

Figura 27. Frecuencia de genotipos de CCR5 en el grupo de estudio y grupos control.

5.5.3 Genotipificación de los Polimorfismos de los Genes que Codifican para la Apolipoproteína E

El ADN genómico de cada caso y de cada control se obtuvo a partir de leucocitos aislados de sangre periférica utilizando el procedimiento que previamente se ha indicado. Se evaluó la calidad y pureza de cada muestra de ADN genómico obtenido de los sujetos que integraron toda nuestra población en estudio, y posteriormente se amplificó el gen que codifica para la Apolipoproteína E mediante el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). De esta amplificación obtuvimos un producto amplificado de 227 pb (Figura 28.).

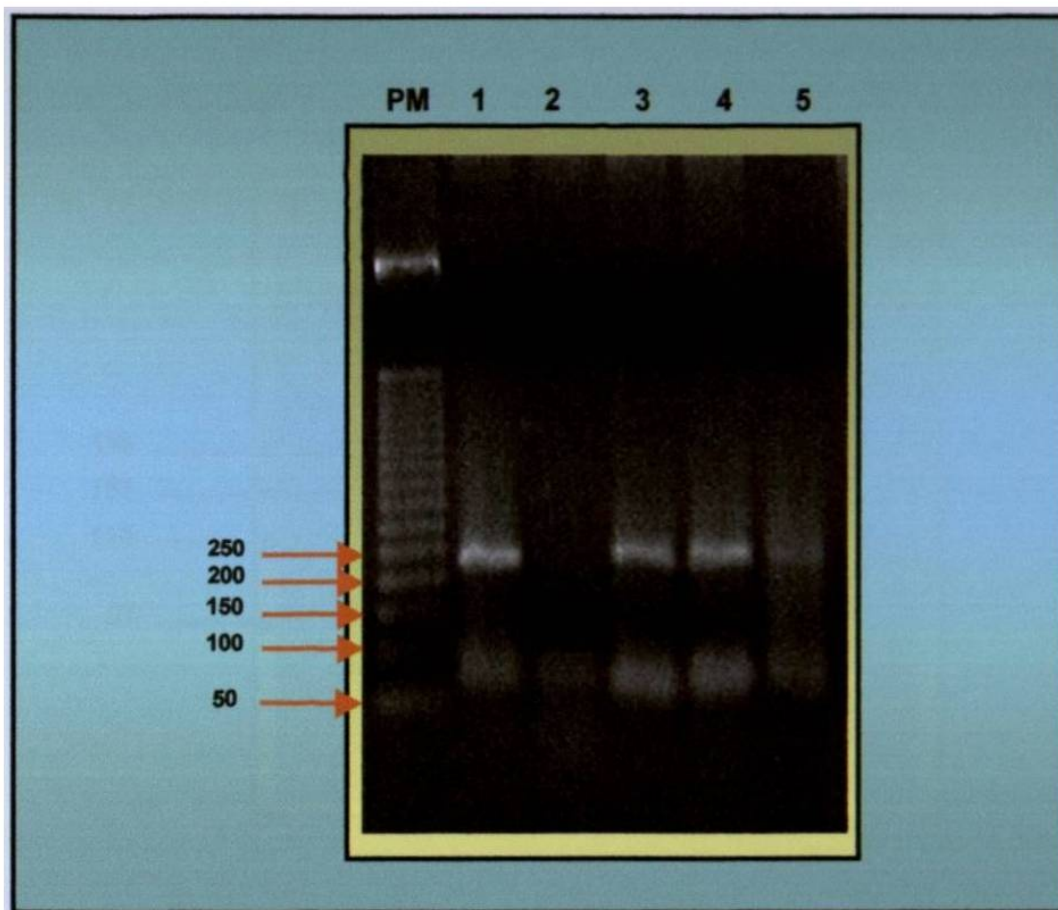


Figura 28. Electroforesis de productos de amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E. En la figura: PM = Marcador de Peso Molecular, 1 = Muestra 1, 2 = Blanco, 3 = Muestra 2, 4 = Muestra 3, 5 = Muestra 4

5.5.3.1 Detección de los Polimorfismos del Gen que Codifica para la Apolipoproteína E

Los productos que obtuvimos de la amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E, fueron digeridos durante 3 horas a 37 °C con la enzima de restricción *Hha I*. Posteriormente los productos de digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3 % con el fin de poder identificar cada uno de los polimorfismos que presenta este gen (Figura 29.).

