionalmente con su apoyo espiritual, con su oración sin nunca desfallecer.

A mis hermanas Norah y Laura Torres Yepes y a mi sobrinita Ana belén Rojas Torres que con sus palabras de cariño y su alegría me impulsaron a continuar.

A mi amiga, mi hada madrina Claudia Mejía, una bella mujer que es como mi hermana, quien siempre me dio ánimo, cariño y consejos para lograr esta meta.

A mi hado Padrino Wilfredo Valdivieso, quien fue determinante para el desarrollo de esta tesis gracias a sus enseñanzas en lo académico y en lo personal.

A Steven Fuentes Abreu mi hermano querido, mi compañero en todo el proceso y el desarrollo de este trabajo.

A Nathalia Bueno mi Lulú mi amiga consentida quien nunca dudo en ayudarme desinteresadamente en todo lo que ella pudiera y en darme todo su afecto en esos momentos que tanto necesite una palabra de aliento.

A el doctor Herman José Arteaga director de esta tesis, de quien recibí apoyo y me brindó sus valiosas recomendaciones todo el tiempo.

A la doctora Ruth Aralí Martínez y el doctor Agustín Vega, evaluadores de este trabajo de investigación, quienes con sus valiosas observaciones contribuyeron enormemente en el trabajo.

A Alexander Ardila quien con sus acertadas palabras y ayuda oportuna dio su aporte en el desarrollo de esta tesis.

A Fredy Alonso Hernández Almeida quien con sus consejos siempre estuvo ahí para mí, con quien nos une un lazo de afecto muy fuerte.

A mi mejor amigo Milton Niño que es un ser maravilloso que siempre me mostró el lado bueno de todo. “Tranquilidad”

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en el proceso de realizar este trabajo de investigación, como mis amigos del laboratorio central de investigación de la facultad de salud, mis amigos del grupo GIEM, y mis amigos de mi grupo IMM Andrés y Miguel Ángel por su apoyo en el desarrollo de la tesis y a mi amiga personal Adriana Manosalva por sus consejos y apoyo.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas trabajadores profesores, secretarias, vigilantes y estudiantes de la UIS que participaron como controles en este estudio y muy especialmente a mis pacientes de la IPS Vidamedical y del HUS por su participación en este trabajo ya que el aporte que dieron definitivamente hizo la diferencia en el trabajo experimental y en el plano personal porque ellos son la razón de ser de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. IDENTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
2. JUSTIFICACION.....	21
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION	24
4. MARCO TEÓRICO	25
4.1 LOS CANNABINOIDES	25
4.2 SISTEMA DE ENDOCANNABINOIDES	26
4.3 RECEPTORES CANNABINOIDES.....	28
4.3.1 Receptor CB1	29
4.3.2 Receptor CB2	30
4.4 ANÁLOGOS DE CANNABINOIDES	33
4.5 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	35
4.5.1 Dinámica de la infección viral.....	37
4.5.2 Papel de la activación celular en la patogenia del VIH	39
4.5.3 Papel de Nf-κB en la infección por VIH.....	41
4.5.4 Tratamiento antirretroviral	42
5. OBJETIVOS.....	45
5.1 OBJETIVO GENERAL	45
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
6.1 TIPO DE ESTUDIO.....	46
6.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	46
6.3 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	46

7. METODOLOGÍA.....	47
7.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO, RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN Y TOMA DE MUESTRA.....	47
7.1.1 Casos.....	47
7.1.2 Controles.....	47
7.2 TAMIZAJE PARA DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE INFECCIÓN POR VIH.....	49
7.3 Pruebas de Laboratorio	49
7.3.1 Extracción de células mononucleares de sangre periférica	49
7.3.2 Extracción de RNA.....	49
7.3.3 síntesis de cDNA	50
7.3.4 Ensayos de PCR en tiempo real	50
7.4 METODOLOGIA PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS	51
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	53
8.1 PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH	53
8.2 PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRA DE CASO (VIH POSITIVO).....	57
8.3 PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRA DE CONTROLES (VIH NEGATIVOS).....	57
9. RESULTADOS	59
9.1 DESCRIPCION DE LA POBLACIÓN ESTUDIO	59
9.2 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE CB2 EN PACIENTES VIH-1 POSITIVOS Y EN INDIVIDUOS SANOS.....	61
9.3 CORRELACIÓN ENTRE LAS CONDICIONES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INFECTADOS POR VIH-1 Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CB2.....	69
10. DISCUSIÓN.....	71

11. CONCLUSIONES	76
12. RECOMENDACIONES.....	77
REFERENCIAS	78
BIBLIOGRAFÍA.....	87
ANEXOS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Número total de personas que viven con VIH a nivel global para 2017..	17
Figura 2. Estructura Química de los Endocannabinoides.	27
Figura 3. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2.	28
Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología usada en el estudio.	48
Figura 5. Correlación entre carga viral y linfocitos t cd4+ del grupo de pacientes analizados.....	61
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % de RNA obtenido a partir de cmsp de un paciente (caso) y un individuo control (control).	62
Figura 7. Electroforesis de los amplicones obtenidos de la reacción de PCR de cDNAs sintetizados a partir del RNA de algunos pacientes e individuos control. ...	62
Figura 8. Análisis de datos de PCR en tiempo real.....	63
Figura 9. Niveles de expresión de cb2 en los grupos de pacientes infectados por VIH-1 y en individuos sanos.	67
Figura 10. Niveles de expresión de CB2 en pacientes infectados por vih-1, en los distintos estadios de la infección.....	69
Figura 11. Correlación de los niveles de expresión de CB2 con el recuento de linfocitos t cd4 + y la carga viral.	70

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Caracterización de la población de pacientes infectados con VIH (casos) de acuerdo con la institución de donde se reclutaron los participantes.....	60
Tabla 2. Caracterización de la población de participantes sin VIH (controles).	60
Tabla 3. Estadio de la enfermedad de los pacientes según el centro de atención médica del cual proceden.....	60
Tabla 4. Concentraciones y pureza del ARN obtenido a partir de CMSP.	61
Tabla 5. Determinaciones de eficiencia (e) y ciclo umbral (ct) para las diferentes muestras.	64
Tabla 6. Niveles de expresión relativa rER del gen cb2 en pacientes infectados por VIH-1.....	65
Tabla 7. Niveles de expresión relativa rER del gen cb2 en los individuos del grupo control.	66
Tabla 8. Comorbilidades presentes en los pacientes con sobreexpresión de CB2.	68

INDICE DE ANEXOS

Pág.

Anexo A. Aprobación por los comités de ética. Declaración de consentimiento informado para la participación en el estudio.....	99
Anexo B. Instrumento para recolección de datos de los sujetos (casos) VIH positivos que conforman parte del estudio.....	103
Anexo C. Instrumento para recolección de datos de los sujetos (controles) que conforman el estudio.....	105
Anexo D. Consentimiento informado para la realización prueba rápida diagnóstica de VIH.....	106
Anexo E. Formato de reporte de resultado de la prueba rápida para diagnóstico de VIH.....	107

GLOSARIO DE SIGLAS

CB1: Receptor de Cannabinoides CB1

CB2: Receptor de Cannabinoides CB2

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CRE: Elemento de respuesta cAMP

CTI: Complejo de transcripción inversa

FAAH: Amida hidrolasa de ácido graso

GED: Expresión diferencial de Genes

HUS: Hospital Universitario de Santander

IE: Inhibidores de la entrada viral

II: Inhibidores de la integrasa

IP: Inhibidores de la proteasa

MAGL: Lipasa de monoacilglicerol

NAPE: N-arachidonoil fosfatidil etanolamina

NF- κ B: Factor nuclear kappa-cadena-potenciador de las células B activadas

NNRTI: Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos / nucleótidos

NRTI: Inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleósidos / nucleótidos

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Humana

TARGA: Terapia Antirretroviral de gran actividad

THC: Tetrahidrocanabinol

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

TÍTULO: Perfiles de Expresión de los receptores de Cannabinoides tipo 2 en pacientes infectados con VIH.*

AUTORA: KAROL PATRICIA TORRES YEPES**

PALABRAS CLAVE: VIH, Cannabinoides, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, Receptor Cannabinoide CB2.

DESCRIPCIÓN

Introducción: Los receptores de cannabinoides tipo 2 (CB2) se encuentran en células del sistema inmune y se sobreexpresan en células crónicamente activadas. Los endocannabinoides modulan la actividad de las células inmunitarias a través de CB2, sin causar inmunosupresión. El factor de transcripción NF- κ B induce la transcripción de genes de proteínas proinflamatorias celulares y del genoma del *Virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH). *In vitro*, análogos de cannabinoides inhiben la replicación del VIH bloqueando la activación de NF- κ B. Blancos terapéuticos celulares inhibidores de la replicación de VIH tienen menor posibilidad de generar resistencia.

Objetivo: Establecer los perfiles de expresión de los receptores de cannabinoides CB2 en pacientes infectados con VIH-1 y en individuos sanos y correlacionarlos con los distintos estadios clínicos en los individuos infectados.

Metodología: 38 pacientes VIH-1 positivos fueron reclutados de dos centros de atención de la ciudad de Bucaramanga, situada al nororiente de Colombia. Igual número de individuos no infectados, pareados por edad y sexo se seleccionaron como controles. Los niveles de expresión de CB2 se determinaron por qPCR utilizando ARN de células mononucleares de sangre periférica.

Resultados: Se observó una mayor expresión de CB2 en personas infectadas con VIH-1 con respecto al grupo control. Seis pacientes presentaron una sobre expresión marcada de CB2; tres de ellos se encontraban en estadio C3 de la infección y presentaban comorbilidades tipo SIDA. No se encontró correlación entre los niveles de expresión de CB2 y los estadios de la enfermedad.

Conclusiones: Los receptores CB2 están sobreexpresados en personas infectadas con VIH. Esta observación permite proponer la posibilidad de utilizar fármacos agonistas de CB2, los cuales podrían actuar como coadyuvantes de la terapia antirretroviral convencional.

* Trabajo de grado

** Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Herman José Arteaga Narvaez.

ABSTRACT

TITLE: Expression profiles of Cannabinoid type 2 receptors in patients infected with HIV*

AUTHOR: KAROL PATRICIA TORRES YEPES**

KEYWORDS: HIV, Cannabinoids, Acquired Immunodeficiency Syndrome, CB2 Receptor.

DESCRIPTION

Introduction: Type 2 cannabinoid receptors (CB2) are found on immune system cells and are overexpressed in chronically activated cells. Endocannabinoids modulate the immune cells through CB2, without causing immunosuppression. The transcription factor NF- κ B induces the transcription of genes encoding cellular proinflammatory proteins and the genome of the *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). *In vitro*, cannabinoid analogues inhibit HIV replication by hampering NF- κ B activation. Cell therapeutic targets that inhibit HIV replication are less likely to generate resistance.

Objective: To establish the expression profiles of the CB2 cannabinoid receptors in patients infected with HIV-1 and in healthy individuals and correlate them with the different clinical stages in the infected individuals.

Methodology: Thirty-eight HIV-1 positive patients were recruited from two care centers of the Bucaramanga city, at northeastern Colombia. The same number of healthy individuals, matched by age and sex, were selected as controls. The CB2 expression levels were determined by qPCR, using RNA from peripheral blood mononuclear cells.

Results: Higher expression of CB2 was observed in the HIV-1 infected group, as compared with the control group. Six patients had marked overexpression of CB2; three of them were in stage C3 of the infection and had AIDS associated comorbidities. No correlation was found between the levels of expression of CB2 and the stages of the disease.

Conclusions: CB2 receptors are overexpressed in HIV-1 infected individuals. This observation allows the possibility to propose the use of CB2 agonist drugs, which could act as adjuvants to conventional antiretroviral therapy.

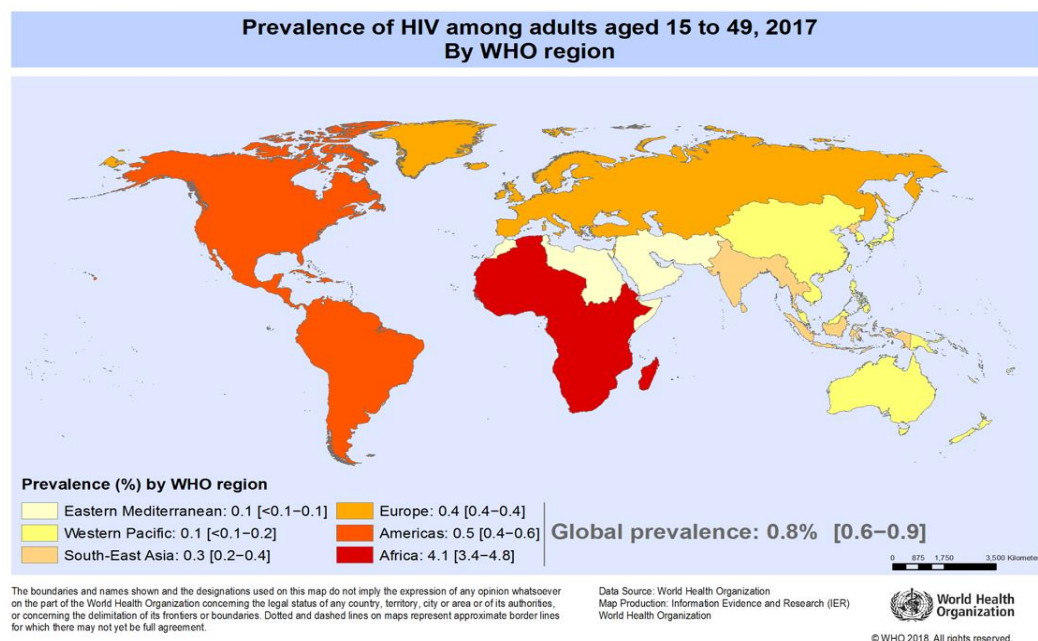
* Degree work

** Faculty of Health, School of Medicine, Department of Basic Biomedical Sciences, Master's Degree in Basic Biomedical Sciences. Director: Herman José Arteaga Narváez.

1. IDENTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) ocasiona el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), una de las principales causas de morbi-mortalidad por enfermedades infecciosas en el mundo. Según el informe UNAIDS DATA 2018, para el año 2017 existían 36.900.000 personas vivas infectadas (Figura 1), se registraron 1,8 millones de nuevas infecciones de VIH y murieron 940,000 personas en el mundo (1). En América Latina en el año 2016 se estimó que había 1,8 millones de personas vivas infectadas por VIH (1) y en Colombia 120,000 personas (2). En Santander en el año 2016 la prevalencia de la infección fue del 0,14% correspondiente a 2,798 personas, con una relación hombre mujer de 2,3 a 1 (3) y en Bucaramanga para el año 2010 se reportaron en total 1898 personas infectadas para una prevalencia 0,362%, con una relación hombre mujer de 2,24 a 1 (3).

Figura 1. Número total de personas que viven con VIH a nivel global para 2017.



Fuente: http://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/cases_all/en/

Esfuerzos sin precedentes en los campos de la salud han contribuido para poder convertir progresivamente la infección por VIH, de una condición inevitablemente fatal a una enfermedad prácticamente crónica, la cual, actualmente, puede ser controlada apropiadamente por medio de una eficaz combinación de fármacos antirretrovirales denominada terapia antiretroviral de gran actividad (TARGA), la cual permite un control altamente eficiente y sostenido de la replicación viral. (4)

Sin embargo, a pesar de contar con un tratamiento altamente efectivo para el control de la infección, el acceso a estos medicamentos está garantizado solamente a la fracción de la población infectada que vive en los países más desarrollados, mientras que la mayoría de la población infectada constituida por habitantes de países subdesarrollados y en condición de pobreza aun esta desprotegida. Adicionalmente la calidad de vida de los pacientes con el tratamiento TARGA pudiera verse afectada por problemas, tales como: (i) efectos adversos, los cuales en algunas oportunidades, pueden poner en riesgo la vida del paciente, (ii) la necesidad de realizar pruebas serológicas permanentes para detectar tempranamente alteraciones hepáticas y hematológicas, entre otras, que pudieran obligar a modificar el esquema terapéutico, y (iii) la incapacidad de esta terapia de actuar en los tejidos reservorio del virus e inhibir la replicación viral, lo cual permite que a pesar del tratamiento se mantenga una producción pequeña pero permanente de virus (5, 6) (4, 5) que podría propiciar que en determinado momento se originen cepas mutantes resistentes a la terapia antirretroviral (7). En consecuencia, además de lo anterior, a pesar de los grandes avances en términos de mejoramiento de la supervivencia y calidad de vida de los pacientes infectados con VIH alcanzados con la TARGA, la resistencia al tratamiento, la toxicidad, la aceptación de la terapia y el hecho que el tratamiento actual no es curativo porque no tiene efecto en las células reservorio, se justifica la búsqueda de terapias farmacológicas alternativas (4, 8).

Una de las posibilidades es la búsqueda de fármacos que actúen sobre blancos moleculares de la célula del hospedero, el cual no está sujeto a los mecanismos de

resistencia como los que se dan en el virus por su alta tasa de mutación. Más aun, en los años recientes la atención se ha centrado en la búsqueda de fármacos que tengan actividad sobre las células reservorio, ya que en teoría estas células podrían conformar blancos estratégicos para erradicar completamente los provirus del organismo, y posiblemente llevar a una curación definitiva de la infección en el futuro (9, 10).

Es importante destacar que la mejor alternativa para el control de esta pandemia es el desarrollo de una vacuna preventiva, sin embargo, a pesar de que la comunidad científica lleva 30 años de investigación en este campo, los modelos que hasta ahora se han probado no han dado resultados satisfactorios. Por todo lo anterior se justifica continuar evaluando nuevas aproximaciones terapéuticas adyuvantes de la terapia convencional para el manejo de la infección (11-13).

Los endocannabinoides tienen funciones moduladoras del sistema inmune; estas funciones son mediadas por vías de señalización activadas a través de los receptores de cannabinoides tipo 2 (CB2), los cuales se expresan sobre diversos tipos de células del sistema inmune. En condiciones de inflamación crónica, en las cuales se da una activación persistente del sistema inmune, se produce un incremento de la expresión de los receptores CB2, y es de esta manera como los endocannabinoides inducen una regulación de los procesos de activación de las células del sistema inmune, mediante una vía de señalización que involucra la inhibición del factor nuclear de transcripción kappa B (NF- κ B; del Inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (14). NF- κ B es un factor de transcripción que media la acción de diversas vías de señalización inductoras de respuestas proinflamatorias al igual que la replicación del VIH-1(15). Recientemente se ha comprobado en diversos modelos experimentales que los cannabinoides o sus análogos regulan negativamente la replicación de VIH- 1 (8, 13, 16-18). NF- κ B, a diferencia de los blancos terapéuticos de los fármacos antirretrovirales usados actualmente, no estaría sujeto a altas tasas de mutación y por lo tanto, se podría

proponer el uso de análogos de cannabinoides específicos para CB2 como posibles coadyuvantes de la terapia antirretroviral.

2. JUSTIFICACION

Este trabajo busca establecer el perfil de expresión de los receptores de Cannabinoides CB2 en individuos sanos y en individuos infectados con VIH. Se espera encontrar diferencias entre los dos grupos, debido a que estos receptores son sintetizados principalmente en células del sistema inmune crónicamente activadas.

Varias investigaciones acerca de los mecanismos fisiopatológicos de la infección por VIH que conducen al desarrollo de SIDA, han demostrado que esta infección a lo largo de todo el espectro de su historia natural cursa como un proceso inflamatorio crónico. Aunque en la actualidad el tratamiento antirretroviral es una herramienta clínica muy útil para el control de la progresión de la enfermedad, este no es curativo y el análisis de una cohorte de pacientes de un estudio multicéntrico demostró que el TARGA tampoco inhibe el proceso proinflamatorio característico de la infección por VIH. (19). En este estudio se demostró que a pesar de que el TARGA ejerce un buen efecto de supresión de la replicación viral (carga viral inferior a 50 copias/ml de sangre), los biomarcadores de inflamación PCR, sCD14, BAFF, CXCL10, sCD27, sTNF-R2, TNF-alfa, permanecen significativamente elevados en la población infectada cuando se compara con la población seronegativa para VIH. La conclusión de este estudio sugiere que algunos biomarcadores como los anteriormente nombrados podrían ser un blanco terapéutico para combatir la epidemia del VIH/SIDA y constituiría una medida coadyuvante del TARGA (19).

Aunque en la actualidad no contamos con ningún medicamento que contrarreste el estado proinflamatorio mediante el bloqueo de la expresión de dichos biomarcadores, si existen estudios en los que se ha comprobado la actividad de varios compuestos sintéticos con propiedades agonistas del receptor CB2, los cuales podrían ejercer un efecto inhibitorio del estado proinflamatorio de los pacientes. Adicionalmente se están realizando otros estudios que buscan el

desarrollo de nuevas moléculas de este tipo con mayor actividad farmacológica. (20). Como se expresó anteriormente los receptores CB2 se expresan en mayor concentración en las células del sistema inmunológico durante procesos de inflamación crónica y se ha demostrado que, al ser activados, estos receptores ejercen un efecto inmunomodulador (20).

Considerando que durante la infección por VIH la replicación viral se incrementa cuando existe un estado sistémico proinflamatorio, los receptores CB2 podrían ser un blanco terapéutico para manejar esta infección (21, 22). Ramírez S. y col, mostraron que en cultivos celulares infectados con VIH, la actividad de la transcriptasa reversa disminuía considerablemente en presencia de un agonista CB2; además, este tratamiento inhibió parcialmente la actividad de otras proteínas del gen Pol de VIH y no afectó la expresión de CXCR4 y CCR5 de las membranas celulares (16). Molina P. y cols., utilizando un modelo animal (Macacus Rhesus), demostraron que la intervención temprana con THC (agonista no selectivo de los receptores) en animales infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Simiano (VIS), disminuía la concentración viral en plasma y la mortalidad temprana, cuando se comparaba con primates que no recibieron THC. Estos hallazgos sugieren que la activación de los receptores CB2 podría inhibir la transcripción viral *in vivo* (17).

Toda la información anterior, en su conjunto, justifica la realización de un estudio para determinar los niveles de expresión de los receptores CB2 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes VIH positivos con y sin tratamiento y compararlos con pacientes seronegativos. De esta manera se podría evaluar la hipótesis de que la expresión de receptores CB2 se encuentra incrementada en pacientes VIH positivos (por ser una enfermedad que cursa con un estado inflamatorio crónico). Resultados positivos servirían para sumar información que apoyaría la posibilidad de realizar intervenciones clínicas, como por ejemplo, utilizar agonistas CB2, considerando que ya existen moléculas de este tipo aprobadas para ensayos clínicos y que los agonistas CB2 tienen actividad inhibitoria

de la replicación de VIH *in vitro* debido a su capacidad de inhibir la activación de NF- κ B selectivamente sobre células activadas crónicamente(18), lo cual disminuye grandemente los riesgos que tienen otros medicamentos antiinflamatorios. Se esperaría que un tratamiento de este tipo coadyuve a reducir la replicación persistente de VIH en los individuos infectados. (23).

Adicionalmente, es posible sugerir que puede existir una diferencia entre los niveles de expresión de CB2 entre los pacientes VIH positivos sin tratamiento o con un estadio avanzado de la enfermedad y comorbilidades y aquellos pacientes con VIH que están recibiendo tratamiento y con recuento de células T CD4+ superior a 200 ul y carga viral controlada. Diferencias entre los niveles de CB2 entre estos dos grupos de individuos infectados pudieran permitir explorar la posibilidad de que estos receptores se puedan utilizar, además, como marcador pronóstico de la infección.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION

¿Cuál es el perfil de expresión de los receptores CB2 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con VIH-1 con respecto a individuos sanos?

¿Existen diferencias significativas en el perfil de expresión de los receptores CB2 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con VIH-1 con respecto a individuos sanos?

¿Existe correlación entre los niveles de expresión de los receptores CB2 y el estadio de evolución de la enfermedad en los pacientes infectados con VIH-1?

4. MARCO TEÓRICO

4.1 LOS CANNABINOIDES

Los cannabinoides fueron descritos inicialmente como un grupo de moléculas lipofílicas que constituyen los compuestos activos de la planta *Cannabis sativa* conocida comúnmente como marihuana (24). Los usos medicinales empíricos de esta planta han sido descritos desde siglos atrás para el tratamiento de enfermedades como el asma y la migraña, así como también para el alivio del dolor en general, manejo de las convulsiones y disminución de la ansiedad (25). Más recientemente, algunos estudios han hecho énfasis en su efecto benéfico sobre patologías inflamatorias, glaucoma y esclerosis múltiple (26). Algunos trabajos de investigación sobre compuestos derivados de esta planta han permitido dilucidar hasta la fecha parcialmente la farmacocinética y farmacodinámica de los cannabinoides y llevaron al descubrimiento de un sistema de moléculas endógenas similares, denominadas endocannabinoides (24). En los mamíferos (incluyendo los humanos) se han reportado dos tipos de receptores de cannabinoides, centrales (CB1) y periféricos (CB2), los cuales se unen a ligandos de origen endógeno, los endocannabinoides, o de origen exógeno, como compuestos extraídos de la plantas o sintetizados en el laboratorio (20).

El mecanismo de la inmunomodulación inducida por los cannabinoides se ha estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*; los cannabinoides se unen a los receptores de CB1 y CB2 y de esta manera pueden inducir una inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa y la activación de AMPc por forskolina; este proceso conduce a la disminución de la actividad de la proteína quinasa A y posteriormente, a una menor unión de factores de transcripción al CRE (del inglés *cAMP-response element*) impidiendo que se lleve a cabo el proceso de transcripción en la célula (14, 27).

Los cannabinoides modulan claramente respuestas inmunológicas durante los procesos inflamatorios y sus efectos inmunomoduladores en enfermedades como la esclerosis múltiple, diabetes, choque séptico, artritis reumatoide, y otras están bien estudiados. (14, 28). Estudios *in vivo* muestran que los cannabinoides ejercen sus propiedades inmunomoduladoras de cuatro maneras: (i) inducen apoptosis, (ii) suprimen la proliferación celular, (iii) inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas y aumentan la producción de citoquinas anti-inflamatorias, e (iv) inducen la activación de células T reguladoras (14).

4.2 SISTEMA DE ENDOCANNABINOIDES

Este sistema está compuesto por los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 y los endocannabinoides o cannabinoides endógenos. Estos últimos son, principalmente, la anandamida, el 2-arachidonoylglycerol (2AG), el 2 arachidonoylglycerol ether o Noladin Ether, el O-arachidonoylethanolamine (Virodhamine) y las enzimas que los sintetizan y los degradan (29).

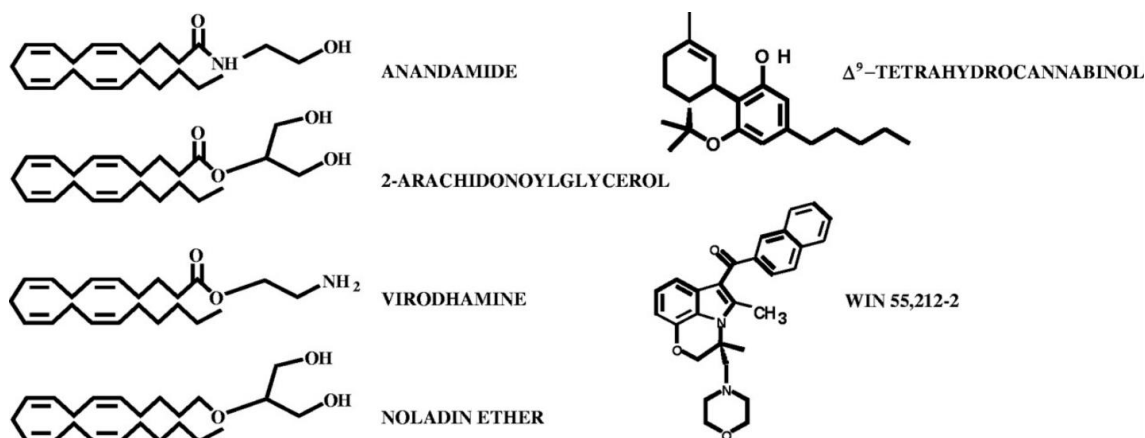
A diferencia de los neurotransmisores y neuropépticos clásicos, los endocannabinoides no se almacenan en compartimentos intracelulares; sino que se producen a demanda por estímulos de los receptores, este proceso ocurre a través de la escisión de precursores lipídicos por diversas enzimas y su inmediata liberación de las neuronas (30).

La síntesis y degradación de cada uno de los endocannabinoides está mediada por un grupo de enzimas específicas; la anandamida es sintetizada mediante varios pasos enzimáticos a partir de la hidrólisis de la N-arachidonoil fosfatidil etanolamina (NAPE), la cual a su vez es sintetizada a partir del ácido araquidónico y la fosfatidil etanolamina (28, 29). La anandamida es degradada en el citoplasma mediante la hidrolasa específica para amidas de ácidos grasos FAAH (del inglés, *fatty acid amide hydrolase*) (31). El 2AG es generado mediante una lipasa a partir del

diacilglicerol (DAG) por la acción de una fosfolipasa y es degradado por la lipasa de monoacilglicerol (MAGL) (29). Se ha sugerido que algunos ligandos de CB2 pudieran inducir la activación de vías de señalización específica de manera selectiva. Por ejemplo 2-AG pareciera que activa preferencialmente la vía de las MAPK-ERK mientras que el 2-araquidonil glicerol éter o noladin pudiera actuar preferencialmente inhibiendo la adenilato ciclasa. Esta característica es de importancia porque pareciera también afectar la función de los análogos de cannabinoides sintéticos (29).

Los endocannabinoides son derivados de ácidos grasos poliinsaturados, esto los diferencia en estructura química de los fitocannabinoides de la planta de cannabis. De acuerdo a la conformación de su estructura química se clasifican en compuestos ligados a N ò O, (figura 2) por ejemplo las amidas tienen estructuras químicas simples, mientras que los éteres de glicerilo son compuestos más complejos en su estructura química (32).

Figura 2. Estructura Química de los Endocannabinoides.

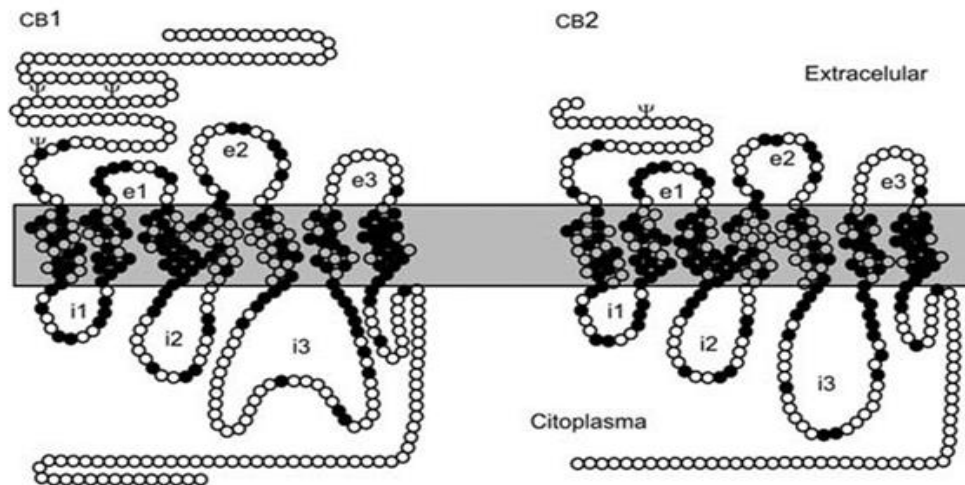


Fuente: The Endocannabinoid System: physiology and pharmacology alcohol & alcoholism vol. 40, no. 1, pp. 2–14, 2005

4.3 RECEPTORES CANNABINOIDES

Los receptores cannabinoides son proteínas integrales de membrana cuyas secuencias de aminoácidos se caracterizan por siete segmentos hidrofóbicos que tienen patrón helicoidal y pertenecen al grupo de proteínas de siete dominios transmembranales (7TM, del inglés *seven-transmembrane-helix*) y comparten características estructurales de otros receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) como: Un dominio N-terminal extracelular glicosilado, siete alfa-hélices transmembranales con bucles extracelulares e intracelulares y un dominio C-terminal intracelular (14).(27).

Figura 3. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2.



Los receptores tienen siete segmentos transmembrana. Aminoácidos comunes a los dos receptores; aminoácidos diferentes; sitios consenso de glicosilación. **e1,e2,e3** son asas extracelulares; **i1,i2,i3** son asas intracelulares.

Fuente: Cannabinoides: neurobiología y usos médicos. Disponible en: <https://elementos.buap.mx/num60/pdf/3.pdf>.

Los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 presentan similitudes y diferencias entre ellos. A pesar de ser codificados por diferentes genes, exhiben 44% de identidad en la secuencia de sus aminoácidos a lo largo de toda la proteína (14). La

diferencia más importante entre CB1 y CB2 es la capacidad de interacción con los lípidos de membrana que es conferida por dominios yuxtamembranales, CB1 presenta una superficie hidrofóbica en la interfaz de las hélices I-VII, que favorece la interacción específica con el colesterol y el ácido palmítico, comparado con CB2 que tiene una región cargada negativamente dentro en estos dominios lo que lo hace más bien desfavorable para cualquier interacción con lípidos y no está disponible para cualquier interacción con el colesterol o con proteínas G (14).

Esta diferencia existente entre los dos tipos de receptores de cannabinoides hace que el receptor de cannabinoides CB2 sea independiente del contenido de colesterol de la membrana celular a pesar de que ambos tengan la capacidad de ser activados por los mismos endocannabinoides y desencadenar las mismas vías de señalización (14, 28).

4.3.1 Receptor CB1. El receptor de cannabinoides (CB1) fue descubierto por Devane et al. en 1988 y fue clonado por Matsuda et al. En 1990, valiéndose de la homología de CB1 con los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) (14, 31).

Existen receptores CB1 en otros vertebrados diferente a los humanos. En humanos los genes del receptor CB1 están localizados en la región q14-q15 del cromosoma 6 y codifican para una proteína con una secuencia de 472 ó 473 aminoácidos con una secuencia de aminoácidos diferente de cualquier otro receptor conocido. En humanos, además del receptor de cannabinoides CB1 clásico, existen dos variantes generadas por corte y empalme diferencial, CB1a y CB1b; ambas variantes tienen propiedades de unión a sus ligandos y de activación diferentes; además estas variables se expresan en niveles muy bajos en algunos tejidos y presentan diferencias en cuanto a sus características farmacológicas, tales como la afinidad de unión, potencia funcional, y la eficacia de respuesta a varios agonistas en comparación con el receptor de cannabinoides CB1 de longitud completa (14).

El receptor CB1 se encuentra en abundancia en las regiones del cerebro responsables del movimiento (ganglios basales, cerebelo), del procesamiento de la memoria (hipocampo, corteza cerebral) y de la modulación del dolor (ciertas partes de la médula espinal y sustancia gris periacueductal), mientras que su presencia en el tronco cerebral es baja; también se encuentra presente en órganos y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas de los aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal y está presente en las terminaciones de los nervios, tanto centrales como periféricos, e inhibe la liberación de otros neurotransmisores y de esta manera su activación protege al sistema nervioso contra la sobre-activación o la sobre-inhibición provocada por los neurotransmisores (29).

4.3.2 Receptor CB2. El receptor de cannabinoides CB2 fue clonado de la línea celular promielocítica (HL60) en 1993. La proteína codificada por este gen contiene 360 aminoácidos, este receptor también fue identificado en otras especies, tales como ratón, rata y algunos bovinos (14, 27). El receptor CB2 es un miembro de la superfamilia de las proteínas G y es codificado por el gen CNR2 presente en el cromosoma 1p36 en los seres humanos. Estructuralmente este receptor está compuesto de una única cadena polipeptídica con un dominio extracelular N-terminal glicosilado, TM7 y un dominio N-terminal intracelular (34).

El receptor CB2 se expresa en todas las células del sistema inmune tales como las células B, células NK, macrófagos, polimorfonucleares, linfocitos T CD4, linfocitos T CD8, etc., pero los niveles de expresión varían entre las distintas poblaciones de células y estados de activación; esto sugiere un papel crítico de este receptor en la regulación de las funciones inmunológicas desempeñado especialmente en la regulación de la migración y proliferación celular (14, 27, 29, 31). La expresión de receptores CB2 también ha sido observada en menor cantidad en el timo, las amígdalas (33).

4.3.2.1 Regulación de la Expresión de CB2. Los receptores CB2 también se expresan en el sistema nervioso central (SNC) durante diversos estadios de inflamación, esta expresión ha sido localizada primariamente en células de la microglia y es detectada en estas células solamente como respuesta a una activación por injurias y estímulos pero no es detectada en condiciones basales, (27, 33) lo cual sugiere un papel regulador de estos receptores durante los procesos inflamatorios.

La expresión de este receptor puede estar relacionada con la presencia de células infiltrantes del sistema inmune las cuales ingresan al cerebro como resultado de la ruptura de la barrera hematoencefálica, contribuyendo así a la presencia de CB2 en el SNC (28, 33).

Dentro de las funciones inmunomoduladoras del receptor CB2 se incluyen efectos sobre la migración, proliferación, apoptosis, y la producción de citoquinas de las células del sistema inmune. Su función inmunológica en la migración celular es importante ya que este receptor muestra un patrón de regulación complejo con algunos ligandos CB2 promoviendo en unos casos y en otros inhibiendo la quimiotaxis (14, 28, 29, 33).

4.3.2.2 Señalización del receptor de cannabinoides CB2. El receptor CB2, como el resto de los GPCRs, envían señales a través de los tres componentes principales de la vía de las MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinases*): ERK (del inglés *Extracellular signal-Regulated Kinases*), JNK (del inglés *Jun N-terminus Kinases*) y p38, sin embargo, la activación y el acoplamiento de los receptores de cannabinoides a la vía de las MAPKs depende del contexto celular. Para que ocurra la señalización a través de la cascada de las MAPK se requiere una amplia gama de factores a nivel de la membrana plasmática que determinan la activación e inhibición de la célula y esto depende del tipo de célula, del estado de diferenciación celular y de los co-moduladores de las cascadas MAPK (14, 31).

Además después de la activación del receptor por agonistas, este transduce señales intracelulares a través de su acoplamiento a las proteínas Gi/Go, un subtipo de proteínas G, regulando así la actividad de múltiples efectores intracelulares como algunos ya mencionados previamente, incluyendo la adenilciclase, componentes de la vía ERK-MAPK, Ca^{2+} , la síntesis de ceramida y la vía del PI3K/Akt (35). La vía que desencadena la señalización que inhibe la actividad de la adenilciclase y reduce los niveles de AMPc y la falta de acumulación de AMPc atenúa la activación de la proteína quinasa A (PKA). La activación de PKA es importante porque esta fosforila la proteína de respuesta a AMPc, el cual es un factor de transcripción que tiene como función la regulación de una variedad de genes que promueven la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células del sistema inmune, por tal razón el resultado final de este proceso es la inhibición de varios componentes de la respuesta inmune (33).

Diferentes agonistas del receptor CB2 se unen exclusivamente a este y regulan distintamente a múltiples efectores; este tipo de señalización intracelular es descrito como el tráfico de respuesta dirigida por agonistas (ADTR, del inglés, *agonist-directed trafficking of response*) (35); este tipo de respuesta es importante debido a la capacidad que tienen los ligandos de los receptores CB2 de generar respuestas intracelulares de tráfico selectivo aunado a un perfil de expresión selectivo de receptores en tejidos inflamados, y sus propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras. Estas observaciones sugieren que se pudiera emplear las cualidades de este tipo de receptor para el desarrollo de una nueva clase de fármacos, con actividad muy selectiva, para el tratamiento de una variedad de desórdenes inflamatorios (35).

Dependiendo de la vía de señalización utilizada por los endocannabinoides, el receptor de cannabinoides CB2 puede tanto inhibir como promover distintas funciones celulares de la respuesta inmune (33). Un ejemplo de esto es el del endocanabinoide Anandamida, el cual activa vías de señalización que son

parcialmente dependientes del receptor de cannabinoides CB2 y de esta forma ejerce algunas funciones como: (i) atenuación de la producción de IL-12 e IL-23 inducida por LPS e IFN- γ , de una manera parcialmente dependiente de CB2, en las células microgliales, las cuales son células mieloides; (ii) acción selectiva a través de las vías ERK1 / 2 y JNK, pero no a través de p38; (iii) inhibe la activación de NF- κ B, bloqueando la fosforilación del I- κ B e inhibiendo de ese modo su degradación y previniendo la translocación de NF- κ B al núcleo; y (iv) de manera similar, 2-AG induce una liberación transitoria de Calcio intracelular en algunas células de una manera dependiente de CB2 (33).