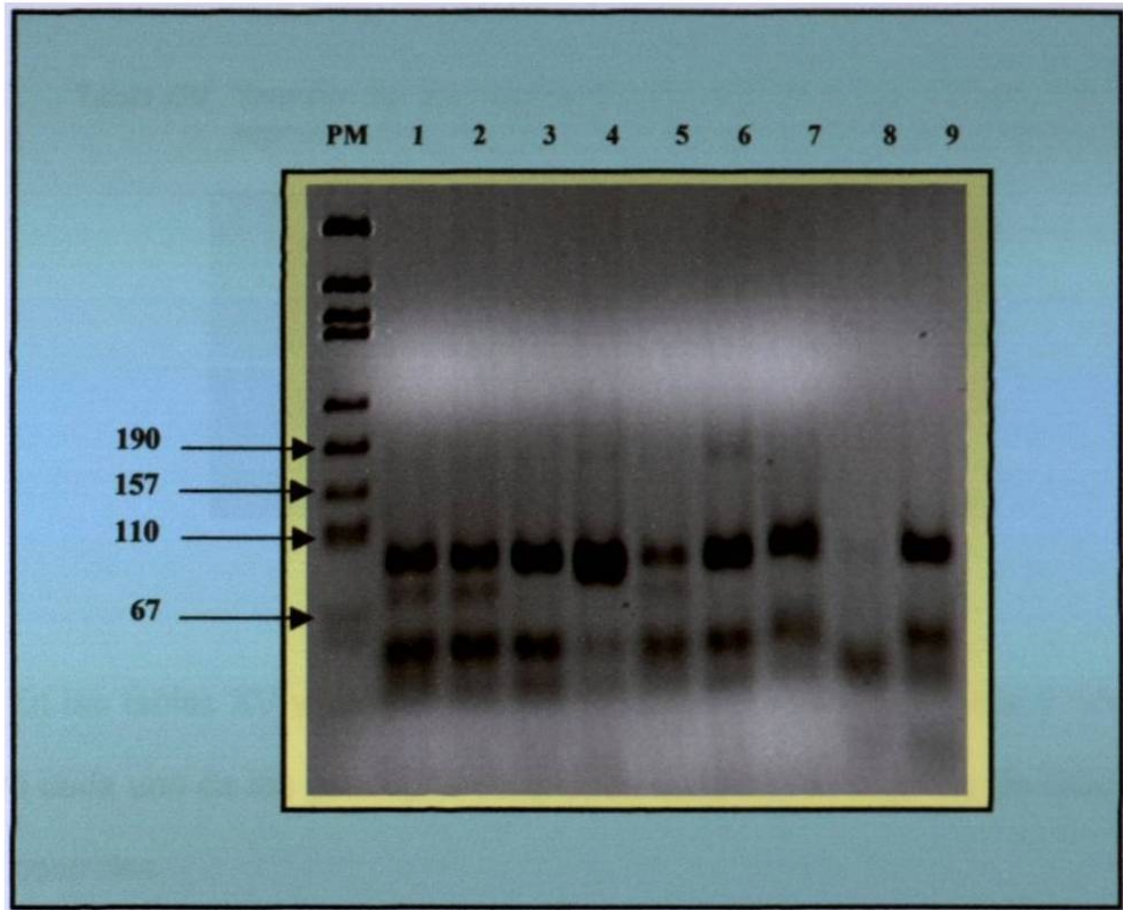


Figura 29. Electroforesis de la digestión de productos de amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E. En la figura: PM = Marcador de Peso Molecular, 1 = Muestra 1, 2 = Muestra 2, 3 = Muestra 3, 4 = Muestra 4, 5 = Muestra 5, 6 = Muestra 6, 7 = Muestra 7, 8 = Muestra 8, 9 = Muestra 9

La digestión de los productos amplificados del gen que codifica para Apo E con la enzima de restricción *Hha I*, genera un patrón de bandas de diferentes tamaños, que integran el mapa de restricción de los tres principales alelos E2, E3 y E4 del gen que codifica para la Apolipoproteína E. Este mapa de restricción se muestra a continuación (Tabla XIV):

Tabla XIV Tamaño de los fragmentos de restricción con enzima *Hha I* esperados de la digestión del producto amplificado del gen de Apo E

ALELO	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS ESPERADOS DE LA DIGESTIÓN CON <i>Hha I</i> (pb)
E2	16, 18, 21, 81, 91
E3	16, 18, 21, 33, 48, 91
E4	16, 18, 19, 21, 33, 48, 72

En las tablas XV y XVI se presentan las frecuencias, absolutas y relativas, para cada uno de los genotipos del gen de la Apo E en el grupo de casos y en los controles.