Como moléculas que participan en diferentes eventos proinflamatorios los cannabinoides están asociados por ejemplo en la infección por VIH en la regulación de procesos tales como: (i) la quimiotaxis de células del sistema inmune, (ii) la activación del endotelio y la infiltración de leucocitos en los tejidos y (iii) están presentes en la lesión de las barreras endoteliales, como la barrera hematoencefálica. Por tal razón sería posible utilizar estas moléculas o sus análogos como blanco terapéutico en los pacientes con infección por VIH (14, 36).

4.4 ANÁLOGOS DE CANNABINOIDES

Ya desde los años 40, se pudo aislar, a partir de la planta original *C. sativa*, algunos cannabinoides como el cannabinal, sin embargo esta molécula tenía una pobre actividad; posteriormente Mechoulam y Gaoni en 1965 identificaron y sintetizaron completamente la molécula principal que tenía las características psicoactivas propias del cannabis, esta molécula fue denominada delta-9 tetrahidrocannabinol (THC) (37, 38), luego fueron sintetizadas otras moléculas con mejor actividad cannabinomimética y con un futuro farmacológico más prometedor tales como el cannabidiol (38).

El conocimiento de la estructura de estas moléculas permitió la posterior síntesis y evaluación en modelos animales de análogos con diferentes potencias cannabinomimética. Aunque a menudo muchas de las sustancias son estructuralmente relacionadas con el THC, los agonistas de los receptores de cannabinoides forman un grupo diverso y se dividen en diferentes grupos tales como los llamados cannabinoides clásicos, los cuales se relacionaban estructuralmente con el THC, y otros grupos estructuralmente diferentes con actividades farmacocinéticas distintas, tales como los cannabinoides no clásicos, los aminoalkilindoles y los eicosanoides (39).

Algunos de estos compuestos poseen actividad cannabinomimética y afinidades más altas por los receptores CB1/CB2 que el THC (40). En la década de los 90 se comprobó la existencia de los dos tipos de receptores de cannabinoides y esto amplió la posibilidad de probar fármacos con actividad selectiva en el sistema endocannabinoide y así eliminar los efectos indeseables que muchos de los compuestos tenían al activar el receptor CB1 (31).

Actualmente, se han sintetizado muchas moléculas con actividad agonista selectiva sobre CB2, las cuales además se han ensayado en modelos animales para determinar su utilidad en el tratamiento de diferentes enfermedades. Los resultados de estos estudios han demostrado que estos compuestos tienen actividad biológica útil para el control de diferentes patologías como la obesidad y el control de la inflamación en procesos de carácter agudo y crónico (41).

Aunque por el momento únicamente se encuentran en el mercado y en ensayos clínicos, compuestos con actividad agonista no específica, se espera que por medio de métodos farmacológicos avanzados se puedan descubrir nuevas moléculas con actividad agonista específica CB2, que faciliten el desarrollo de medicamentos viables para el control de enfermedades caracterizadas por cuadros inflamatorios crónicos (42).

4.5 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Se conocen 2 tipos de este virus: VIH-1 y VIH-2, siendo VIH-1 el responsable fundamental de la epidemia en todo el mundo. VIH-2 es un virus que comparte únicamente el 40% del código genético con VIH-1 y se caracteriza por ser menos virulento y generar una progresión más lenta hacia SIDA (43, 44); la prevalencia de VIH-2 en Europa, Norteamérica y América Latina es muy baja (43, 45, 46).

VIH pertenece a la familia retroviridae, género lentivirus según ICVCN (Del inglés *International Code of Virus Classification and Nomenclature*), su conformación estructural es la de un virus envuelto e icosaédrico; según la clasificación Baltimore lo ubica en el grupo VI ya que su material genético consta de dos cadenas simples idénticas de ARN de sentido positivo asociado a una transcriptasa reversa (TR) (47).

La conformación proteínica del virus tiene una organización compleja compuesta por varias proteínas entre las que se encuentran las estructurales, las reguladoras y las accesorias. En su envoltura se encuentra un complejo glucoproteínico conocido como Gp160 el cual está conformado por dos subunidades, Gp120 y Gp41, agrupadas trimericamente en su estructura cuaternaria. Las glucoproteínas de la envoltura permiten a la partícula viral reconocer su receptor celular, la molécula CD4 y su respectivo correceptor (CCR5 - CXCR4), además de permitir la fusión viral con la célula. Este complejo proteico es una molécula dinámica que cambia estructuralmente al entrar en contacto con el receptor de la célula blanco y presenta un alto grado de variabilidad fenotípica entre los diferentes serotipos virales (48).

Se han realizado grandes esfuerzos para dilucidar la estructura tridimensional, las regiones inmunogénicas y la variabilidad genética de la gp160 con el fin de poder usar estas moléculas como inmunógenos efectivos para el desarrollo de anticuerpos

neutralizantes contra VIH; sin embargo, estos esfuerzos han sido infructuosos y no han dado como resultado una vacuna efectiva como se esperaba (12).

La proteína p17, p24 y p7 conforman la matriz viral, la cápside y la nucleocápside, respectivamente. La proteína p17 funciona tanto al inicio como al final del ciclo viral, tiene como función la conformación y la estabilización de la envoltura lipídica del virión; adicionalmente, se ha propuesto que una región conocida como cariofilica (afín al núcleo), permite a p17 dirigir el genoma viral al núcleo de las células, promoviendo así la infección viral (49).

La proteína p24 es el principal constituyente de la cápside, se utiliza como un marcador de diagnóstico y de replicación viral en experimentos *in vitro*, es la proteína más abundante en el virión y se encuentra en suero, tanto en estadios tempranos como tardíos de la infección, su función principal es la de dar estructura al virión y permitir que este pueda ser viable e infectante (50). La proteína principal de la nucleocápside p7 es una pequeña proteína con dos dedos de zinc que se mantiene junto al genoma viral y participa en el proceso de transcripción inversa (51). En el núcleo, además del genoma viral, se encuentran algunas proteínas de interés con actividad enzimática como la proteasa, la integrasa y la transcriptasa. (51)

El genoma viral está constituido de los genes estructurales *env*, *gag* y *pol*. Estos genes producen poliproteínas que se encargan de la producción de las proteínas estructurales (*gag*), integrasa, proteasa, polimerasas (*pol*) y proteínas de envoltura (*env*) además el virus cuenta con una serie de pequeños genes reguladores accesorios (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpx* y *tev*), muchos de los cuales regulan la transcripción y replicación viral y se han asociado con el nivel de virulencia de diferentes cepas virales (47). Estos genes y sus productos proteínicos han sido ampliamente estudiados, sin embargo, este tema excede las implicaciones del presente trabajo.

Como todo retrovirus VIH posee la enzima transcriptasa inversa, la cual se ha utilizado como principal blanco terapéutico. Un aspecto importante es que esta enzima tiene baja eficacia al momento de realizar réplicas exactas del genoma, además de no tener la capacidad de reparar los errores que comete, en consecuencia el virus tiene una muy alta tasa de mutaciones, lo cual ha sido un obstáculo muy importante para el control de la epidemia ya que esta tasa de mutación es una de las principales causas por las que se generan viriones que escapan al control de los fármacos antirretrovirales (52, 53).

4.5.1 Dinámica de la infección viral. Actualmente se tiene bastante información sobre el proceso por medio del cual VIH ingresa a la célula hospedera, inserta su genoma y libera viriones infectantes. Las etapas de la infección por VIH son: Adherencia y entrada, transcripción reversa del genoma viral, integración del genoma pro viral en el genoma de la célula hospedera, replicación del RNA viral y generación de las proteínas virales, ensamblaje y liberación de nuevas partículas. VIH utiliza como ligando principal para adherirse a receptores de la célula hospedera la proteína de la envoltura gp120 la cual tiene una alta afinidad de interacción con el receptor CD4. Este receptor está presente en los linfocitos T CD4+ y todas las células de la línea monocítica. La interacción de estas células con el VIH-1 también involucra a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, los cuales actúan como correceptor para la entrada viral. Algunas cepas VIH-1, denominadas R5, tienen afinidad para el receptor CCR5 y es el tipo de virus predominante en la transmisión a través de las mucosas y se encuentra circulante en el individuo infectado en los primeros años de la infección; otras cepas de VIH-1 denominadas X4 utilizan principalmente el correceptor CXCR4 y están más asociadas con la transmisión por vía sanguínea (54).

La región V3 de gp120 es el segmento más importante para la interacción con CD4, este segmento proteínico es altamente conservado y no está expuesto en la superficie del virión y únicamente es expuesto al momento de la interacción con el

receptor CD4, y se sugiere que los anticuerpos neutralizantes no pueden entrar en contacto con la molécula antes de que esta se encuentre en contacto directo con el CD4, este es un importante mecanismo por el cual se perpetua la infección viral y se imposibilita el control de la respuesta inmune humoral de la transmisión del virus de célula a célula (55). Una vez la proteína Gp120 interactúa con CD4 permite la expresión de la proteína hidrofóbica Gp41, la cual contiene unos dominios que aproximan la membrana viral a la membrana celular generando un poro de fusión y la posterior unión de las membranas con la consiguiente liberación de la cápside al citoplasma celular (56). Aunque esta vía de infección es la que se conoce clásicamente, algunas líneas de investigación sugieren que en ciertos tipos celulares la vía endocítica es la predominante para llevar a cabo la infección viral (57).

La etapa comprendida entre la fusión viral y la inserción del genoma al núcleo celular es algo que aún no se ha dilucidado claramente. Sin embargo, se conoce que inmediatamente realizada la liberación viral comienza el proceso de transcripción inversa en el que la cápside cumple una función fundamental al generar un entorno adecuado para llevar a cabo la síntesis genómica reversa en lo que se conoce como el complejo de transcripción inversa (CTI).

Con respecto a la degradación de la cápside, la cual se lleva a cabo en el citoplasma celular, el tiempo en el que esta se realiza es variable y se cree que los factores citoplasmáticos de cada célula determinan el proceso de enucleación de la cápside (58).

Tras la desintegración parcial o completa de la cápside el CTI por medio de factores celulares como también de proteínas accesorias (cariofilicas) del virus como la proteína Vpr, se acopla a la maquinaria de importación nuclear propia de la célula, esto permite la unión del genoma viral con el poro nuclear de la célula, posteriormente diversas señales celulares y virales ayudan a promover el traspaso

del genoma viral al interior del núcleo en contra de la corriente de concentración de ácidos nucleicos que hay al interior de este (59). Una vez dentro del núcleo celular el genoma es insertado en el genoma de la célula hospedera por medio de la proteína viral integrasa (59).

VIH tiene la capacidad de infectar tanto células en estado de replicación como células en estado de reposo; al incluirse en su genoma viral los provirus pueden replicarse desde allí a partir de células del sistema inmunológico, pero solamente cuando estas se activen, así como también permanecer en estado de latencia en aquellas células inactivas a la espera de factores que activen en las células del sistema inmunológico y posteriormente inicien la replicación viral (59).

4.5.2 Papel de la activación celular en la patogenia del VIH. El resultado de la infección por VIH es una inmunodeficiencia severa, sin embargo, paradójicamente, la infección por VIH se asocia con una hiperactivación del sistema inmune durante la mayor parte de la evolución de la enfermedad. VIH destruye el sistema inmune al inducir activación inmune y utilizar este medio para su propio beneficio replicativo. Aunque se han descrito alteraciones en la función de todas las líneas celulares del sistema inmune, incluyendo los linfocitos T y B, las células dendríticas, los macrófagos, las células NK y los neutrófilos, las células de la línea monocítica desempeñan un papel fundamental en la inmunopatogenesis de la infección por VIH. Estas células sirven como reservorios del virus y median distintos procesos patológicos en distintos tipos de tejidos. A diferencia de su efecto después de la infección de células T CD4+, VIH es relativamente no citopático para las células del linaje de monocito-macrófago y por lo tanto puede replicarse extensamente en estas células y durante los periodos de inactivación actúan como reservorios de la infección (59).

Algunas células mononucleares infectadas crónicamente pueden sobrevivir por largo tiempo, y los agentes antirretrovirales actuales no tiene actividad sobre las

células con infección latente; aunque se están realizando esfuerzos en busca de estrategias que permitan controlar este problema (13, 60), estas células, actualmente, representan un desafío muy grande para la erradicación de VIH. Los macrófagos de tejido linfoide pueden ser productores abundantes de VIH cuando el paciente sufre infecciones oportunistas, durante las cuales las citoquinas en el tejido favorecen un estado altamente productivo de partículas virales por las células infectadas (60).

Hay suficientes evidencias que demuestran que la activación inmunitaria optimiza la replicación del virus y empeora el desenlace de la infección; aunque se sabe que la replicación de VIH es más eficiente en la células activadas, la mayor parte del daño que produce el virus no es consecuencia de lesión directa sobre la células sino que es secundaria al estado de activación crónica, el cual induce mayor sensibilidad a la apoptosis y debilitamiento de la capacidad del sistema inmune para restaurar las pérdidas secundarias a la muerte celular continuada (54).

Aunque aún es cuestión de debate, varios estudios sugieren que la permanencia concomitante de otros procesos infecciosos, los cuales evidentemente aumentan la activación celular, así como la elevación de biomarcadores asociados con hiperactivación inmune, generan picos en la carga viral y en consecuencia son factores asociados con una más rápida progresión de la enfermedad (61-63).

Los individuos infectados por VIH-1 con infecciones recurrentes tienen aumentos transitorios en la viremia plasmática que se correlacionan con el grado de activación inmune inducida; se han hecho observaciones similares en individuos que fueron infectados por VIH y que recibieron inmunizaciones contra distintos patógenos. La cantidad de replicación viral observada después de la inmunización con vacuna contra la influenza o durante la infección activa por *M. Tuberculosis* se correlacionó con un incremento de la carga viral tras la exposición (62, 64, 65). Los estudios

sugieren que el nivel de replicación viral se correlaciona con el nivel de activación del sistema inmune en respuesta a un antígeno.

4.5.3 Papel de NF- κ B en la infección por VIH. NF- κ B es un factor de transcripción complejo que controla la expresión de un gran número de genes implicados en la apoptosis, el crecimiento, la supervivencia, la diferenciación celular y la respuesta inmune. El aumento de la expresión de citoquinas asociada a la activación de NF- κ B es un proceso crucial en muchas condiciones inflamatorias como el cáncer, infecciones y diferentes enfermedades inflamatorias crónicas tales como la aterosclerosis, entre otras (66). Mingyan Y. y col. demostraron que NF- κ B juega un papel muy importante en la transcripción génica de VIH, y que controla en cierta medida la transcripción viral (23).

Actualmente se están realizando esfuerzos para dilucidar adecuadamente las vías de señalización de NF- κ B y comprender exactamente la relación que tiene este factor con distintos tipos de enfermedades, con el fin de diseñar nuevas estrategias terapéuticas contra las enfermedades inflamatorias mediante el control de las vías de señalización de NF- κ B. Orange y col. publicaron en 2008 un trabajo en el que muestran que por medio de péptidos con capacidad de penetrar en las células se puede inhibir directamente la señalización mediada por NF- κ B (67). El uso de estos péptidos podría ser una forma de controlar la replicación viral a través de NF- κ B. Además de lo anteriormente expuesto, se ha evidenciado que por medio de la activación de los receptores cannabinoides se puede regular negativamente la vía de señalización de NF- κ B (68), por lo que el uso de análogos de cannabinoides podría tener un efecto homólogo a la actividad de reguladores directos del NF- κ B, con la diferencia de que debido a que CB2 se expresa fundamentalmente en células crónicamente activadas tendría un efecto antiinflamatorio muy selectivo, sin los efectos inmunosupresores marcados de los inhibidores directos de NF- κ B. Esta aproximación tendría una ventaja adicional debido a que este tipo de control de la

replicación viral no induciría resistencia, ya que su blanco terapéutico no es un componente viral si no una molécula de la célula hospedera como tal. Se esperaría que la regulación de la actividad de NF- κ B mediada por cannabinoides tenga efectos benéficos retardando la evolución de la infección hacia el estadio de SIDA, como lo sugieren los resultados de diversos estudios *in vitro* (17, 69, 70).

4.5.4 Tratamiento antirretroviral. TARGA se compone de una combinación de fármacos que actúan preferencialmente en una etapa distinta del ciclo viral. Dentro de los compuestos antirretrovirales utilizados actualmente para este tipo de terapia están: Los Inhibidores de la transcriptasa inversa, análogos de nucleósidos y nucleótidos (NRTI, del inglés *Nucleoside/nucleotide reverse-transcriptase inhibitors*), los cuales inhiben la transcripción inversa por competición directa con los nucleótidos naturales; los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosidos (NNRTI, del inglés, *Non nucleoside/nucleotide reverse-transcriptase inhibitors*), cuya función se basa en la inhibición de la transcriptasa inversa por un mecanismo competitivo indirecto, mediante la unión a un lugar próximo al centro catalítico de la enzima impidiendo la actividad de la misma y de esta forma inhibiendo la replicación viral; los Inhibidores de la proteasa (IP), estos inhiben la proteasa por competencia directa con el sustrato en la unión al centro activo de la enzima, bloqueando la producción de los monómeros conformacionales del virión; los inhibidores de la entrada viral (IE), entre los cuales están los inhibidores de CCR5 y un fármaco bloqueador de la fusión que actúa sobre GP41 y por último se encuentran los inhibidores de la integrasa (II), los cuales evitan la inserción del genoma viral con el de la célula hospedera. Usualmente el tratamiento consta de la combinación de tres de estos medicamentos, generalmente dos NRTI más un NNRTI, IP o un II. La escogencia del esquema terapéutico está sujeto a las características individuales del paciente a tratar y del perfil de resistencia/susceptibilidad viral (71).

A pesar de los grandes avances en términos de mejoramiento de la calidad de vida alcanzados con el TARGA en los pacientes infectados con VIH, la resistencia al

tratamiento, la toxicidad, la aceptación de la terapia y sobre todo el hecho de que el tratamiento no es curativo, muy probablemente debido a su pobre actividad sobre las células reservorio, siguen siendo problemas que justifican la búsqueda de terapias farmacológicas alternativas (71).

Una de las posibilidades es la búsqueda de fármacos que actúen sobre blancos moleculares de la célula hospedera los cuales no estarían sujetos a los mecanismos de resistencia generados por la alta tasa de mutación del virus, y en especial fármacos que tuvieran actividad sobre las células reservorio. Dentro de los mecanismos de evasión se conocen en el caso de resistencia a los NRTI y NNRTI la aparición de mutaciones que permiten a la transcriptasa la discriminación entre nucleótido natural y el sintético que impiden la incorporación del fármaco, también generan mutaciones que conducen a un aumento de pirofosfolisis, con el cual se revierte el bloqueo de la cadena y se permite que continúe la síntesis de ADN; también se ha observado mutaciones asociadas a nucleosidos (NAM) que disminuyen la sensibilidad a casi todos los NRTI (71). Asimismo el virus genera resistencia contra los antiretrovirales NNRTI incorporando mutaciones que permiten la discriminación entre el sitio hidrofóbico de unión de la transcriptasa con el NNRTI, con lo cual impide la unión del fármaco; en este caso una mutación puede conferir un alto nivel de resistencia a uno o a todos los fármacos de la misma familia; el mecanismo de resistencia a estos fármacos se relacionan con mutaciones que inducen cambios en el centro activo de la enzima que hacen que se prefiera la poliproteína viral al fármaco en sí, también se crea resistencia mediante mutaciones que inducen cambios en los puntos de corte de la proteasa (71).

La disponibilidad de nuevos fármacos menos tóxicos, con dosificación conveniente facilita siempre la aceptación generalizada de la terapia temprana. Las actuales condiciones epidemiológicas a nivel mundial consideran que la aceptación del tratamiento es fundamental para reducir la morbilidad y mortalidad de la infección por VIH y lograr el control a nivel global. La vigilancia y el seguimiento al tratamiento

de la infección del paciente con VIH, se hacen necesarias y se deben realizar a través de pruebas de laboratorio, que permitan evaluar la efectividad y la tolerancia al tratamiento (71).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer los perfiles de expresión de los receptores de cannabinoides CB2 en pacientes infectados con VIH-1 y en individuos sanos y correlacionarlos con los distintos estadios clínicos en los individuos infectados. .

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los niveles de expresión de los receptores de cannabinoides CB2 en células mononucleares de sangre periférica en pacientes infectados con VIH-1 y en individuos sanos.
- Establecer la diferencia entre los perfiles de expresión de los receptores CB2 sangre periférica de pacientes infectados con VIH-1 y en individuos sanos.
- Establecer la diferencia de los perfiles de expresión de los receptores CB2 en sangre periférica de pacientes infectados con VIH-1 entre los diferentes estadios clínicos de la enfermedad.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio epidemiológico observacional analítico tipo casos y controles.

6.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se calculó para la población de Bucaramanga (aproximadamente 1 millón de habitantes), teniendo en cuenta una prevalencia de infección de 0.362%, con una relación hombre mujer de 2,24/1. Se escogió un nivel de confianza de 95%, un poder estadístico del 80%, una razón de 1 caso por 1 control y una proporción hipotética de niveles de expresión del receptor en los casos con respecto a los controles de 76/38. Según estos parámetros el estudio incluyó un tamaño de muestra de 76 individuos, los cuales fueron agrupados en casos (38 pacientes) y controles (38 individuos sanos) pareados por edad y sexo. El cálculo de tamaño de muestra se estimó con el paquete estadístico OpenEPI. La selección de la muestra se realizó de manera no probabilística, durante el periodo de reclutamiento, se incluyeron secuencialmente los participantes de acuerdo con los criterios de elegibilidad y quienes dieron su consentimiento para participar.

6.3 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se estudiaron 38 pacientes con diagnóstico confirmado de infección por VIH, residentes en el municipio de Bucaramanga y su área metropolitana que son atendidos en el servicio de Infectología del Hospital Universitario de Santander (HUS) y en la IPS Vidamedical. Como controles se estudiaron 38 personas seronegativas confirmadas por prueba rápida para VIH, residentes del municipio de Bucaramanga y su área metropolitana, que hacen parte de la comunidad UIS.

7. METODOLOGÍA

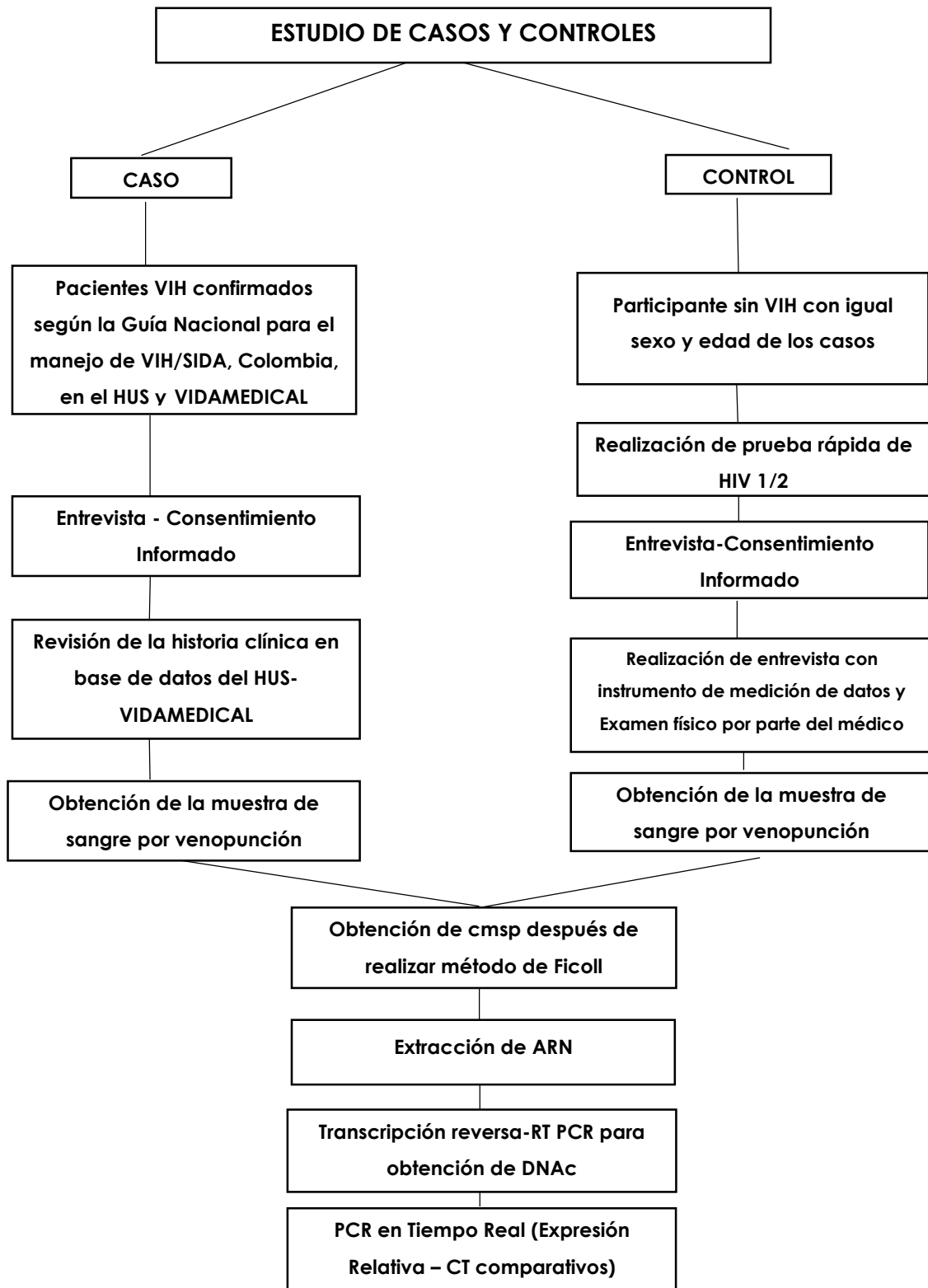
7.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO, RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN Y TOMA DE MUESTRA

7.1.1 Casos. Pacientes con diagnóstico confirmado de infección por VIH-1 según la guía Nacional para el manejo de VIH/SIDA. A dichos pacientes se les realizó una entrevista por parte del médico tratante, quien le explicó las intenciones del estudio y en aquellos pacientes que estuvieron de acuerdo con la participación en el estudio se pidió la firma del consentimiento informado, los datos relevantes se tomaron directamente de las historias clínicas de los participantes.

7.1.2 Controles. A los individuos controles se les realizó una entrevista y se les explicó igualmente el propósito del estudio, y de aquellos quienes estuvieron de acuerdo en la participación y cumplieron los requisitos de inclusión, y se obtuvo la firma del consentimiento informado para la realización de una prueba rápida para diagnóstico de infección por VIH. La información relevante del participante se obtuvo utilizando un instrumento de recolección de datos para identificar diferentes aspectos tanto clínicos como socio- demográficos.

Tanto a casos como a controles después de la firma del consentimiento informado, se les tomó una muestra de 24 cc de sangre periférica en tubo con anticoagulante EDTAk3. Los procedimientos realizados desde el contacto de los pacientes o los controles hasta la obtención de los resultados de laboratorio están descritos en la Figura 4.

Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología usada en el estudio.



7.2 TAMIZAJE PARA DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE INFECCIÓN POR VIH

A los controles se les realizó una prueba rápida de infección por HIV utilizando el estuche comercial para un Inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral “ad-bio” (CTK Biotech, Inc, San Diego, CA USA), para corroborar la seronegatividad de los individuos controles. Los resultados de la prueba rápida fueron entregados por escrito a cada participante bajo estricta confidencialidad.

7.3 PRUEBAS DE LABORATORIO

7.3.1 Extracción de células mononucleares de sangre periférica. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante la separación Ficoll (Lymphodex), el cual tiene un pH entre: 7.1 -7.4 y densidad de 1,077-1080 gr/ml. Una vez se obtuvo la separación del gradiente de densidad por centrifugación se recogió con micropipeta la capa de leucocitos que se encuentra por encima del Ficoll y se adicionó en un tubo de Ependorff de 1.5 ml para realizar 2 lavados con solución salina estéril y posteriormente el pellet se utilizó para realizar la extracción de RNA.

7.3.2 Extracción de RNA. Una vez obtenido el pellet de CMSP por el método de Ficoll, este vial se dejó en hielo y se comenzó la extracción de RNA total por el método del Trizol como se describe brevemente: al pellet de CMSP se le adicionó el reactivo comercial Trissure (color Verde) (72), se homogenizó y esta mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, esta incubación permite la completa disociación de los complejos nucleoproteícos; posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo frío y se incubó por 10 minutos, una vez transcurrido este tiempo se centrifugó y se separó la fase superior acuosa incolora que es la de interés ya que es donde se encuentra el RNA. Hasta aquí se siguió el método convencional pero a partir de este momento se realizó un cambio en la técnica adicionando otra técnica

en la cual la purificación del RNA es optimizada utilizando una columna de sílica para obtener RNA de mejor calidad y cantidad (73).

El RNA obtenido se mezcló en relación 1:1 con etanol al 96% y se adicionó en una columna de sílica, se centrifugó y se realizaron lavados. El primer lavado se realizó con Acetato de sodio 3M para eliminar los polisacáridos, pigmentos y proteínas, posteriormente se realizó un segundo lavado con etanol al 70% para eliminar las sales que se encuentren en exceso, se centrifugó e inmediatamente se adicionaron a la columna 10 μ l de una mezcla de DNAsas (Buffer 5x+Dnasas+agua+ribolock); esta columna cargada se incubó a 37 °C por 45 m; una vez culminado este tiempo se realizó un lavado con etanol al 70%. (73). Después se secó la columna por centrifugación máxima por 2 veces. Se adicionó a la columna un tubo colector nuevo y se realizó la elución con agua tratada con DEPC para obtener el RNA total en un volumen final 30 μ l. Este RNA se cuantificó en nanodrop. (Por esta técnica se obtuvieron entre 200 – 700 ng/ μ l de RNA total). El RNA se almacenó a -80 °C.

7.3.3 síntesis de cDNA. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 μ gr de RNA total para una reacción con un volumen final de 20 μ l, según el estuche de retrotranscripción comercial *New England*. Una vez realizada la retrotranscripción se cuantificó el cDNA. A partir de esta concentración se realizaron los cálculos para realizar 3 alícuotas de 30 μ l a una concentración de 100 ng/ μ l para ser utilizadas como fuente de templates para amplificación por PCR. Las alícuotas de trabajo se guardaron a -40 °C.

7.3.4 Ensayos de PCR en tiempo real. La reacción de PCR semicuantitativa se realizó con el kit SSo Advanced Universal SYBR Green Supermix, utilizando 10 microlitros de volumen final, los cebadores se usaron a una concentración de 500 nM y como template 300ng de DNAc; el proceso de qPCR se realizó en el equipo Step One de Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones; 1 minuto de temperatura sostenida de arranque a 95°C, 15 segundos a 95 °C de amplificación y

15 segundos de hibridación a 60°C, se realizaron 40 ciclos, seguidos de un ciclo de temperatura creciente para determinar la curva melting (74). Como control negativo, se realizó NTC que es el control donde se usaron pozos que no contienen muestra sino agua o buffer y cebadores. Para el gen *CB2*, se utilizaron los siguientes cebadores: secuencia sentido, 5-catggaggaatgctgggtgac-3; secuencia anti sentido 5gaggaaggcgatgaacaggag-3. Para el gen de referencia de la β -actina se utilizaron los siguientes cebadores: secuencia sentido, 5'-attgccga-caggatgcagaag-3', secuencia anti sentido, 5'-tagaagcatttgcg-gtggacg-3' (75).

7.4 METODOLOGIA PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis de los resultados se utilizó el método de determinación de los niveles de expresión génica relativa, empleando la fórmula para calcular la relación de la expresión génica relativa del gen de interés con respecto al gen regulador (GED, *Gene Expression's CT Difference*) descrita por Shfe y cols (76). Los datos crudos de la curvas de expresión de la PCR en tiempo real se exportaron del equipo y se procesados con el software LinRegPCR.

El programa LingReg importa los datos sin sustracción de la línea base, luego establece la línea base corregida para cada muestra por separado. Después identifica en cada curva una ventana de linealidad, usando análisis de regresión lineal para determinar la eficiencia de la PCR por muestra a partir de la pendiente de la regresión lineal. Con valores de eficiencia individual (E) y el ciclo umbral (Ct) se procedió a realizar el análisis de cuantificación relativa.

La relación entre las expresiones relativa (rER) del gen de interés (GOI), *CB2* (relativo a β actina) en nuestras muestras de interés, (SOI), es decir, del paciente o del control (relativas a la muestra de referencia, ref, es decir, DNA genómico), donde se divide sobre la eficiencia, multiplicada por housekeeping gene (HKG) ó gen constitutivo en este caso β actina. La fórmula con la que se realiza el cálculo de rER

$$= (1 + E (GOI)) - \Delta CT (GOI) / (1 + E (HKG)) - \Delta CT (HKG)),$$
 donde $\Delta CT (gen) = CT (gen; SOI) - CT (gen; ref)$ y E en este caso, se tomó como la media de todos los valores de E de la PCR para cada gen. De esta manera los niveles de expresión relativa de los receptores CB2 se calcularon como el número de veces que se expresa el gen de interés (CB2) en relación con el gen normalizador en las muestras de los pacientes y los controles. Como espécimen de referencia se utilizó una muestra de DNA genómico de un individuo normal. Se realizaron dos experimentos similares y cada determinación se realizó por triplicado.

Debido a la gran variabilidad y dispersión de los datos, la diferencia entre los niveles de expresión de los receptores CB2 entre el grupo de pacientes y el grupo control y entre los grupos de en pacientes infectados con VIH-1 en diferentes estadios clínicos (infección crónica y estadio de SIDA) se evaluó comparando los promedios de los $\log_{10}$ del nivel de expresión y sus respectivas desviaciones estándar (DS) obtenidos en los dos grupos mediante la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Los análisis de correlación entre los niveles de expresión de los receptores CB2 y los recuentos de LT CD4+ y carga viral se realizaron mediante un análisis de correlación de Pearson utilizando el programa de excel.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

8.1 PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH

Este estudio se llevó a cabo en dos instituciones que brindan asistencia médica a pacientes residentes en el Nororiente Colombiano: El servicio de Infectología del Hospital Universitario de Santander (HUS) a través del jefe del Servicio de Infectología, médico Infectólogo del HUS se accedió a los pacientes; y en la Corporación Milagro y/o Vidamedical, a través del Doctor Marcos Contreras de Viomedical quien gestionó los permisos para acceder a los pacientes. Estas instituciones cuentan con los recursos humanos y la infraestructura necesaria para garantizar las condiciones apropiadas para la atención del tipo de pacientes que participaron en el estudio. Para realizar el estudio se solicitó el aval ético y administrativo de cada institución.

Este estudio de investigación se ha realizado teniendo en cuenta la Declaración de Helsinki promulgada por la Asociación Médica Mundial (AMM), como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

La AMM insta a los involucrados en la investigación médica en seres humanos a adoptar principios que tienen por objetivo velar por la salud, bienestar y derechos del paciente incluidos los que participan en investigación médica, además se tiene en cuenta que el progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos.

Considera además que el propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos,

procedimientos y tratamientos). Considera además que incluso, las mejores intervenciones probadas deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

Aclara también que la investigación en seres humanos está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos protegiendo sus derechos individuales, la salud la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación. Un aspecto de crucial importancia es que estos estudios de investigación en seres humanos deben ser llevados a cabo sólo por personas con la educación, formación y calificaciones científicas y éticas apropiadas. A su vez la investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente, debido a que la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo y los costos para el participante en la investigación.

Este estudio también se realizó teniendo en cuenta los principios éticos básicos de toda investigación médica donde participan seres humanos que son: Autonomía, Justicia, beneficencia y no maleficencia.

Los principios éticos básicos se garantizaron en este estudio en todo momento. El principio de autonomía se cumplió garantizando la libertad que tienen las personas, después de ser invitados hacer parte del estudio, de ejercer su derecho de elección de participar o no en el estudio sin influencia, ni presiones de ninguna índole; respetándoles en todo momento su capacidad de autodeterminación, como personas autónomas.

El principio de beneficencia se cumplió considerando que el estudio se realizó de acuerdo al precepto de actuar directa o indirectamente en beneficio de los

participantes como una obligación moral, en este sentido la motivación última de esta investigación es contribuir a encontrar mejores formas de ayudar a los pacientes infectados por VIH, esto siempre, respetando y en beneficio de los legítimos intereses de los participantes y suprimiendo todo prejuicio que pueda excluir a algún participante de este beneficio o ir en detrimento de éstos.

De igual forma se actuó de acuerdo con el principio de no maleficencia, teniendo en cuenta que este estudio busca el beneficio de los participantes infectados por VIH en general y ha considerado cuidadosamente evitar el incurrir en actos que puedan causar daño o perjudicar innecesariamente a los participantes, y adicionalmente se han considerado acciones concretas para proteger a los participantes contra posibles consecuencias negativas evitables, siendo uno de los puntos más sensibles y delicados a proteger en este estudio, la confidencialidad absoluta de la información. Las consideraciones de este principio van de la mano con los principios de beneficencia y autonomía, para que prevalezca el beneficio sobre posibles efectos negativos de la participación, los cuales pudieran ser efectos negativos derivados de un mal manejo de la confidencialidad de la información sobre el paciente.

El principio de justicia también se mantuvo siempre presente asegurando que todos los participantes fueran tratados como iguales, sin que la buena atención, la consideración y el respeto máximo por cada uno de los participantes se vieran afectadas por conceptos ideológicos, sociales, culturales, económicos raciales, etc. y que los conocimientos que se generen en la investigación, si son de aplicación inmediata, beneficien al grupo de personas participantes o al grupo del cual sean representativos los participantes.

Los procedimientos de recolección y análisis de muestras fueron realizados por un Bacteriólogo entrenado especialmente, quien es la investigadora Karol Patricia Torres Yepes quien tomó las muestras de sangre siguiendo todas las normas de

bioseguridad preestablecidas. Para descartar todo riesgo biológico, después de realizarse las pruebas a las muestras de los participantes, estas se descartaron en contenedores que posteriormente se llevan a la empresa de residuos biológicos EDEPSA con la cual la universidad tiene contrato.

De acuerdo con lo establecido en la Resolución 8430/93 del Ministerio de Salud, en su artículo 11 este estudio se clasifica como investigación con riesgo mínimo ya que pertenece al grupo de “estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran la extracción de sangre por punción venosa en adultos”.

Debido a que para establecer el perfil de expresión de los receptores CB2 se hace necesario la extracción de sangre por punción venosa y considerando que este procedimiento no es altamente invasivo y en la persona solo causa un pequeño malestar debido a la venopunción, teniendo en cuenta además que este procedimiento es realizado por personal profesional y entrenado y el balance costo-beneficio se inclina a favor del paciente, se considera que las posibilidades de afectar negativamente al sujeto no son significativas.

Este estudio se puede enmarcar dentro del modelo casos y control y su objetivo es conocer el perfil de expresión de los receptores de cannabinoides en un grupo de pacientes infectados con VIH y en un grupo control de personas sanas no infectadas. La información obtenida eventualmente se pudiera utilizar para valorar la evolución de los pacientes con esta infección o más adelante, como ya se ha propuesto, por otros grupos, evaluar algún tipo de intervención terapéutica.

8.2 PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRA DE CASO (VIH POSITIVO)

El jefe del Servicio de Infectología en el HUS delego a los Doctores Pedro Martin Ochoa y Santiago Sánchez quienes les hablaron del proyecto de investigación en la consulta externa a los pacientes y les preguntaron acerca de su disponibilidad para participar en el estudio. Los pacientes interesados se incluyeron en un listado y fueron contactados por la investigadora para brindar información adicional sobre el estudio y para obtener la firma del consentimiento informado de quienes decidieron participar. La investigadora realizó, en aquellos pacientes que aceptaron la participación la toma de una muestra de sangre periférica, siguiendo las medidas de bioseguridad correspondientes, en 6 tubos de sangre total con EDTA (4 ml/tubo).

De igual forma los pacientes VIH positivo de la corporación Vidamedical fueron contactados inicialmente por el médico tratante autorizado por el Gerente Doctor Marcos Contreras y se siguió el mismo procedimiento. Posteriormente los datos del participante fueron colectados por el Dr. Steven Fuentes Abreu médico que pertenece al grupo de investigación IMM utilizando un instrumento de recolección de datos clínicos diseñado para el proyecto con fin de obtener información del paciente a través de la revisión de la historia clínica de los pacientes. Los resultados de estas pruebas que arrojen datos relevantes se enviaran al médico tratante.