Como se puede observar en la tabla siguiente (Tabla XV) el alelo más frecuente encontrado en cada grupo que se integró para nuestro estudio es: el alelo E4 se encuentra en el 84 % de los sujetos que integran el grupo de estudio VIH-1 +/VHC -; el alelo E4 se encuentra en el 75 % de los pacientes coinfectados por VIH-1 +/VHC +; el alelo más frecuente en los sujetos con monoimfección por VHC es el E3 (92.23 %); y el alelo más frecuente en el grupo de los sujetos que integran el grupo control sin ninguna infección es el E3 (87.09 %).

Tabla XV Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la apolipoproteína E encontrada en los diferentes grupo de estudio.

GRUPO DE ESTUDIO	GENOTIPO DE APO E	POBLACIÓN QUE LO PRESENTA f (%)	DISTRIBUCIÓN DE ALELOS	POBLACIÓN QUE LO PRESENTA f (%)
VIH-1 +/ VHC - n = 62	E2 / E2	1 (2 %)	Homocigoto ϵ 2	1 (2 %)
	E2 / E3	4 (5 %)	Heterocigoto ϵ 2	20 (32 %)
	E2 / E4	16 (25 %)	Homocigoto ϵ 3	5 (8 %)
	E3 / E3	5 (9 %)	Heterocigoto ϵ 3	32 (51 %)
	E3 / E4	28 (48 %)	Homocigoto ϵ 4	8 (13 %)
	E4 / E4	8 (11 %)	Heterocigoto ϵ 4	44 (71 %)
VIH-1 +/ VHC + n = 8	E2 / E2	0 (0 %)	Homocigoto ϵ 2	0 (0 %)
	E2 / E3	1 (12.5 %)	Heterocigoto ϵ 2	3 (37.5 %)
	E2 / E4	2 (25 %)	Homocigoto ϵ 3	1 (12.5 %)
	E3 / E3	1 (12.5 %)	Heterocigoto ϵ 3	3 (37.5 %)
	E3 / E4	2 (25 %)	Homocigoto ϵ 4	2 (25 %)
	E4 / E4	2 (25 %)	Heterocigoto ϵ 4	4 (50 %)
VIH-1 -/ VHC + n = 13	E2 / E2	0 (0 %)	Homocigoto ϵ 2	0 (0 %)
	E2 / E3	0 (0 %)	Heterocigoto ϵ 2	1 (7.69 %)
	E2 / E4	1 (7.69 %)	Homocigoto ϵ 3	3 (23 %)
	E3 / E3	3 (23.07 %)	Heterocigoto ϵ 3	9 (69.23 %)
	E3 / E4	9 (69.23 %)	Homocigoto ϵ 4	0 (0 %)
	E4 / E4	0 (0 %)	Heterocigoto ϵ 4	10 (76.92 %)
VIH-1 -/ VHC - n = 62	E2 / E2	1 (1.61 %)	Homocigoto ϵ 2	1 (1.61 %)
	E2 / E3	7 (11.29 %)	Heterocigoto ϵ 2	13 (20.96 %)
	E2 / E4	6 (9.67 %)	Homocigoto ϵ 3	4 (6.45 %)
	E3 / E3	4 (6.45 %)	Heterocigoto ϵ 3	50 (80.64 %)
	E3 / E4	43 (69.35 %)	Homocigoto ϵ 4	1 (1.61 %)
	E4 / E4	1 (1.61 %)	Heterocigoto ϵ 4	49 (79.03 %)

En todos los grupos de estudio , el genotipo que presento mayor frecuencia es el E3/E4. En el grupo de casos (VIH-1 +/VHC -) el genotipo E2/E4 (25 %) marco la diferencia con respecto al grupo control; en el caso de los sujetos coinfectados, los genotipos E2/E4 (25 %) y E4/E4 (25 %) establecieron los

elementos característicos, mientras que en las personas con mono infección por VHC el genotipo E3/E3 señaló la diferencia de grupo.