8.3 PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRA DE CONTROLES (VIH NEGATIVOS)

Los participantes que actuaron como controles, quienes son personas sanas con características similares como edad y sexo, fueron informados sobre el proyecto por la investigadora y a quienes aceptaron participar, después de la firma del consentimiento informado, se les tomó una muestra de sangre siguiendo las medidas de bioseguridad correspondientes, en 6 tubos de sangre total con EDTA (4

ml/tubo), la información se recolectó utilizando el instrumento de recolección de datos diseñado para obtener información de los controles, anexo No.4.

Se garantizó a las personas que participaron en este estudio total confidencialidad con respecto a cualquier información sensible. Para los participantes que son pacientes como los casos se consideró lo citado por la ley estatutaria 1581/2012 que menciona que la información sensible del paciente será conocida solo por el médico tratante sólo si es necesario, es decir información obtenida a lo largo del estudio que pueda ser útil para el manejo del paciente, teniendo en cuenta que el paciente lo autorice previamente y en ningún caso se suministrará información sobre la identidad del paciente a ninguno de los miembros del equipo investigador que no tengan que ver con las actividades asistenciales directas del paciente. Por tal razón, una vez fue codificado el participante, la forma en que se aseguró la confidencialidad de la información fue a través del manejo de la información que tenían los profesionales que manejan los instrumentos de recolección de datos, como ya se mencionó en el procedimiento de toma de muestras para controles, quien obtuvo la información en el instrumento de recolección de datos de los participantes fue el médico Steven Fuentes Abreu que pertenece al grupo de investigación IMM del cual hace parte este proyecto de investigación. Los registros que contienen la información sensible de los participantes del estudio fueron almacenados en un folder del proyecto en la oficina 206, ubicada en el segundo piso correspondiente a ciencias básicas del edificio de administración asignada al profesor Herman José Arteaga tutor de la estudiante de maestría quien realizó el proyecto de investigación. También se almacenó la información digitalmente en bases de datos en el computador ubicado en la oficina del Doctor Arteaga, todo con el fin de salvaguardar de forma segura la información obtenida de los participantes del estudio.

9. RESULTADOS

9.1 DESCRIPCION DE LA POBLACIÓN ESTUDIO

La población de estudio correspondió a pacientes provenientes dos instituciones que atienden diferentes grupos poblacionales como se describen en las Tablas 1 y 3. Los pacientes del HUS son pacientes en estadio avanzado de la infección por VIH es decir fase SIDA, en su mayoría del grupo C y con múltiples comorbilidades propias de su condición. La mayor parte de estos pacientes son del sexo masculino, es decir diecisiete fueron hombres y dos fueron mujeres. Los pacientes de la IPS VIDAMEDICAL están bajo tratamiento, tienen recuentos de linfocitos T CD4+ mayor de 200/ μ l y carga viral controlada y en su mayoría están clasificados en el grupo A, de acuerdo a la clasificación del CDC. En este grupo, doce fueron mujeres y siete fueron hombres. En estos pacientes algunos no presentan comorbilidades y otros presentan comorbilidades como Herpes zoster, hipertrigliceridemia, diabetes tipo 2, pero no comorbilidades tipo SIDA. El rango de edad de los dos tipos de pacientes fue de 18-67 años. En la tabla 2 se caracterizaron los participantes sin VIH (controles) quienes pertenecen a la comunidad universitaria UIS quienes 8 fueron estudiantes y 30 trabajadores, veinticuatro fueron hombres y catorce fueron mujeres, con rango de edades entre 20-69 años, la edad de los controles se escogió de acuerdo a la edad de los casos en un rango de cuatro años por encima de la edad o cuatro años por debajo de la edad de los casos.

Como se muestra en la Figura 5 la población de pacientes se pudo segregar en dos grandes grupos bien definidos un grupo de población con carga viral controlada y recuento de linfocitos TCD4+ por encima de 200/ μ l, en su mayoría provenientes de la IPS Vidamedical y un segundo grupo con cargas virales muy altas, recuento de linfocitos TCD4+ por debajo de 200/ μ l en su mayoría atendidos en el HUS.

Tabla 1. Caracterización de la población de pacientes infectados con VIH (casos) de acuerdo con la institución de donde se reclutaron los participantes.

CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES PARTICIPANTES INFECTADOS CON VIH			
PROCEDENCIA		HUS	IPS* VIDAMEDICAL
NÚMERO DE PARTICIPANTES		19	19
RANGO DE EDAD AÑOS		26-67	18-67
PROMEDIO DE EDAD		46,5	42,5
SEXO	HOMBRE	17 (89,5%)	7 (36,8%)
	MUJER	2(10,5%)	12(63,2%)
PROMEDIO DE CARGA VIRAL **		540,212,063	25,06
DS DE CARGA VIRAL**		959702,36	25,03
PROMEDIO LTCD4+		215	507,53
DS LTCD4+		256,61	223,63

*IPS: Institución prestadora de servicios de salud del sistema de seguridad social colombiano.

** Número de copias de RNA viral por de µl sangre.

Tabla 2. Caracterización de la población de participantes sin VIH (controles).

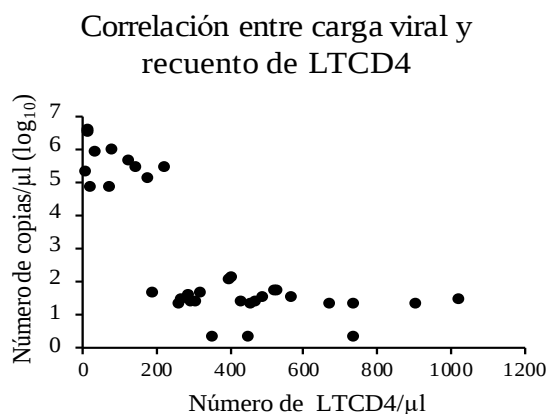
CARACTERIZACIÓN DE PARTICIPANTES SIN VIH CONTROLES		
PROCEDENCIA		COMUNIDAD UIS
ESTUDIANTES		8(21,1%)
TRABAJADORES		30(78,9%)
RANGO DE EDAD AÑOS		20-69
SEXO	HOMBRE	24(63,2%)
	MUJER	14(36,8%)

Tabla 3. Estadio de la enfermedad de los pacientes según el centro de atención médica del cual proceden.

IPS	NÚMERO DE PACIENTES SEGÚN ESTADIO													
	A1		A2		B2		B3		C1		C2		C3	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HUS*	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5,9	1	5,9	15	88,2
VIDAMEDICAL	6	35,2	7	41,2	2	11,8	1	5,9	0	0	2	2	1	5,9

*2 pacientes no tienen clasificación.

Figura 5. Correlación entre carga viral y linfocitos t cd4+ del grupo de pacientes analizados.



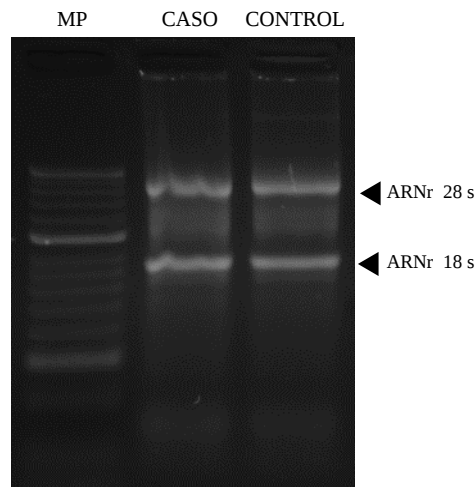
9.2 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE CB2 EN PACIENTES VIH-1 POSITIVOS Y EN INDIVIDUOS SANOS

En la Tabla 4 se indican las concentraciones y la pureza promedio del ARN obtenido de CMSP de los dos grupos de estudio y en la Figura 6 se observa su integridad. La extracción del RNA se realizó por el método de Trizol pero el método fue optimizado mediante una purificación en columnas de sílica y sus resultados se aprecian en la buena concentración, pureza e integridad del RNA obtenido. En la figura 7 se observa una muestra de las electroforesis de los amplicones obtenidos a partir de la reacción de PCR de algunos cDNAs sintetizados a partir del RNA de algunos pacientes e individuos controles. Como se observa en la electroforesis la expresión de CB2 tanto en las CMSP de los pacientes como de los controles es relativamente baja con respecto a la expresión del gen de referencia β -actina.

Tabla 4. Concentraciones y pureza del ARN obtenido a partir de CMSP.

GRUPOS	Promedio de [RNA] ng/ul	280/260
Casos	694,20	2.0
Controles	579,2	2.01

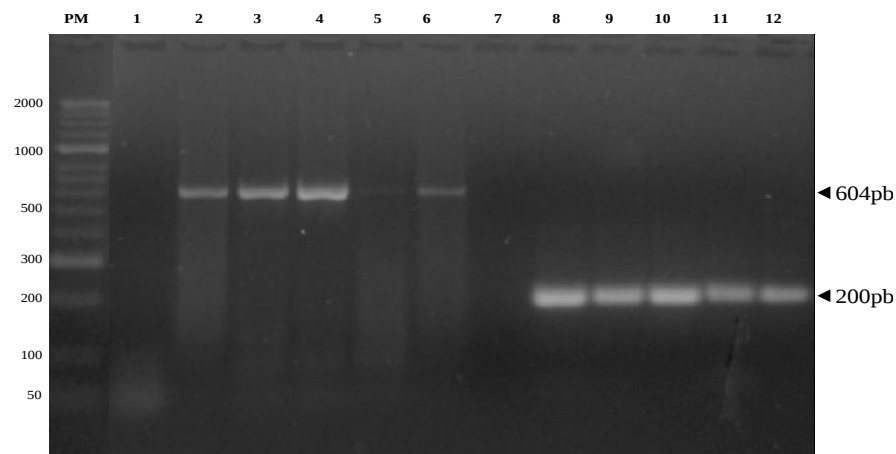
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % de RNA obtenido a partir de cmsp de un paciente (caso) y un individuo control (control).



ARNr: ARN ribosomal de coeficiente de sedimentación de 28 y 18Svedbergs.

MP: marcador de peso molecular de 1 kb

Figura 7. Electroforesis de los amplicones obtenidos de la reacción de PCR de cDNAs sintetizados a partir del RNA de algunos pacientes e individuos control.

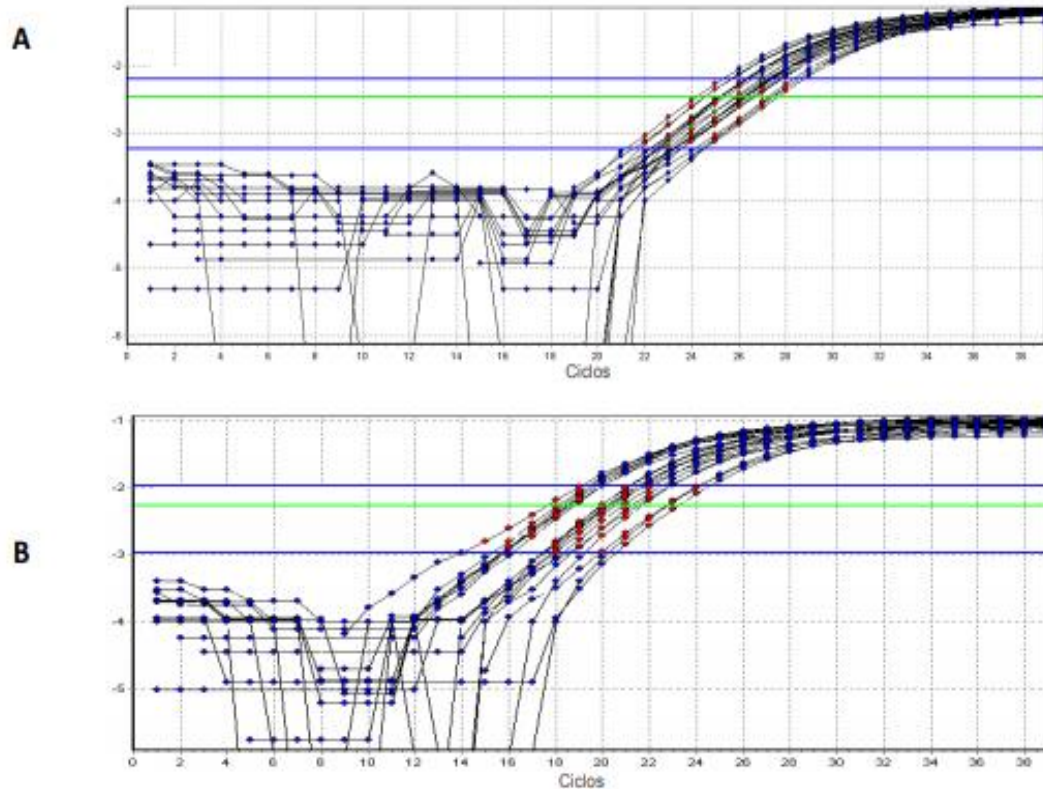


PM: Marcador de peso molecular de 50pb; líneas 1: control negativo; 2: CB2 caso 21; 3: CB2 caso 22, 4: CB2 ADN genómico, 5: CB2 control 2, 6: CB2 control 22, 7: control negativo de β -actina, 8: β -actina caso 21, 9: β -actina caso 22, 10: β -actina ADN genómico; 11: β -actina control 21; 12: β -actina control 22.

Para el análisis de los datos de los resultados de los experimentos de la prueba de PCR en tiempo real, a partir de los datos de fluorescencia obtenidos para cada ciclo, por cada PCR, se determinó mediante el programa LinRegPCR 12148 la lineal basal

(Figura 8) y los valores de eficiencia (E) y ciclo umbral (Ct) para cada muestra (Tabla 5).

Figura 8. Análisis de datos de PCR en tiempo real.



Línea basal (en verde) corregida para las amplificaciones de los genes Cb2 (A) y β -actina (B).

Los valores de E y Ct fueron utilizados para calcular los niveles de expresión del gen CB2 (gen de interés) en relación con el gen β -actina (gen de referencia) en las muestras de los pacientes y los individuos controles. Para calcular los niveles de expresión relativa (rER) se tomó como muestra de referencia interna, para cada plato de PCR, una misma muestra de DNA genómico de un individuo normal y los valores de expresión de CB2 se expresaron como el porcentaje de rER de cada muestra con respecto al promedio de expresión del grupo control.

Tabla 5. Determinaciones de eficiencia (e) y ciclo umbral (ct) para las diferentes muestras.

CB2	X EFICIENCIA	DS E	XCT	DS CT
DNA GENÓMICO	0,89	0,00000	21,853	0,00000
CASO 5	0,98	0,00074	24,493	0,00680
CASO 16	0,97	0,00499	25,612	0,10557
CASO 24	0,98	0,00537	25,647	0,09539
CASO 32	0,96	0,00928	25,382	0,21663
CONTROL 5	0,97	0,00152	23,686	0,01429
CONTROL 16	0,96	0,01482	23,507	0,01145
CONTROL 24	0,97	0,00471	23,869	0,29839
CONTROL 32	0,95	0,00014	24,430	0,05589
BETA ACTINA	X EFICIENCIA	DS E	XCT	DS CT
DNA GENÓMICO	0,88	0,00000	18,841	0,00000
CASO 5	0,99	0,02713	13,747	0,00619
CASO 16	0,96	0,00529	17,061	0,47946
CASO 24	0,93	0,00023	16,313	0,03716
CASO 32	0,95	0,01372	16,212	0,09840
CONTROL 5	0,96	0,01109	14,092	0,58045
CONTROL 16	0,95	0,00436	14,535	0,12914
CONTROL 24	0,95	0,00210	13,618	0,38424
CONTROL 32	0,90	0,03759	13,113	0,50198

X EFICIENCIA: promedio de la eficiencia de las réplicas de cada muestra. DS E: desviación estándar del promedio de la eficiencia. XCT: promedio del ciclo umbral de las réplicas de cada muestra. DS CT: desviación estándar del promedio del ciclo umbral de las réplicas.

La tabla muestra los valores obtenidos para un grupo representativo de la muestra de 4 casos y 4 controles

Los niveles de expresión de CB2 fueron en general más altos en el grupo de pacientes que en los individuos normales. Tanto en el grupo de pacientes como en los controles se observó una gran variabilidad de los valores de rER y una gran dispersión de los datos, siendo la variabilidad mucho más grande en el grupo de los pacientes (tablas 6 y 7). Por lo anterior se decidió realizar la transformación

logarítmica los datos (Figuras 9 A y B). Llama la atención los niveles de sobreexpresión en los casos 3, 10 y 11 con respecto al promedio de los controles.

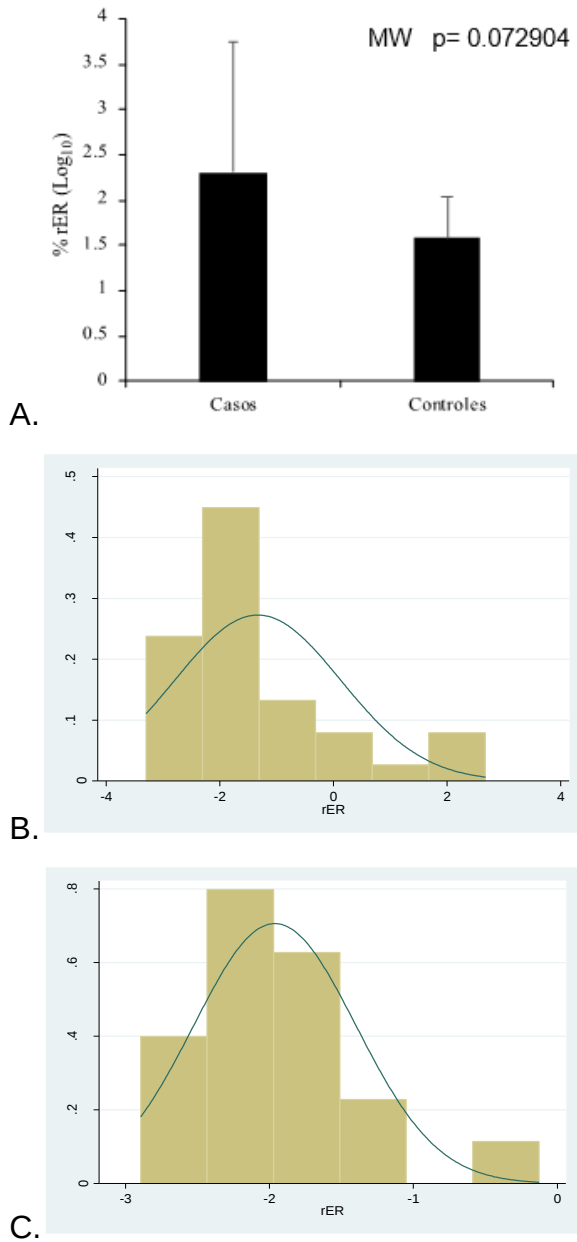
Tabla 6. Niveles de expresión relativa rER del gen cb2 en pacientes infectados por VIH-1.

CASOS	rER	CASOS	rER
RCCAS 1	0,04109508	RCCAS 20	0,01073477
RCCAS 2	0,00286473	RCCAS 21	1,91719789
RCCAS 3	6,7068667	RCCAS 22	166,450851
RCCAS 4	0,00240651	RCCAS 23	0,02041536
RCCAS 5	0,00548891	RCCAS 24	0,00876491
RCCAS 6	0,18026862	RCCAS 25	0,00934675
RCCAS 7	0,00725104	RCCAS 26	0,04007844
RCCAS 8	0,00594741	RCCAS 27	0,62413646
RCCAS 9	0,00050406	RCCAS 28	0,00496481
RCCAS 10	290,730176	RCCAS 29	0,02653832
RCCAS 11	476,016564	RCCAS 30	0,08520788
RCCAS 12	0,00877449	RCCAS 31	0,02131779
RCCAS 13	0,00235344	RCCAS 32	0,01409279
RCCAS 14	0,00588416	RCCAS 33	2,16577131
RCCAS 15	0,00452348	RCCAS 34	0,30786896
RCCAS 16	0,01962069	RCCAS 35	0,18791103
RCCAS 17	0,00439057	RCCAS 36	0,01255332
RCCAS 18	0,00161706	RCCAS 37	0,4829558
RCCAS 19	0,00546344	RCCAS 38	0,00266684

Tabla 7. Niveles de expresión relativa rER del gen cb2 en los individuos del grupo control.