Tabla XVI. Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de estudio y grupos control.

GENOTIPO	Frecuencia (%)			
	VIH-1 -/VHC- n = 62	VIH-1 +/VHC- n = 62	VIH-1 -/VHC+ n = 13	VIH-1 +/VHC+ n = 8
E2 / E2	2	2	0	0
E2 / E3	11	5	0	12.5
E2 / E4	10	25	8	25
E3 / E3	6	9	23	12.5
E3 / E4	69	48	69	25
E4 / E4	2	11	0	25
Total	100	100	100	100

5.6 Correlación de los Hallazgos Moleculares con la Presencia de la Coinfección en Relación al Grupo de Sujetos Infeccionados Únicamente con VIH-1, al Grupo Infeccionado con VHC o con el Grupo de Sujetos que no están Infeccionados con Ninguno de los dos Virus.

5.6.1 Asociación de CCR5 e Infección por VIH-1 y/o VHC

Todos los sujetos VIH-1 positivos presentaron el genotipo CCR5 +/+. Al realizar el análisis de asociación entre la infección por VIH-1 y los genotipos del correceptor CCR5, se estableció la susceptibilidad de el genotipo CCR5 +/+ a esta infección ($p < 0.05$); sin embargo no se pudo obtener una correlación con la resistencia a la infección.

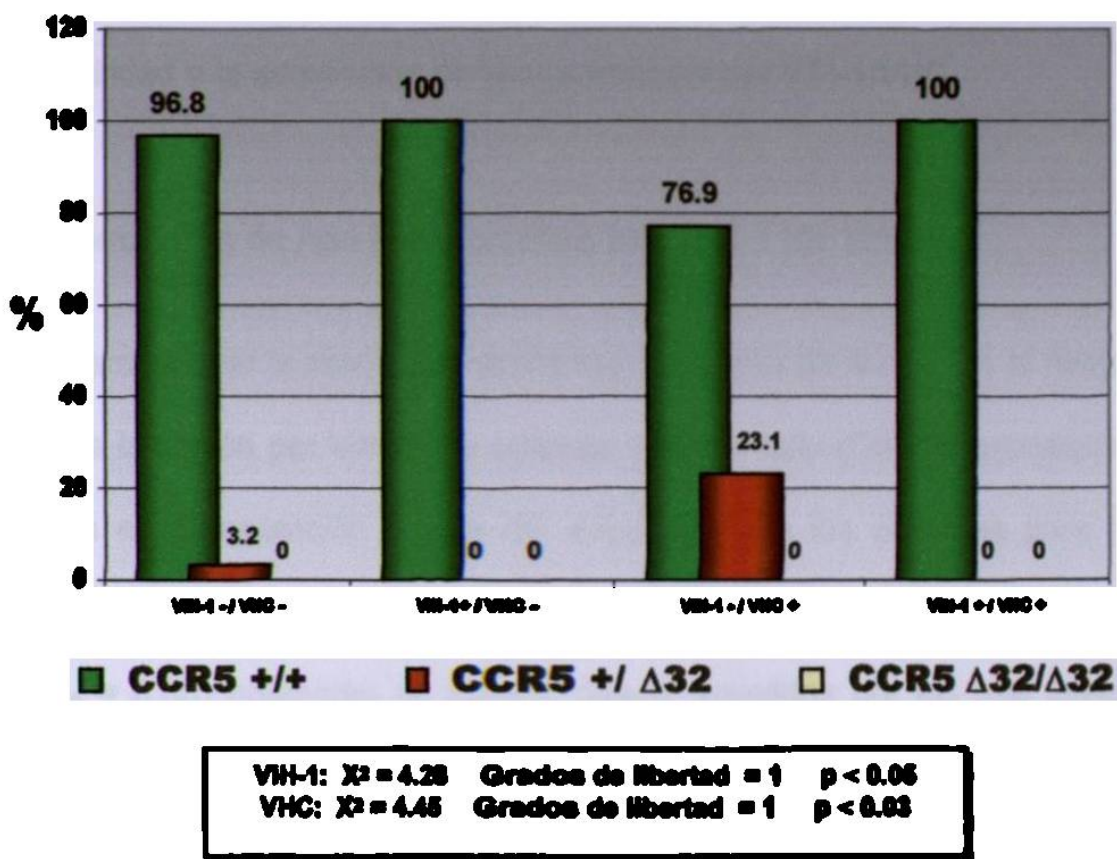


Figura 30. Asociación de los polimorfismos del gen del receptor *ccr5* con la presencia de infección por el VIH-1 y/o por VHC.

Todos los sujetos VIH-1 positivos presentaron el genotipo CCR5 +/+. Al realizar el análisis de asociación entre la infección por VIH-1 y los genotipos del receptor CCR5, se estableció la susceptibilidad de el genotipo CCR5 +/+ a esta infección ($p < 0.05$); sin embargo no se pudo obtener una correlación con la resistencia a la infección.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la mutación $\Delta 32$ de CCR5 y la infección por VHC ($p < 0.02$). En este caso, también como un elemento que da susceptibilidad a la infección, y no se logró establecer una

asociación entre alguno de los genotipos de CCR5 y la resistencia a la infección por VHC.

No se encontró ninguna asociación entre el marcador molecular CCR5 y la susceptibilidad a la adquisición de la coinfección por VIH-1/VHC.

5.6.2 Asociación de Apo E e infección por VIH-1 y/o VHC

Para estimar la asociación entre los genotipos de la Apo E y el riesgo de adquirir la infección por VIH-1 se calculó la *odds ratio* (OR) de exposición de los casos en comparación con la de exposición de los controles para cada genotipo. En la tabla XVII se observa que los portadores del genotipo E4/E4 (OR *cruda* = 6.05) presentan un mayor riesgo, seguidos por los que tienen el genotipo E2/E4 (OR *cruda* = 3), de adquirir la infección por VIH-1 que el que tienen los sujetos portadores de los otros genotipos.

Tabla XVII Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de VIH-1+ y el grupo control.

GENOTIPO	Frecuencia (%)		OR	IC	p
	VIH-1 + Casos	VIH-1 – Controles			
E2 / E2	1 (2 %)	1 (2 %)	----	----	----
E2 / E3	4 (5 %)	7 (11 %)	----	----	----
E2 / E4	16 (25 %)	6 (10 %)	3	95 %	< 0.01
E3 / E3	5 (9 %)	4 (6 %)	----	----	----
E3 / E4	28 (48 %)	43 (69 %)	0.41	95 %	< 0.01
E4 / E4	8 (11 %)	1 (2 %)	6.05	95 %	< 0.05
n	62	62			

En el caso de la relación de los genotipos de Apo E con la adquisición de la infección por VHC, el genotipo que manifestó una mayor asociación fue el

E2/E4 (OR $_{cruda}$ = 3.38), estableciendo que existe una probabilidad tres veces mayor de adquirir la infección por VHC cuando se tiene este genotipo, que si se tiene cualquier otro genotipo de Apo E. (Tabla XVIII)

Tabla XVIII Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de estudio VHC + y el grupo control

GENOTIPO	Frecuencia (%)		OR	IC	p
	VHC + Casos	VHC - Controles			
E2 / E2	0	0	----	----	----
E2 / E3	4.7	9.5	----	----	----
E2 / E4	14.3	4.7	3.38	95 %	< 0.04
E3 / E3	19	9.5	----	----	----
E3 / E4	52.5	76.3	0.34	95 %	< 0.01
E4 / E4	9.5	0	----	----	----
n	21	21			

Los genotipos de Apo E no presetaron una asociación con la adquisición de la coinfección por VIH-1/VHC. (Tabla XIX)

Tabla XIX Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de sujetos VIH-1 + / VHC + y el grupo control

GENOTIPO	Frecuencia (%)		OR	IC	p
	VIH-1 +/ VHC + Casos	VIH-1 -/ VHC - Controles			
E2 / E2	0	0	----	----	----
E2 / E3	12.5	12.5	----	----	----
E2 / E4	25	0	----	----	----
E3 / E3	12.5	25	0.42	95 %	< 0.05
E3 / E4	25	62.5	0.33	95 %	< 0.01
E4 / E4	25	0	----	----	----
n	8	8			

5.7 Correlación Estadística entre las Variables Dependientes e Independientes en el Contexto de los Diferentes Grupos de Sujetos.

Aunque no nos fue posible establecer una correlación estadística entre los factores de riesgo y la presencia de infección por VIH-1, por VHC o en sujetos coinfectados por VIH-1/VHC, se puede señalar que solo un 2 % de los sujetos VIH-1 + refiere haber sufrido accidentes punzo cortantes; el 18 % ha recibido

Tabla XX Factores de riesgo encontrados en el grupo de pacientes VIH-1 positivos.