CONTROLES	rER	CONTROLES	rER
RCCON 1	0,00379755	RCCON 20	0,74618486
RCCON 2	0,00203229	RCCON 21	0,00881282
RCCON 3	0,3410269	RCCON 22	0,0098594
RCCON 4	0,0190938	RCCON 23	0,01036078
RCCON 5	0,00955629	RCCON 24	0,00613347
RCCON 6	0,00997039	RCCON 25	0,01409445
RCCON 7	0,03171965	RCCON 26	0,01019006
RCCON 8	0,0157098	RCCON 27	0,01125322
RCCON 9	0,00127481	RCCON 28	0,00404227
RCCON 10	0,01304163	RCCON 29	0,00581872
RCCON 11	0,01196269	RCCON 30	0,06868908
RCCON 12	0,02918084	RCCON 31	0,00312577
RCCON 13	0,03520418	RCCON 32	0,00282867
RCCON 14	0,00905094	RCCON 33	0,01031678
RCCON 15	0,0227633	RCCON 34	0,0062292
RCCON 16	0,01509361	RCCON 35	0,00690004
RCCON 17	0,03603505	RCCON 36	0,01190841
RCCON 18	0,00327235	RCCON 37	0,0013498
RCCON 19	0,01214261	RCCON 38	0,00177461

Figura 9. Niveles de expresión de cb2 en los grupos de pacientes infectados por VIH-1 y en individuos sanos. a) diferencias entre los promedios del $\log_{10}$ del porcentaje expresión relativa de cb2 en los dos grupos de población ($p=0,072$).b) histograma de grupo de casos. c) histograma de grupo control.



Estos tres casos son pacientes del HUS, de sexo masculino y en estadio de SIDA avanzado, C3 según la clasificación del CDC aplicada para la época del diagnóstico (77) y presentan comorbilidades propias del estadio SIDA como histoplasmosis, neumocistosis y criptococosis, respectivamente. Los casos 21,22 y 33 también sobreexpresaron niveles altos de CB2. Estos dos casos son pacientes de la IPS Vidamedical, los casos 21 y 33 son de sexo femenino y el caso 22 es de sexo masculino y los tres pacientes se encuentran en el estadio A2. En la tabla 8 se describen las comorbilidades encontradas en los pacientes con sobreexpresión de CB2.

Tabla 8. Comorbilidades presentes en los pacientes con sobreexpresión de CB2.

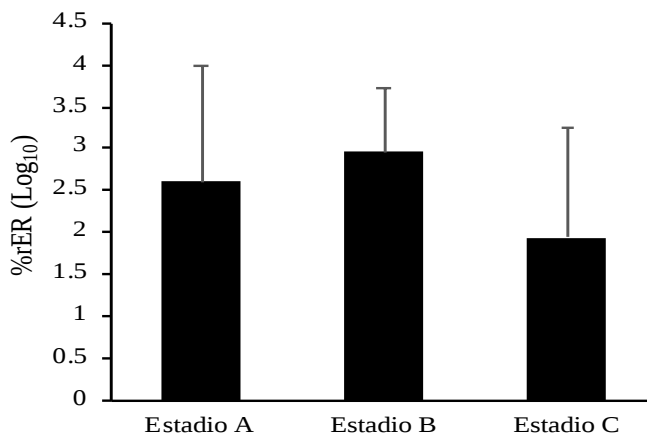
DETALLE	PACIENTES VIH POSITIVO (CASOS) QUE SOBREEXPRESAN CB2					
Participante	RCCAS 3	RCCAS 10	RCCAS 11	RCCAS 21	RCCAS 22	RCCAS 33
Edad	26	58	67	29	55	24
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
Estadio Inicial	C3	No Clasificado (RI)	C3	A2	C2	A2
Estadio Final	C3	No Clasificado (RI)	C3	A2	A2	A2
Tratamiento	No	No	SI	SI	SI	SI
Comorbilidades	Histoplasmosis y Neumocistosis	Hepatitis c	Criptococosis	No	Diabetes tipo 2	No
Carga Viral Inicial copias	SD	<40	9906	15145	SD	11339
Carga Viral Final copias	304841	<40	61417	<20	20	<20
Conteo CD4 Inicial	12	321	76	298	SD	285
Conteo CD4 Final	SD	321	76	459	476	672

A pesar de la gran variabilidad y dispersión de los datos al comparar los niveles de expresión promedio de CB2 utilizando los Log_{10} del porcentaje rER en los dos grupos de población (Figura 9C), se observó un nivel de expresión significativamente más alto el grupo de pacientes (%rER= 2.31117138; SD: 1.436242394) con respecto al grupo control (%rER: 1.588340277; SD: 0.443618892 y $p=0,06$).

9.3 CORRELACIÓN ENTRE LAS CONDICIONES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INFECTADOS POR VIH-1 Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CB2

A pesar de las grandes diferencias observadas en los niveles de linfocito T CD4+, carga viral y comorbilidades entre los pacientes del estadio A y B con respecto a los pacientes del estadio C, no se observó ninguna diferencia significativa de los niveles de expresión de CB2 entre los tres grupos. (Figura 10).

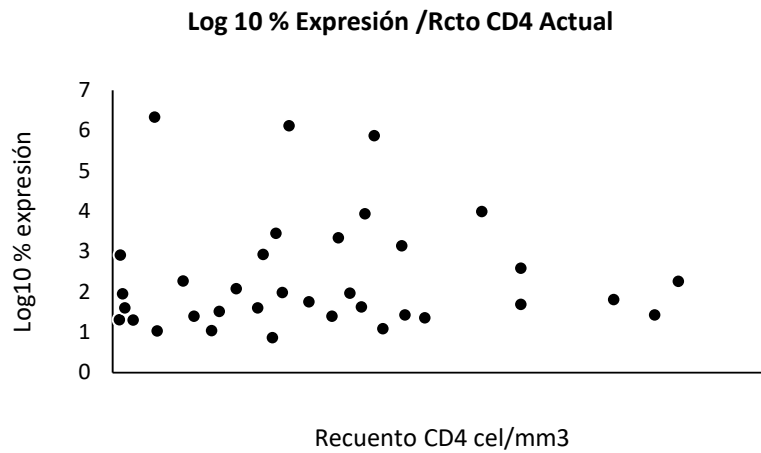
Figura 10. Niveles de expresión de CB2 en pacientes infectados por vih-1, en los distintos estadios de la infección.



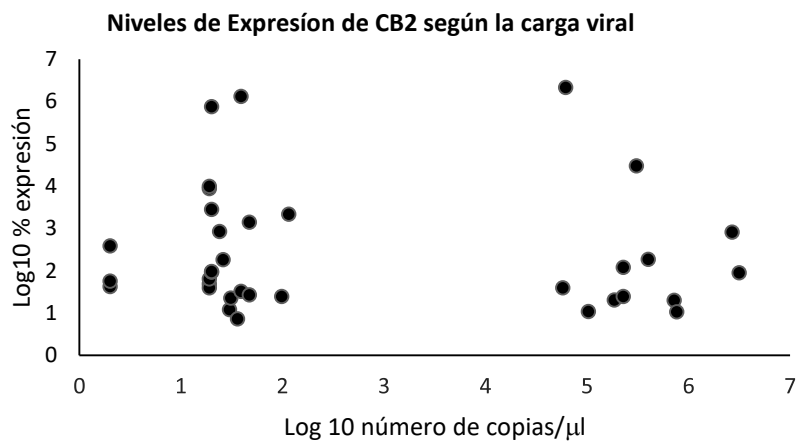
La gráfica muestra el promedio y la DS del Log10 del porcentaje de expresión relativa (rER) de CB2 en CMSP de pacientes infectados con VIH-1 que cursan en los distintos estadios de la fase de SIDA

El análisis de correlación entre los niveles de expresión de CB2 y los recuentos de células T CD4+ o la carga viral no mostraron ninguna correlación (Figuras 11 A y B).

Figura 11. Correlación de los niveles de expresión de CB2 con el recuento de linfocitos t cd4 + y la carga viral.



A. CORRELACIÓN PEARSON: $r=0,01378387$



B. CORRELACIÓN PEARSON: $R=-0,0730029$

El recuento del número de linfocitos T CD4+/ μ l de sangre (A) y el número de copias de RNA viral/ μ l (B) porcentaje de rER de CB2 en CMSP de los pacientes Log₁₀.

10.DISCUSIÓN

Los fitocannabinoides como la marihuana medicinal y análogos de cannabinoides se han explorado desde hace algunos años como tratamientos potenciales para los pacientes infectados con VIH. Una primera aplicación fue el manejo del síndrome constitucional del paciente infectado, debido a los efectos neurológicos de los cannabinoides sobre distintos aspectos de la conducta tales como la anorexia y el estado de ánimo. Los resultados de estos trabajos no han sido concluyentes hasta ahora(78-80).

El sistema de los endocannabinoides es un mecanismo fisiológico antiinflamatorio que inicialmente ha sido caracterizado por su función protectora en condiciones con componente neuroinflamatorio o de tipo neurodegenerativo. Todo esto condujo a la identificación de las funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias del sistema de cannabinoides y a la caracterización de sus mecanismos moleculares. Estudios preliminares sirvieron para proponer el sistema de los endocannabinoides como un blanco terapéutico para el manejo de afecciones con componente neuroinflamatorio (82, 83). Como consecuencia de estas investigaciones el Δ (9)-THC fue aprobado para coadyuvar en el manejo del síndrome constitucional asociado al SIDA. Posteriormente se encontró que los receptores CB2 median su efecto antiinflamatorio a través de vías que inhiben NF- κ B, entre otros mecanismos (85). Adicionalmente se han sintetizado análogos de cannabinoides, algunos de ellos con gran selectividad para CB2, lo cual los hace muy convenientes, por cuanto se evita el efecto neurológico indeseado (86). Con estos análogos se han demostrado adicionalmente un sinnúmero de efectos inmunomoduladores de los cannabinoides (14). Sin embargo, hasta donde conocemos, extrañamente, aún no se han estudiado los perfiles de expresión de los receptores CB2 en CMNSP de los pacientes con infección por VIH-1 y en los distintos estadios del SIDA.

I. Aumento de niveles de expresión de CB2 en pacientes con VIH

En este trabajo hemos evaluado la expresión de los receptores CB2 en CMSP de un grupo relativamente pequeño de pacientes con SIDA y lo hemos comparado con un grupo control de individuos sanos apareados por edad y por sexo. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de expresión del gen CB2 son bastante bajos en la mayoría de los casos sólo se observó la sobreexpresión desproporcionada en seis pacientes, estas diferencias al ser comparadas con el grupo control que no presentó ninguna expresión aumentada, confirma la hipótesis que los pacientes con VIH presentan una expresión más elevadas del CB2 con respecto a individuos sin esta infección.

a) Activación crónica del sistema inmune. En este trabajo Presento evidencia de un incremento en los niveles de expresión de los receptores de cannabinoides tipo 2 en los pacientes infectados con VIH, con una diferencia de $p=0,072$ muy aproximada a el valor de p significativo comparando los niveles expresados en el grupo de casos con el grupo control. Esta diferencia se debe a que este receptor se encuentra activado o sobre-expresado debido a la activación crónica del sistema inmune, como lo han sugerido en sus investigaciones sobre el rol de la inflamación en la progresión y pronóstico de la enfermedad por VIH-1 (21, 22).

b) Aumento del tamaño de la muestra. También se estima que para estudios posteriores se debe aumentar el tamaño de la muestra para que aumentando el poder estadístico los datos las diferencias entre los dos grupos de casos y de controles sean significativas probablemente dada la heterogeneidad de las condiciones clínicas de los pacientes con SIDA, quienes en algunos casos cursan en el momento de la toma de muestra con enfermedades propias de esta condición, la variabilidad y la dispersión de los datos fue extremadamente alta hizo que se realizara un manejo especial de datos para su análisis, como es la transformación logarítmica.

c) CB2 como blancos terapéuticos / uso de agonistas. Con base en estos hallazgos creemos que el uso de receptores CB2 como blancos terapéuticos podría beneficiar los tratamientos con agonistas que actúen selectivamente sobre blancos celulares como lo demostraron experimentalmente *in vitro*, Ramírez S. y col. Ellos demostraron la disminución de la actividad de la transcriptasa reversa en cultivos celulares infectados por VIH, en presencia de un agonista CB2; además inhibió parcialmente la actividad de otras proteínas del gen Pol del VIH sin afectar la expresión de CXCR4 y CCR5 (16). De igual manera Molina P. y cols., demostraron *in vivo*, en un modelo animal (Macacus Rhesus), que la intervención temprana con THC en animales infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Simiano disminuía la concentración del virus en el plasma y la mortalidad temprana, comparado con los primates que no recibieron THC. Todo esto sugiere que la activación de los receptores CB2 inhibe la transcripción viral (17).

d) Regulación negativa de la replicación. En este sentido, los cannabinoides o sus análogos regulan negativamente la replicación del VIH-1 por inhibición de NF- κ B, por lo cual el uso de agonistas podría funcionar como coadyuvante junto a la terapia tradicional, como Perdsidsky et al., (2015) observaron en macrófagos y en endotelio cerebral (18).

II. Se observó mayor expresión de CB2 en pacientes del HUS

Se encontró que los pacientes infectados que tuvieron mayor expresión de CB2, pertenecían al subgrupo del HUS, y que estos presentaban comorbilidad o infecciones concomitantes debido a su avanzado estado en fase SIDA, a diferencia de los pacientes del otro subgrupo de la IPS Vidamedical que son pacientes con la infección por VIH controlada que no presentaban ni comorbilidad, ni concomitancia.

a) Consulta tardía. Creemos que la consulta tardía puede ser la causa de este deterioro en la salud de los pacientes del HUS, aunque reciban toda la atención

médica y el tratamiento por parte del personal de salud, el estado avanzado de la enfermedad condiciona el detrimento acelerado de su condición.

b) Falta de cultura de la prevención. La falta de una cultura preventiva podría ser en parte responsable del estado avanzado de deterioro de los pacientes del HUS, porque en instituciones como la IPS Vidamedical los pacientes se hacen responsables de todo sus controles y su tratamiento al igual que los miembros de la institución que realizan capacitaciones para que tomen conciencia de la importancia de cuidarse.

III. No existe correlación entre expresión y nivel de infección

a) Eficiencia del sistema endocannabinoide. No se observaron correlaciones realizando la prueba estadística de Pearson entre los niveles de expresión de CB2 y carga viral ($r=-0,0730029$) y el recuento de linfocitos T CD4+ ($r= 0,01378387$); todos los pacientes infectados por VIH-1 tuvieron expresión del receptor CB2 sin importar la carga viral o el recuento de linfocitos, esto demuestra en cierta forma la eficiencia del sistema endocannabinoides (81). Aunque en este estudio contamos con dos subgrupos de pacientes bastante diferentes. Los cuales se agrupan claramente por sus niveles de carga viral, recuento de linfocitos T CD4+ y comorbilidades, no se observó correlación entre los niveles de expresión de CB2 y carga viral o recuento de células T CD4+. Es probable que los pacientes en el estadio de SIDA sufran alteraciones profundas en el funcionamiento del sistema de cannabinoides como se ha observado a nivel del sistema nervioso central con el efecto deletéreo sobre este sistema mediado por gp120 sobre las células de la microglia(81).

IV. No se halló diferencia entre los estadios clínicos de los pacientes con VIH

Aunque no se pudieron establecer diferencias entre los distintos estadios clínicos de los pacientes con SIDA con respecto a la expresión del receptor CB2. No obstante, aunque no se pudieron establecer diferencias entre los distintos estadios clínicos de los pacientes con SIDA, llama la atención que se observaron incrementos desproporcionados en la expresión de CB2 en algunos pacientes que cursaban con comorbilidades propias del SIDA durante el momento de la toma de muestra.

a) Tamaño de la muestra. Esto se debe en parte al tamaño de la muestra que fue muy pequeño en términos de poder estadísticos, pero como podrá entenderse conseguir una muestra de pacientes con VIH no es un trabajo fácil y en estudios posteriores se hace evidente para realizar comparaciones estimar un tamaño de muestra más grande.

b) Estado inflamatorio crónico. También podría deberse a que una vez instaurado el virus en el organismo genera en el paciente un estado inflamatorio crónico de base, sin importar el estadio en que se encuentre el paciente incluso independientemente que esté recibiendo terapia antiretroviral(19).

11.CONCLUSIONES

Este trabajo demostró los pacientes con VIH/SIDA tienen niveles de expresión de CB2 incrementados, lo cual es compatible con su condición de pacientes que sufren un proceso de inflamación crónica.

A pesar de la profunda afectación del sistema inmune durante la infección por VIH/SIDA, los pacientes aún conservan las respuestas mediadas por el sistema endocannabinoide, uno de los sistemas antiinflamatorios más eficientes.

Existe la posibilidad de intervenir a estos pacientes a través de este sistema, bien sea mediante la utilización de fitocannabinoides o análogos de cannabinoides sintéticos.

12.RECOMENDACIONES

Se debe tener en cuenta que el tamaño de la muestra debe ser mayor para demostrar que existen diferencias entre los diferentes estadios de la infección por VIH.

La posibilidad de que los niveles de expresión de CB2 pudieran utilizarse como un marcador pronóstico requiere explorarse más ampliamente, probablemente estudiando también pacientes infectados que cursen distintos estadios de la fase crónica.

Se hace necesario realizar estudios de cohorte que permitan el seguimiento de los pacientes con VIH desde el momento que ingresan a la institución de salud, con el fin de clasificarlos, medir la expresión de receptores CB2, además de observar la progresión con el tratamiento convencional.

Se podrían realizar mediciones de otros marcadores inflamatorios que puedan predecir el progreso del estado inflamatorio crónico del paciente y estos hallazgos ser correlacionados con los niveles del receptor CB2 para la evaluación de la evolución del paciente con VIH.

REFERENCIAS

1. HIV/AIDS JUNPo. UNAIDS DATA 2017.
2. Costo Fcda. Situación del VIH en Colombia 2016: Cuenta de Alto Costo, Fondo Colombiano de Alto Costo. Republica de Colombia Ministerio de salud y protección social; 2017.
3. Caicedo Higuera Patricia EdEdodsp. Informe EPIDEMIOLOGICO de Santander. Informe. Secretaria de Salud de Santander; 2011 Octubre-Diciembre
4. Palmisano L, Vella S. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 2011;47(1):44-8.
5. Chun TW, Justement JS, Murray D, Hallahan CW, Maenza J, Collier AC, et al. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS (London, England)*. 2010;24(18):2803-8.
6. Ngo-Giang-Huong N, Deveau C, Da Silva I, Pellegrin I, Venet A, Harzic M, et al. Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)*. 2001;15(6):665-73.
7. Choi JY, Kwon OK, Choi BS, Kee MK, Park M, Kim SS. The prevalence of antiretroviral multidrug resistance in highly active antiretroviral therapy-treated patients with HIV/AIDS between 2004 and 2009 in South Korea. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;60(2):154-60.
8. Edagwa BJ, Zhou T, McMillan JM, Liu X-M, Gendelman HE. Development of HIV Reservoir Targeted Long Acting Nanoformulated Antiretroviral Therapies. *Current medicinal chemistry*. 2014;21(36):4186-98.
9. Cao S, Woodrow KA. Nanotechnology approaches to eradicating HIV reservoirs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018.
10. Pitman MC, Lau JSY, McMahon JH, Lewin SR. Barriers and strategies to achieve a cure for HIV. *The lancet HIV*. 2018;5(6):e317-e28.

11. Gao Y, McKay PF, Mann JFS. Advances in HIV-1 Vaccine Development. *Viruses*. 2018;10(4).
12. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine*. 2013;31(35):3502-18.
13. Sengupta S, Siliciano RF. Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity*. 2018;48(5):872-95.
14. Rom S, Persidsky Y. Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2013;8(3):608-20.
15. Yu L, Mohanram V, Simonson OE, Smith CI, Spetz AL, Mohamed AJ. Proteasome inhibitors block HIV-1 replication by affecting both cellular and viral targets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(1):100-5.
16. Ramirez SH, Reichenbach NL, Fan S, Rom S, Merkel SF, Wang X, et al. Attenuation of HIV-1 replication in macrophages by cannabinoid receptor 2 agonists. *Journal of leukocyte biology*. 2013;93(5):801-10.
17. Molina PE, Winsauer P, Zhang P, Walker E, Birke L, Amedee A, et al. Cannabinoid administration attenuates the progression of simian immunodeficiency virus. *AIDS research and human retroviruses*. 2011;27(6):585-92.
18. Persidsky Y, Fan S, Dykstra H, Reichenbach NL, Rom S, Ramirez SH. Activation of Cannabinoid Type Two Receptors (CB2) Diminish Inflammatory Responses in Macrophages and Brain Endothelium. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2015;10(2):302-8.
19. Wada NI, Jacobson LP, Margolick JB, Breen EC, Macatangay B, Penugonda S, et al. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *AIDS (London, England)*. 2015;29(4):463-71.