FACTOR DE RIESGO	CARACTERÍSTICA	SUJETOS VIH-1 + / VHC - f (%)	SUJETOS VIH-1+ / VHC + f (%)
SEXUAL	Número de parejas sexuales:	n = 41	n = 6
	0 - 1 2 - 4 5 - 6 > 6	6 (15 %) 14 (34 %) 1 (2 %) 20 (49 %)	0 (0 %) 3 (50 %) 0 (0 %) 3 (50 %)
ACCIDENTES PUNZO CORTANTES	Orientación sexual:	n = 55	n = 8
	Homosexual	23 (42 %)	5 (62.5 %)
	Heterosexual	27 (49 %)	3 (37.5 %)
	Bisexual	5 (9 %)	0 (0 %)
USO DE DROGAS INTRA VENOSAS	Si	n = 56	n = 8
	No	1 (2 %) 55 (98 %)	0 (0 %) 8 (100 %)
TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA	Si	n = 57	n = 8
	No	5 (9 %) 52 (91 %)	4 (50 %) 4 (50 %)
INGESTA DE ALCOHOL	Si	n = 57	n = 8
	No	10 (18 %) 47 (82 %)	2 (25 %) 6 (75 %)
	Negada	n = 55	n = 7
	Ocasional Moderada Intensa	12 (22 %) 6 (10 %) 35 (64 %) 2 (4 %)	1 (14.3 %) 0 (0 %) 5 (71.4 %) 1 (14.3 %)

terapia transfusional y el 68 % manifiesta una ingesta de alcohol de moderada a intensa en el pasado; y que en el grupo de sujetos coinfectados los factores de riesgo más frecuentes, como se señaló previamente, son: la alta promiscuidad, el alcoholismo, la homosexualidad y el uso de drogas intravenosas. (Tabla XX)

La homosexualidad y la promiscuidad fueron los factores de riesgo que presentaron una ODDS mayor en el grupo de sujetos VIH-1 +, por lo que proporcionalmente son los elementos que con más probabilidad puedan participar en la adquisición de la infección por este agente viral en nuestra población en estudio. (Tabla XXI)

Tabla XXI Características generales y factores de riesgo para la adquisición de infección por VIH-1

CARACTERÍSTICAS	VIH-1 +/VHC - CASOS n = 62	VIH-1 -/ VHC - CONTROLES n = 62	ODDS	p
Edad	34 ± 9.2	32 ± 8.9		
Rango	(18 - 55)	(18 - 55)		
Sexo (m/f)	57 / 5	57 / 5		
Homosexualidad	27 (43.5 %)	0 (0 %)	0.7544	< 0.01
Promiscuidad	35 (56.4 %)	0 (0 %)	0.5385	< 0.01
Uso de drogas IV	5 (8.0 %)	0 (0 %)		
Transfusión sanguínea	10 (16.1 %)	0 (0 %)	0.1905	< 0.01

En el caso del grupo de coinfectados VIH-1 +/VHC +, el factor que presentó un valor de ODDS más elevado fue la homosexualidad (ODDS 1.63). El uso de drogas IV presentó una ODDS de 1 y la transfusión sanguínea de 0.33 . (Tabla XXII)

Tabla XXII Características generales y factores de riesgo para la adquisición de infección por VIH-1 en pacientes coinfectados VIH-1 + / VHC +.

CARACTERÍSTICAS	VIH-1 +/VHC + CASOS n = 8	VIH-1 -/VHC - CONTROLES n = 8	ODDS	p
Edad	36.4 ± 11.7	35.3 ± 12.6		
Rango	(23 – 55)	(21 – 55)		
Sexo (m/f)	8 / 0	8 / 0		
Homosexualidad	5 (62.5 %)	0 (0 %)	1.63	< 0.01
Promiscuidad	8 (100 %)	0 (0 %)		
Uso de drogas IV	4 (50 %)	0 (0 %)	1	< 0.01
Transfusión sanguínea	2 (25 %)	0 (0 %)	0.33	< 0.01
Accidentes punzo cortantes	0 (0 %)	0 (0 %)		

5.8 Análisis de Hardy-Weinberg

Al realizar el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg al grupo control, se encontró que la población era homogénea debido a que el valor de p no fue significativo, siendo de 0.1048.