20. Ashton JC, Wright JL, McPartland JM, Tyndall JD. Cannabinoid CB1 and CB2 receptor ligand specificity and the development of CB2-selective agonists. *Current medicinal chemistry*. 2008;15(14):1428-43.
21. Ipp H, Zemlin AE, Erasmus RT, Glashoff RH. Role of inflammation in HIV-1 disease progression and prognosis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2014;51(2):98-111.
22. Alemu A, Shiferaw Y, Addis Z, Mathewos B, Birhan W. Effect of malaria on HIV/AIDS transmission and progression. *Parasites & vectors*. 2013;6:18.
23. Mingyan Y, Xinyong L, De Clercq E. NF-kappaB: the inducible factors of HIV-1 transcription and their inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2009;9(1):60-9.
24. Di Marzo V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends in pharmacological sciences*. 2006;27(3):134-40.
25. Grotenhermen F, Muller-Vahl K. The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Deutsches Arzteblatt international*. 2012;109(29-30):495-501.
26. Kogan NM, Mechoulam R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2007;9(4):413-30.
27. Turcotte C, Blanchet M-R, Laviolette M, Flamand N. The CB(2) receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(23):4449-70.
28. Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1995;232(1):54-61.
29. Graham ES, Ashton JC, Glass M. Cannabinoid receptors: a brief history and "what's hot". *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2009;14:944-57.
30. Basavarajappa BS. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein and peptide letters*. 2007;14(3):237-46.

31. Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *Journal of neuroendocrinology*. 2008;20 Suppl 1:10-4.
32. Alexander SP, Kendall DA. The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *British journal of pharmacology*. 2007;152(5):602-23.
33. Malfitano AM, Basu S, Maresz K, Bifulco M, Dittel BN. What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). *Seminars in immunology*. 2014;26(5):369-79.
34. Basu S, Dittel BN. Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunologic research*. 2011;51(1):26-38.
35. Prather P. CB2 Cannabinoid Receptors: Molecular, Signaling, and Trafficking Properties. In: Köfalvi A, editor. *Cannabinoids and the Brain*: Springer US; 2008. p. 75-90.
36. Miller AM, Stella N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *British journal of pharmacology*. 2008;153(2):299-308.
37. Mechoulam R, Gaoni Y. A TOTAL SYNTHESIS OF DL-DELTA-1-TETRAHYDROCANNABINOL, THE ACTIVE CONSTITUENT OF HASHISH. *Journal of the American Chemical Society*. 1965;87:3273-5.
38. Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 2004;47 Suppl 1:345-58.
39. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*. 2002;54(2):161-202.
40. Castaneto MS, Gorelick DA, Desrosiers NA, Hartman RL, Pirard S, Huestis MA. Synthetic cannabinoids: epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and alcohol dependence*. 2014;144:12-41.
41. Singh UP, Singh NP, Singh B, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Cannabinoid receptor-2 (CB2) agonist ameliorates colitis in IL-10(-/-) mice by

- attenuating the activation of T cells and promoting their apoptosis. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012;258(2):256-67.
42. Gianella-Borradori M, Christou I, Bataille CJ, Cross RL, Wynne GM, Greaves DR, et al. Ligand-based virtual screening identifies a family of selective cannabinoid receptor 2 agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2015;23(1):241-63.
 43. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(6):780-7.
 44. Ekouevi DK, Tchounga BK, Coffie PA, Tegbe J, Anderson AM, Gottlieb GS, et al. Antiretroviral therapy response among HIV-2 infected patients: a systematic review. *BMC infectious diseases*. 2014;14:461.
 45. Pandori MW, Westheimer E, Gay C, Moss N, Fu J, Hightow-Weidman LB, et al. The Multispot rapid HIV-1/HIV-2 differentiation assay is comparable with the Western blot and an immunofluorescence assay at confirming HIV infection in a prospective study in three regions of the United States. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;58 Suppl 1:e92-6.
 46. Younai FS. Thirty years of the human immunodeficiency virus epidemic and beyond. *International journal of oral science*. 2013;5(4):191-9.
 47. J RG. Genes and Genome of HIV-1. *Phylogen Evolution Biol* 2014;2:126.
 48. Ward AB, Wilson IA. Insights into the trimeric HIV-1 envelope glycoprotein structure. *Trends in biochemical sciences*. 2015;40(2):101-7.
 49. Wu Z, Alexandratos J, Ericksen B, Lubkowski J, Gallo RC, Lu W. Total chemical synthesis of N-myristoylated HIV-1 matrix protein p17: structural and mechanistic implications of p17 myristoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(32):11587-92.
 50. Mascarenhas AP, Musier-Forsyth K. The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors. *The FEBS journal*. 2009;276(21):6118-27.

51. Anton H, Taha N, Boutant E, Richert L, Khatter H, Klaholz B, et al. Investigating the cellular distribution and interactions of HIV-1 nucleocapsid protein by quantitative fluorescence microscopy. *PloS one*. 2015;10(2):e0116921.
52. Das K, Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. *Current opinion in virology*. 2013;3(2):111-8.
53. Das K, Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 2. *Current opinion in virology*. 2013;3(2):119-28.
54. Moir Susan CMySFA, Mandell Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. (Two Volume Set) 7th Edition. p. 1693-710. .
55. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological reviews*. 1993;57(1):183-289.
56. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(8):a006866.
57. Melikyan GB. HIV entry: a game of hide-and-fuse? *Current opinion in virology*. 2014;4:1-7.
58. Fassati A. Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus research*. 2012;170(1-2):15-24.
59. Fassati A. HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem. *Retrovirology*. 2006;3:74.
60. Hill AL, Rosenbloom DI. Predicting the outcomes of treatment to eradicate the latent reservoir for HIV-1. 2014;111(37):13475-80.
61. Chun HM, Carpenter RJ, Macalino GE, Crum-Cianflone NF. The Role of Sexually Transmitted Infections in HIV-1 Progression: A Comprehensive Review of the Literature. *Journal of sexually transmitted diseases*. 2013;2013:176459.
62. Nyamweya S, Townend J, Zaman A, Steele SJ, Jeffries D, Rowland-Jones S, et al. Are Plasma Biomarkers of Immune Activation Predictive of HIV Progression: A Longitudinal Comparison and Analyses in HIV-1 and HIV-2 Infections? *PloS one*. 2012;7(9):e44411.

63. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS (London, England)*. 2003;17(13):1881-8.
64. de Carvalho AP, Dutra LC, Tonelli E. [Influenza vaccination in HIV infected children: immunologic and viral load changes]. *Jornal de pediatria*. 2003;79(1):29-40.
65. Day JH, Grant AD, Fielding KL, Morris L, Moloi V, Charalambous S, et al. Does tuberculosis increase HIV load? *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(9):1677-84.
66. Srivastava SK, Ramana KV. Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. *Experimental eye research*. 2009;88(1):2-3.
67. Orange JS, May MJ. Cell penetrating peptide inhibitors of nuclear factor-kappa B. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(22):3564-91.
68. Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, Kawahara K, Yamaji K, et al. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. *FEBS letters*. 2006;580(2):613-9.
69. Costantino CM, Gupta A, Yewdall AW, Dale BM, Devi LA, Chen BK. Cannabinoid receptor 2-mediated attenuation of CXCR4-tropic HIV infection in primary CD4+ T cells. *PloS one*. 2012;7(3):e33961.
70. Gorantla S, Makarov E, Roy D, Finke-Dwyer J, Murrin LC, Gendelman HE, et al. Immunoregulation of a CB2 receptor agonist in a murine model of neuroAIDS. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2010;5(3):456-68.
71. Gunthard HF, Aberg JA, Eron JJ, Hoy JF, Telenti A, Benson CA, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Jama*. 2014;312(4):410-25.
72. Liu X, Harada S. RNA isolation from mammalian samples. *Current protocols in molecular biology*. 2013;Chapter 4:Unit 4.16.

73. Yaffe H, Buxdorf K, Shapira I, Ein-Gedi S, Moyal-Ben Zvi M, Fridman E, et al. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC research notes*. 2012;5:45.
74. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Hasko G, Liaudet L, Huffman JW, et al. CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293(4):H2210-8.
75. Nong L, Newton C, Cheng Q, Friedman H, Roth MD, Klein TW. Altered cannabinoid receptor mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from marijuana smokers. *Journal of neuroimmunology*. 2002;127(1-2):169-76.
76. Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2006;84(11):901-10.
77. Vajpayee M, Kaushik S, Sreenivas V, Wig N, Seth P. CDC staging based on absolute CD4 count and CD4 percentage in an HIV-1-infected Indian population: treatment implications. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(3):485-90.
78. Haney M. Effects of smoked marijuana in healthy and HIV + marijuana smokers. *Journal of clinical pharmacology*. 2002;42(S1):34s-40s.
79. Nunez A, Nunez C, Corsi O, Rada G. Are cannabinoids effective for HIV wasting syndrome? *Medwave*. 2017;17(9):e7107.
80. Lutge EE, Gray A, Siegfried N. The medical use of cannabis for reducing morbidity and mortality in patients with HIV/AIDS. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013(4):Cd005175.
81. Kim HJ, Shin AH, Thayer SA. Activation of cannabinoid type 2 receptors inhibits HIV-1 envelope glycoprotein gp120-induced synapse loss. *Mol Pharmacol*. 2011;80(3):357-66.

82. Bari M, Rapino C, Mozetic P, Maccarrone M. The endocannabinoid system in gp120-mediated insults and HIV-associated dementia. *Exp Neurol*. 2010;224(1):74-84.
83. Persidsky Y, Ho W, Ramirez SH, Potula R, Abood ME, Unterwald E, et al. HIV-1 infection and alcohol abuse: neurocognitive impairment, mechanisms of neurodegeneration and therapeutic interventions. *Brain Behav Immun*. 2011;25 Suppl 1:S61-70.
84. McKallip RJ, Lombard C, Martin BR, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;302(2):451-65.
85. Panikashvili D, Mechoulam R, Beni SM, Alexandrovich A, Shohami E. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(4):477-84.
86. Console-Bram L, Marcu J, Abood ME. Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;38(1):4-15.

BIBLIOGRAFÍA

ALEMU, Abebe, *et al.* Effect Of Malaria On Hiv/Aids Transmission And Progression. *Parasit Vectors* 6, 2013. p.18. Doi: 10.1186/1756-3305-6-18.

ALEXANDER, Steve, And Kendall D.A. The Complications Of Promiscuity: Endocannabinoid Action And Metabolism. *Br J Pharmacol* 152 (5), 2007. p.602-23. Doi: 10.1038/Sj.Bjp.0707456.

ANTON, Halina, *et al.* Investigating The Cellular Distribution And Interactions Of Hiv-1 Nucleocapsid Protein By Quantitative Fluorescence Microscopy. *Plos One* 10 (2):E0116921, 2015. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0116921.

ASHTON, John C, *et al.* Cannabinoid Cb1 And Cb2 Receptor Ligand Specificity And The Development Of Cb2-Selective Agonists. *Curr Med Chem* 15 (14), 2008. p.1428-43.

BARI, Monica, *et al.* The Endocannabinoid System In Gp120-Mediated Insults And Hiv-Associated Dementia. *Exp Neurol* 224 (1), 2010. p.74-84. Doi: 10.1016/J.Expneurol.2010.03.025.

BASAVARAJAPPA, Balapal S. Critical Enzymes Involved In Endocannabinoid Metabolism. *Protein Pept Lett* 14 (3), 2007. p.237-46.

BASU, Sreemanti y DITTEL, Bonnie N. Unraveling The Complexities Of Cannabinoid Receptor 2 (Cb2) Immune Regulation In Health And Disease. *Immunol Res* 51 (1), 2011.p.26-38. Doi: 10.1007/S12026-011-8210-5.

BENNET, Jhon E; DOLIN, Raphael y BLASER, Martin. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases. 7 Ed., 2009. p. 1693-710.

CAICEDO HIGUERA, Patricia. Informe Epidemiologico De Santander. Secretaria De Salud De Santander. Equipo De Epidemiologia Del Observatorio De Salud Pùblica. 2011.

CAMPBELL-YESUFU, Omobolaji T. y GANDHI, Rajesh T. Update On Human Immunodeficiency Virus (Hiv)-2 Infection. Clin Infect Dis 52 (6), 2011. p.780-7. Doi: 10.1093/Cid/Ciq248.

CAO, Shijie y WOODROW, Kim A. Nanotechnology Approaches To Eradicating Hiv Reservoirs. European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.002>.

CASTANETO, Marisol S, G *et al.* Synthetic Cannabinoids: Epidemiology, Pharmacodynamics, And Clinical Implications. Drug Alcohol Depend 144, 2014. p.12-41. Doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005.

CHOI, Ju-Yeon, *et al.* The Prevalence Of Antiretroviral Multidrug Resistance In Highly Active Antiretroviral Therapy-Treated Patients With Hiv/Aids Between 2004 And 2009 In South Korea. J Clin Virol 60 (2), 2014. p.154-60. Doi: 10.1016/j.jcv.2014.02.004.

CHUN, Helen M, *et al.* The Role Of Sexually Transmitted Infections In Hiv-1 Progression: A Comprehensive Review Of The Literature. Journal Of Sexually Transmitted Diseases, 2013. Doi: 10.1155/2013/176459.

CHUN, Tae-Wook, *et al.* Rebound Of Plasma Viremia Following Cessation Of Antiretroviral Therapy Despite Profoundly Low Levels Of Hiv Reservoir: Implications For Eradication. Aids 24 (18), 2010. p.2803-8. Doi: 10.1097/Qad.0b013e328340a239.

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Fondo Colombiano de Alto Costo. Situación Del Vih En Colombia 2016, 2017.

CONSOLE-BRAM, Linda; MARCU, Jahan y ABOOD, Mary E. Cannabinoid Receptors:Nomenclature And Pharmacological Principles.Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 38 (1), 2012. p.4-15. Doi: 10.1016/J.Pnpbp.2012.02.009.

COSTANTINO, Maria Cristina, *et al.* Cannabinoid Receptor 2-Mediated Attenuation Of Cxcr4-Tropic Hiv Infection In Primary Cd4+ T Cells. Plos One 7 (3), 2012. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0033961.

DAS, Kalyan y ARNOLD, Eddy. Hiv-1 Reverse Transcriptase And Antiviral Drug Resistance. Part 1.Curr Opin Virol 3 (2), 2013. p.111-8. Doi: 10.1016/J.Coviro.2013.03.012.

_____. _____. Part 2. Curr Opin Virol 3 (2), 2013. p.119-28. Doi: 10.1016/J.Coviro.2013.03.014.

DAY John H, *et al.* Does Tuberculosis Increase Hiv Load? J Infect Dis 190 (9), 2004. p.1677-84. Doi: 10.1086/424851.

DE CARVALHO, Aroldo P., Dutra Luiz Carlos, And Tonelli Edward. [Influenza Vaccination In Hiv Infected Children: Immunologic And Viral Load Changes]. J Pediatr (Rio J) 79 (1), 2003. p.29-40.

DI MARZO, Vincenzo. A Brief History Of Cannabinoid And Endocannabinoid Pharmacology As Inspired By The Work Of British Scientists. Trends Pharmacol Sci 27 (3), 2006. p.134-40. Doi: 10.1016/J.Tips.2006.01.010.

EDAGWA, Benson J, *et al.* Development Of Hiv Reservoir Targeted Long Acting Nanoformulated Antiretroviral Therapies. *Current Medicinal Chemistry* 21 (36), 2014. p.4186-4198.

EKOUEVI, Didier K., *et al.* Antiretroviral Therapy Response Among Hiv-2 Infected Patients: A Systematic Review. *Bmc Infect Dis* 14, 2014. p.461. Doi: 10.1186/1471-2334-14-461.

ESPARZA, José. 2013. A Brief History Of The Global Effort To Develop A Preventive Hiv Vaccine. *Vaccine* 31 (35):3502-18. Doi: 10.1016/J.Vaccine.2013.05.018.

FASSATI, Ariberto. Hiv Infection Of Non-Dividing Cells: A Divisive Problem. *Retrovirology* 3, 2006. p.74. Doi: 10.1186/1742-4690-3-74.

_____. Multiple Roles Of The Capsid Protein In The Early Steps Of Hiv-1 Infection. *Virus Res* 170 (1-2), 2012. p.15-24. Doi: 10.1016/J.Virusres.2012.09.012.

GALIEGUE, Sylvaine, *et al.* Expression Of Central And Peripheral Cannabinoid Receptors In Human Immune Tissues And Leukocyte Subpopulations. *Eur J Biochem* 232 (1), 1995. p.54-61.

GAO, Yong; MCKAY, Paul F. y MANN, Jamie F. S. Advances In Hiv-1 Vaccine Development. *Viruses* 10 (4), 2018. Doi: 10.3390/V10040167.

GIANELLA-BORRADORI, Matteo, *et al.* Ligand-Based Virtual Screening Identifies A Family Of Selective Cannabinoid Receptor 2 Agonists. *Bioorg Med Chem* 23 (1), 2015. p.241-63. Doi: 10.1016/J.Bmc.2014.11.002.

GORANTLA, Santhi, *et al.* Immunoregulation Of A Cb2 Receptor Agonist In A Murine Model Of Neuroaids. *J Neuroimmune Pharmacol* 5 (3), 2010. p.456-68. Doi: 10.1007/S11481-010-9225-8.

GRAHAM, Euan Scott; ASHTON, John Clive y GLASS, Michelle. Cannabinoid Receptors: A Brief History And What's Hot. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 2009. p.944-57.

GROTENHERMEN, Franjo y MULLER-VAHL, Kirsten. The Therapeutic Potential Of Cannabis And Cannabinoids. *Dtsch Arztebl Int* 109 (29-30), 2012.. p.495-501. Doi: 10.3238/Arztebl.2012.0495.

GUNTARD, Huldrych F., *et al.* Antiretroviral Treatment Of Adult Hiv Infection: 2014 Recommendations Of The International Antiviral Society-Usa Panel. *Jama* 312 (4), 2014. p.410-25. Doi: 10.1001/Jama.2014.8722.

HANEY, Margaret. Effects Of Smoked Marijuana In Healthy And Hiv + Marijuana Smokers. *J Clin Pharmacol* 42 (S1), 2002. p.34s-40s.

HAZENBERG, Mette. D., *et al.* Persistent Immune Activation In Hiv-1 Infection Is Associated With Progression To Aids. *Aids* 17 (13), 2003. p.1881-8. Doi: 10.1097/01.Aids.0000076311.76477.6e.

HILL, Alison L., *et al.* Predicting The Outcomes Of Treatment To Eradicate The Latent Reservoir For Hiv-1. *111* (37), 2014. p.13475-80. Doi: 10.1073/Pnas.1406663111.

HOWLETT, Allyn C., *et al.* International Union Of Pharmacology. Xxvii. Classification Of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* 54 (2), 2002. p.161-202.

HOWLETT, Allyn C., *et al.* Cannabinoid Physiology And Pharmacology: 30 Years Of Progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 2004. p.345-58. Doi: 10.1016/J.Neuropharm.2004.07.030.

IPP, Hayley, *et al.* Role Of Inflammation In Hiv-1 Disease Progression And Prognosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 51 (2), 2014. p.98-111. Doi: 10.3109/10408363.2013.865702.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON. Hiv/Aids, 2017. Unaids Data.

KIM, Hee Jung; SHIN, Angela H. y THAYER, Stanley. Activation Of Cannabinoid Type 2 Receptors Inhibits Hiv-1 Envelope Glycoprotein Gp120-Induced Synapse Loss. *Mol Pharmacol* 80 (3), 2011. p.357-66. Doi: 10.1124/Mol.111.071647.

KOGAN, Natalya M. y MECHOULAM, Raphael. Cannabinoids In Health And Disease. *Dialogues Clin Neurosci* 9 (4), 2007. p.413-30.

LEVY, Jay A. Pathogenesis Of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiological Reviews* 57 (1), 1993. p.183-289.

LIU, Ximeng Y HARADA, Shuko. Rna Isolation From Mammalian Samples. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 4:Unit 4, 2013. p.16. Doi: 10.1002/0471142727.Mb0416s103.

LUTGE, Elizabeth E.; GRAY, Andy y SIEGFRIED, Nandi. The Medical Use Of Cannabis For Reducing Morbidity And Mortality In Patients With Hiv/Aids. *Cochrane Database Syst Rev* (4), 2013. Doi: 10.1002/14651858.Cd005175.Pub3.

MACKIE, Ken. Cannabinoid Receptors: Where They Are And What They Do. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1, 2008. p.10-4. Doi: 10.1111/J.1365-2826.2008.01671.

MALFITANO, Anna Maria, *et al.* What We Know And Do Not Know About The Cannabinoid Receptor 2 (Cb2). *Semin Immunol* 26 (5), 2014. p.369-79. Doi: 10.1016/J.Smim.2014.04.002.

MASCARENHAS, Anjali P. y MUSIER-FORSYTH, Karin. The Capsid Protein Of Human Immunodeficiency Virus: Interactions Of Hiv-1 Capsid With Host Protein Factors. *Febs J* 276 (21), 2009. p.6118-27. Doi: 10.1111/J.1742-4658.2009.07315.X.

MECHOULAM, Raphael y GAONI Y. A Total Synthesis Of DI-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, The Active Constituent Of Hashish. *J Am Chem Soc* 87, 1965. p.3273-5.

MELIKYAN, Gregory. B. Hiv Entry: A Game Of Hide-And-Fuse? *Curr Opin Virol* 4, 2014. p.1-7. Doi: 10.1016/J.Coviro.2013.09.004.

MILLER, Aaron y STELLA, Nephi. Cb2 Receptor-Mediated Migration Of Immune Cells: It Can Go Either Way. *Br J Pharmacol* 153 (2), 2008. p.299-308. Doi: 10.1038/Sj.Bjp.0707523.

MINGYAN, Yu; XINYONG, Liu y DE CLERCQ, Erik. Nf-Kappab: The Inducible Factors Of Hiv-1 Transcription And Their Inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 9 (1), 2009. p.60-9.

MOLINA, Patricia E., *et al.* Cannabinoid Administration Attenuates The Progression Of Simian Immunodeficiency Virus. *Aids Res Hum Retroviruses* 27 (6), 2011. p.585-92. Doi: 10.1089/Aid.2010.0218.

NAKAJIMA, Yumiko, *et al.* Endocannabinoid, Anandamide In Gingival Tissue Regulates The Periodontal Inflammation Through Nf-KappaB Pathway Inhibition. *Febs Lett* 580 (2), 2006. p.613-9. Doi: 10.1016/J.Febslet.2005.12.079.

NGO-GIANG-HUONG, Nicole, *et al.* Proviral Hiv-1 Dna In Subjects Followed Since Primary Hiv-1 Infection Who Suppress Plasma Viral Load After One Year Of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Aids* 15 (6), 2001. p.665-73.

NONG, Liang, *et al.* Altered Cannabinoid Receptor Mrna Expression In Peripheral Blood Mononuclear Cells From Marijuana Smokers. *J Neuroimmunol* 127 (1-2) 2002. p.169-76.

NUÑEZ, Alejandra, *et al.* Are Cannabinoids Effective For Hiv Wasting Syndrome? *Medwave* 17 (9), 2017. Doi: 10.5867/Medwave.2017.09.7107.

NYAMWEYA, Samuel, Are Plasma Biomarkers Of Immune Activation Predictive Of Hiv Progression: A Longitudinal Comparison And Analyses In Hiv-1 And Hiv-2 Infections? *Plos One* 7 (9), 2012. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0044411.

ORANGE, Jordan S. y MAY, Michael J. Cell Penetrating Peptide Inhibitors Of Nuclear Factor-Kappa B. *Cell Mol Life Sci* 65 (22), 2008. p.3564-91. Doi: 10.1007/S00018-008-8222-Z.

PALMISANO, Lucia y VELLA, Stefano. A Brief History Of Antiretroviral Therapy Of Hiv Infection: Success And Challenges. *Ann Ist Super Sanita* 47 (1), 2011. p.44-8. Doi: 10.4415/Ann_11_01_10.

PANDORI, Mark W., *et al.* The Multispot Rapid Hiv-1/Hiv-2 Differentiation Assay Is Comparable With The Western Blot And An Immunofluorescence Assay At

Confirming Hiv Infection In A Prospective Study In Three Regions Of The United States. J Clin Virol 58 Suppl 1, 2013. Doi: 10.1016/J.Jcv.2013.10.006.

PANIKASHVILI, David, *et al.* Cb1 Cannabinoid Receptors Are Involved In Neuroprotection Via Nf-Kappa B Inhibition. J Cereb Blood Flow Metab 25 (4), 2005. p.477-84. Doi: 10.1038/Sj.Jcbfm.9600047.

PERSIDSKY, Yuri, *et al.* Hiv-1 Infection And Alcohol Abuse: Neurocognitive Impairment, Mechanisms Of Neurodegeneration And Therapeutic Interventions. Brain Behav Immun 25 Suppl 1, 2011. p.S61-70. Doi: 10.1016/J.Bbi.2011.03.001.

PERSIDSKY, Yuri, *et al.* Activation Of Cannabinoid Type Two Receptors (Cb2) Diminish Inflammatory Responses In Macrophages And Brain Endothelium. J Neuroimmune Pharmacol 10 (2), 2015. p.302-8. Doi: 10.1007/S11481-015-9591-3.

PITMAN, Matthew C., *et al.* Barriers And Strategies To Achieve A Cure For Hiv. Lancet Hiv 5 (6), 2018. p.E317-E328. Doi: 10.1016/S2352-3018(18)30039-0.

RAJARAPU, Gangadher. Genes And Genome Of Hiv-1. Phylogen Evolution Biol 2, 2014. p.126. Doi: Doi: 10.4172/2329-9002.1000126.

RAJESH, Mohanraj, *et al.* Cb2-Receptor Stimulation Attenuates Tnf-Alpha-Induced Human Endothelial Cell Activation, Transendothelial Migration Of Monocytes, And Monocyte-Endothelial Adhesion. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293 (4), 2007. p.H2210-8. Doi: 10.1152/Ajpheart.00688.2007.

RAMIREZ, Servio H., *et al.* Attenuation Of Hiv-1 Replication In Macrophages By Cannabinoid Receptor 2 Agonists. J Leukoc Biol 93 (5), 2013. p.801-10. Doi: 10.1189/Jlb.1012523.

ROM, Slava y PERSIDSKY, Yuri. Cannabinoid Receptor 2: Potential Role In Immunomodulation And Neuroinflammation. J Neuroimmune Pharmacol 8 (3), 2013. p.608-20. Doi: 10.1007/S11481-013-9445-9.

SCHEFE, Jan H., *et al.* Quantitative Real-Time Rt-Pcr Data Analysis: Current Concepts And The Novel Gene Expression's Ct Difference Formula. J Mol Med (Berl) 84 (11), 2006. p.901-10. Doi: 10.1007/S00109-006-0097-6.

SENGUPTA, Srana y SILICIANO, Robert F. Targeting The Latent Reservoir For Hiv-1. Immunity 48 (5), 2018. p.872-895. Doi: 10.1016/J.Immuni.2018.04.030.

SINGH, Udai P., *et al.* Cannabinoid Receptor-2 (Cb2) Agonist Ameliorates Colitis In Il-10(-/-) Mice By Attenuating The Activation Of T Cells And Promoting Their Apoptosis. Toxicol Appl Pharmacol 258 (2), 2012. p.256-67. Doi: 10.1016/J.Taap.2011.11.005.

SRIVASTAVA, Satish K. y RAMANA, Kota V. Focus On Molecules: Nuclear Factor-Kappab. Exp Eye Res 88 (1), 2009. p.2-3. Doi: 10.1016/J.Exer.2008.03.012.

TURCOTTE, Caroline, *et al.* The Cb(2) Receptor And Its Role As A Regulator Of Inflammation. Cellular And Molecular Life Sciences 73 (23), 2016. p.4449-4470. Doi: 10.1007/S00018-016-2300-4.

VAJPAYEE, Madhu, *et al.* Cdc Staging Based On Absolute Cd4 Count And Cd4 Percentage In An Hiv-1-Infected Indian Population: Treatment Implications. Clin Exp Immunol 141 (3), 2005. p.485-90. Doi: 10.1111/J.1365-2249.2005.02857.X.

WADA, Nikolas Itaru, *et al.* The Effect Of Haart-Induced Hiv Suppression On Circulating Markers Of Inflammation And Immune Activation. Aids 29 (4), 2015. p.463-71. Doi: 10.1097/Qad.0000000000000545.

WARD, Andrew B. y WILSON, Ian A. Insights Into The Trimeric Hiv-1 Envelope Glycoprotein Structure. *Trends Biochem Sci* 40 (2), 2015. p.101-7. Doi: 10.1016/J.Tibs.2014.12.006.

WILEN, Craig B.; TILTON, John C. y DOMS, Robert W. Hiv: Cell Binding And Entry. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine* 2 (8), 2012. Doi: 10.1101/Cshperspect.A006866.

WU, Zhibin, *et al.* Total Chemical Synthesis Of N-Myristoylated Hiv-1 Matrix Protein P17: Structural And Mechanistic Implications Of P17 Myristoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (32), 2004. p.11587-92. Doi: 10.1073/Pnas.0404649101.

YAFFE, Hila, *et al.* Logspin: A Simple, Economical And Fast Method For Rna Isolation From Infected Or Healthy Plants And Other Eukaryotic Tissues. *Bmc Res Notes* 5, 2012. p.45. Doi: 10.1186/1756-0500-5-45.

YOUNAI, Fariba S. Thirty Years Of The Human Immunodeficiency Virus Epidemic And Beyond. *Int J Oral Sci* 5 (4), 2013. p.191-9. Doi: 10.1038/Ijos.2013.76.

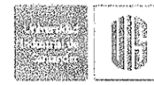
YU, Liang, *et al.* Proteasome Inhibitors Block Hiv-1 Replication By Affecting Both Cellular And Viral Targets. *Biochem Biophys Res Commun* 385 (1), 2009. p.100-5. Doi: 10.1016/J.Bbrc.2009.04.156.

ANEXOS

Anexo A. Aprobación por los comités de ética. Declaración de consentimiento informado para la participación en el estudio.



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER (UIS)
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
COMITÉ DE ÉTICA
10 DIC 2016
[Firma]

Versión N° 3

Código del participante: _____

Este estudio se realizara tanto en personas portadoras del VIH quienes serán los casos y en personas sanas que no son portadoras del VIH con las mismas características de edad y sexo de los casos quienes serán llamados controles.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH

El presente estudio tiene como objetivo determinar si en las células de la sangre de las personas infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, también llamado VIH hay mayor cantidad de unas sustancias denominadas receptores de cannabinoides que en las células de aquellas personas que no tienen la infección. Además queremos saber si la cantidad de estas sustancias tiene alguna relación con el hecho de recibir tratamiento antirretroviral.

Nuestro interés en realizar esta investigación se debe a que en algunos estudios realizados anteriormente se ha descrito que estas sustancias llamadas receptores de cannabinoides, se unen a otras sustancias que produce nuestro organismo, llamadas cannabinoides y estas últimas pueden hacer que el VIH se multiplique menos dentro de las células de las personas infectadas. Por tal razón queremos saber si los receptores de cannabinoides se encuentran aumentadas en las células sanguíneas de las personas infectadas con VIH y si al tratar con cannabinoides las células de personas infectadas con VIH se podría reducir la multiplicación del virus.



Para realizar este estudio necesitamos la participación de personas infectadas con VIH y personas sanas. A todas las personas que participen en este estudio se les medirá la cantidad de receptores de cannabinoides que están presentes en las células de la sangre.

Este estudio de investigación se ha preparado teniendo en cuenta los principios éticos básicos de toda investigación en la que participan seres humanos. Teniendo en cuenta que estos principios son: Autonomía, Justicia, beneficencia, y no maleficencia.

Queremos invitarlo a participar de nuestro estudio. Para esto solo se le tomará una muestra de sangre, lo cual no representa ningún riesgo y solo en escasas oportunidades si hay alguna ligera dificultad en la toma de la muestra, se le formará un pequeño “moretón” que desaparecerá días después.

Adicionalmente un miembro de nuestro grupo de investigación registrará en una encuesta datos sobre su residencia, estrato, nivel educativo, estado de salud actual y/o enfermedades previas, conductas sexuales e información sobre tratamiento antirretroviral si es el caso; contando con la autorización del participante. Toda esta información es absolutamente confidencial.

Si tiene alguna duda con respecto a los procedimientos por favor háganosla saber. La participación es voluntaria por lo cual en cualquier momento se podrá retirar del estudio, sin que esto impida que usted pueda continuar con la atención médica o tratamiento que viene recibiendo. Se guardará la privacidad absoluta de los datos de acuerdo a la ley estatutaria 1581 de 2012 del Congreso de Colombia. Su identidad solo será conocida por su médico tratante, y no se suministrará ninguna información sobre su identidad personal a ningún miembro del equipo de investigación y las muestras serán marcadas únicamente con un número. Es importante resaltar que en este estudio se asegura la



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER (UIS)
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS



confidencialidad de la información por parte de los profesionales que manejan los instrumentos de recolección de datos y la información de datos médicos.

Quien obtendrá a través de entrevista con el participante la información del instrumento de recolección de datos será médico Steven Abreu quien pertenece al grupo de investigación IMM al cual pertenece este proyecto de investigación. Y la persona que diligenciara el consentimiento informado y marcara codificando las muestras es la bacterióloga Karol Patricia Torres Yepes investigadora del proyecto y miembro del grupo de investigación, estos dos profesionales son quienes tienen la responsabilidad de salvaguardar toda la información que se recolecte.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
COMITÉ DE ÉTICA
Carolina Torres Yepes
16 DIC 2016

Quien participe en este estudio no recibirá ninguna retribución económica, sin embargo la participación de las personas que participen como controles es que sus resultados sirven para realizar una comparación con respecto a los de los casos (pacientes infectados con VIH) y de esta forma contribuirán con la investigación médica y se espera que con los resultados del estudio se favorezca y ayude a mejorar la calidad de vida de la población general infectada con VIH

Entiendo lo anteriormente explicado y acepto voluntariamente la participación en el estudio de investigación y estoy de acuerdo que después de realizar las pruebas a mi sangre la muestra sea descartada por la empresa de residuos biológicos que los miembros del estudio determinen, además autorizo el potencial uso de los datos que se obtengan en este estudio en futuras investigaciones, previa aprobación del comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander; en constancia,

Yo, _____ de _____

Con CC _____ de _____ Firma _____



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER (UIS)
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS



Fecha _____

Nombre del testigo I

cc

Firma

INVESTIGADOR/SUBINVESTIGADOR O PERSONA que toma el consentimiento informado

Yo confirmo que personalmente expliqué la naturaleza y el propósito del presente consentimiento, y por tanto certifico que la persona que firma este consentimiento entiende la naturaleza, beneficios y riesgos de participar en este estudio y que su firma es válida. Ningún problema médico o barrera de lenguaje o educación se ha interpuesto en el entendimiento de este documento.

Nombre

Firma

Fecha

En caso de alguna duda favor contactar a: Investigadora: Karol Patricia Torres Yepes al teléfono 6344000 Ext. 3401 – 3175357051 ó a el Doctor Herman José Arteaga al teléfono 6344000 Ext. 3401. Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) UIS. Contacto: 6344000-Extension: 3808.

Anexo B. Instrumento para recolección de datos de los sujetos (casos) VIH positivos que conforman parte del estudio.

DATOS DE IDENTIFICACION DEL PACIENTE CASO										
RCCAS – NUM NOMBRE - ID										
EDAD										
SEXO										
RAZA										
RESIDENCIA										
DATOS SOCIOECONOMICOS										
OCUPACION										
ESTADO DE SALUD ACTUAL										
DIAGNOSTICOS ACTUALES										
EXAMEN FISICO										
SIGNOS VITALES	FC:	FR:	TA:	T°:	SAT:					
CABEZA Y CUELLO										
TORAX										
ABDOMEN										
EXTREMIDADES										
NEUROLOGICO										
PIEL										
PARACLINICOS ACTUALES (< 1 SEMANA)										
HEMOGRAMA										
UROANALISIS										
PCR										
FUNCION RENAL										
FUNCION HEPATICA										
OTROS:										
ANTECEDENTES										
TRANSFUCIONALES										
HEMOCLASIF.										
CONSUMO DE SUSTANCIAS	TIPO	INICIO	FREC	ULT DOSIS						
	NO	NO	NO	NO						
COINFECCION CON VIRUS CRONICO										
ESTADO SEROLOGICO ACTUAL										
TIEMPO INFECCION										
CLASIF VIH/SIDA	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	DESC
CARGA VIRAL										
CONTEO CD4 +										

TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL			
FECHA DE INICIO PRIMER TTO			
A PRESENTADO SUSP. TEMPORAL			
# ESQUEMAS USADOS FECHA			
ESQUEMA ACTUAL	FARMACO	DOSIS	TIEMPO
TOMA DE MUESTRA			
AYUNO	NO		
LUGAR	HUS		

ENTREVISTA REALIZADA POR: FERNANDO STEVEN FUENTES ABREU MD
UIS RM 1098752704

REVISION DE HC REALIZADA POR: FERNANDO STEVEN FUENTES ABREU
MD UIS RM 1098752704

TOMA DE MUESTRA REALIZADA POR: KAROL PATRICIA TORRES YEPES
BACT UIS RP 10307/2001

FECHA: _____

Anexo C. Instrumento para recolección de datos de los sujetos (controles) que conforman el estudio.

DATOS DE IDENTIFICACION DEL PARTICIPANTE CONTROL					
RCCON- NUM NOMBRE - ID					
EDAD					
SEXO					
RAZA					
RESIDENCIA					
DATOS SOCIOECONOMICOS					
OCUPACION					
ESTADO DE SALUD ACTUAL					
DIAGNOSTICOS ACTUALES					
EXAMEN FISICO					
SIGNOS VITALES	FC:	FR:	TA:	T°:	SAT:
CABEZA Y CUELLO					
TORAX					
ABDOMEN					
EXTREMIDADES					
NEUROLOGICO					
PIEL					
PARACLINICOS ACTUALES (< 1 SEMANA)					
HEMOGRAMA					
UROANALISIS					
PCR					
FUNCION RENAL					
FUNCION HEPATICA					
OTROS:					
ANTECEDENTES					
TRANSFUCIONALES					
HEMOCLASIF.					
CONSUMO SUSTANCIAS	DE	TIPO	INICIO	FREC	ULT DOSIS
		NO	NO	NO	NO
COINFECCION CON VIRUS CRONICO					
TOMA DE MUESTRA					
AYUNO	NO				
LUGAR	HUS				

Anexo D. Consentimiento informado para la realización prueba rápida diagnóstica de VIH.

Fecha: _____

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA REALIZAR LA PRUEBA PRESUNTIVA O
DIAGNOSTICA DE VIH**

Yo, _____, certifico que he leído, o que se me ha leído el documento sobre Consentimiento Informado que contiene información sobre el propósito y beneficio de la prueba, su interpretación, sus limitaciones y su riesgo, y que entiendo su contenido, incluyendo las limitaciones, beneficios y riesgos de la prueba.

He recibido consejería PRE-TEST (actividad realizada por un profesional de la salud para prepararme y confrontarme con relación a mis conocimientos, prácticas y conductas, antes de realizarme las pruebas diagnósticas).

También certifico que dicha persona me brindó la asesoría y que según su compromiso, de ella también recibiré una asesoría posprueba (procedimiento mediante el cual me entregarán mis resultados) y que estoy de acuerdo con el proceso.

Entiendo que la toma de muestra es voluntaria y que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento antes de que me sea tomado el examen. Fui informado de las medidas que se tomarán para proteger la confidencialidad de mis resultados.

Acepta realizarse la prueba presuntiva o diagnóstica de VIH: SI: _____ NO: _____

Firma de quien da el consentimiento

Nombre: _____
Cédula de Ciudadanía No. _____ de _____
Edad: _____ Teléfono: _____

Firma y RM del Profesional que Realizó la Consejería

Anexo E. Formato de reporte de resultado de la prueba rápida para diagnóstico de VIH.

FECHA: _____

NOMBRE: _____

IDENTIFICACION: _____ EDAD: _____

PRUEBA RAPIDA HIV 1/2 ad-bio

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Inmunoensayo Cromatográfico de flujo lateral

RESULTADO:

KAROL PATRICIA TORRES YEPES
BACTERIOLOGA Y LABORATORISTA CLINICO
REGISTRO: 10307/2001