



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**“ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO (rs17244587) EN EL GEN TBX21 CON LA
INFECCIÓN POR VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN PACIENTES HIV (+)”**

DRA. ANNE MARIE GAMÉ H.

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**

**Directora de Tesis
Prof. Dra. María José Martínez**

**Directora de Tesis
Prof. Dra. Sandra Ampuero**

2011

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

Dra. Anne Marie Gamé H.

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias médicas con mención en Microbiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 14 de Marzo de 2011

Prof. Dra. María José Martínez

Directora de Tesis

Programa de Virología, ICBM

Facultad de Medicina, U. de Chile

Prof. Dra. Sandra Ampuero

Directora de Tesis

Programa de Virología, ICBM

Facultad de Medicina, U. de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra Tirza Saavedra

Prof. Dr. Jonás Chnaiderman

Prof. Dra. Carmen Larrañaga

Prof. Dr. Gonzalo Osorio

Prof. Dra.Presidente Comisión

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a Sebastián, por creer en mí, acompañarme y ayudarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María José Martínez, Dra. Sandra Ampuero, Monica Peña y todos los integrantes del Programa de Virología por su fundamental y desinteresado apoyo en la realización de la tesis; especialmente por hacer del laboratorio un lugar lleno de cariño y acogida.

A la Dra. María Luisa Garmendia por su ayuda en la realización del análisis estadístico.

A mi tutora la Dra. María José Martínez por su apoyo, sus consejos en la realización de la tesis y en especial por la confianza que tuvo en mí, que hicieron posible a pesar de las dificultades que siempre aparecen, tener la calma para seguir adelante.

A mi tutora la Dra. Sandra Ampuero por su apoyo, paciencia y conocimientos, sin los cuales no habría sido posible la realización de esta tesis

A Mónica Peña, especialmente, por su ayuda incondicional y apoyo en todo momento.

A Sebastián, mi familia y amigas por estar siempre conmigo, su ayuda y apoyo permanente

A todos los que estuvieron conmigo en los momentos difíciles y me ayudaron a seguir... no los olvidaré.



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**“ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO (rs17244587) EN EL GEN TBX21 CON LA
INFECCIÓN POR VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN PACIENTES HIV (+)”**

DRA. ANNE MARIE GAMÉ H.

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**

**Directora de Tesis
Prof. Dra. María José Martínez**

**Directora de Tesis
Prof. Dra. Sandra Ampuero**

2011

INDICE

Resumen	7
Abstract	9
Introducción	11
1. Epidemiología del HSV-2	11
2. Características del HSV-2	12
3. Patogenia del HSV-2	13
4. Cuadro clínico: Herpes genital	13
5. Infección por HSV-2 y HIV	13
6. Respuesta inmune en la infección por HSV-2	14
7. T-bet y HIV	16
8. Polimorfismos genéticos en la infección por HSV-2	16
Hipótesis / Objetivo general / Objetivos específicos	19
Metodología	12
1. Pacientes	20
2. Cálculo del tamaño muestral	20
3. Extracción del ADN genómico	20
4. Cuantificación del ADN extraído	21
5. Genotipificación	21
6. Análisis de los resultados	24
Resultados	26
Discusión	30
Conclusiones	33
Bibliografía	34

RESUMEN

Introducción: La infección genital provocada por el HSV-2 es la infección de transmisión sexual (ITS) ulcerativa más frecuente. Se ha relacionado con otras ITS, entre ellas HIV. Representa un factor de riesgo importante para la adquisición y transmisión del HIV. La respuesta inmune celular es la responsable del control de la infección. T-bet es uno de los factores de transcripción involucrados en la activación de ésta. Es fundamental en la diferenciación de LTCD4+ en LTh1. Ésta estaría determinada de forma importante por polimorfismos en genes. Los polimorfismos de un nucleótido o SNP son los más comunes. El SNP rs17244587(-17426 A/G) ha sido asociado a predisposición a la infección por HSV-2 en población sueca. Esto podría explicar en parte la mayor susceptibilidad a la infección en algunos individuos, incluidos los pacientes HIV(+), en los cuales esta infección sería particularmente importante.

Hipótesis: En población HIV(+) existe una mayor prevalencia del alelo A del SNP 17426 A/G en individuos infectados por HSV-2. **Objetivo general:** Comparar la incidencia de infección por HSV-2 en pacientes HIV(+), de acuerdo a la presencia del SNP. **Metodología:** Los pacientes ingresados son HIV (+) controlados en el Centro de ITS del Hospital San José. Se agruparon en casos: 188 HSV-2 (+) y controles: 63 HSV-2(-). Se extrajo el DNA genómico de muestras de buffy coat y se cuantificó. La genotipificación se realizó mediante PCR-RFLP. Todos los casos eran HSV-1 (+) y todos los controles (-). **Resultados:** No se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos en relación a la presencia del SNP. Hubo diferencias significativas en cuanto a la existencia de otras ITS en presencia del SNP. Ambos grupos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). **Discusión:** La frecuencia del alelo A en este grupo de pacientes HIV(+) es menor que la descrita en estudio de población sueca infectada por HSV-2. Si bien la frecuencia de este SNP en población latinoamericana no está descrita es esperable que sea una situación intermedia entre población europea y asiática lo cual parece concordante con nuestros resultados. En segundo lugar se encontró que ambos grupos se encontraban en equilibrio de HW, indicando que el método de genotipificación es confiable. Pese a que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de casos y controles, el alelo A fue más

frecuente en el grupo de casos mostrando una tendencia de que éste pueda representar un factor de riesgo para la infección por HSV-2 en pacientes HIV(+). Además los intervalos de confianza son extremadamente amplios (poco precisos) y quizás esto podría modificarse con una muestra de estudio mayor. Este polimorfismo se ubica en la región 3' no codificante y es transcrito a RNAm. Podríamos teorizar que el alelo A podría afectar la estabilidad del RNAm y consecuentemente afectar la función de T-bet. Esto llevaría a una deficiente activación de la respuesta inmune de tipo Th1, con disminución de la producción de IFN γ y disminución de la función de elementos efectores. Esto podría explicar la mayor susceptibilidad a la infección por HSV-2 en pacientes portadores del alelo A. Por último en lo que concierne las características sociodemográficas asociadas al alelo A, se consideraron sexo y otras ITS. No hubo diferencias significativas en cuanto al sexo y si las hubo en relación a la presencia de otras ITS. Lo último podría explicarse por lo anteriormente mencionado, es decir que por la presencia de este alelo se produzca una respuesta inmune menos eficiente y por lo tanto se presenten más infecciones. Dado que por azar todos los casos fueron positivos para HSV-1 (+), y los controles negativos para este virus, no se descarta que este polimorfismo pueda tener una relación con la infección por HSV-1. **Conclusión:** No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del alelo A con la infección por HSV-2 en pacientes HIV(+). Sin embargo, la presencia del alelo A se asoció con el antecedente de ITS en los pacientes. Dado que la distribución de los polimorfismos genéticos es variable entre distintas poblaciones, es necesario identificar los polimorfismos de fundamental importancia, prevalentes en nuestra población (latinoamericana). No podemos descartar que este polimorfismo pueda tener o no relación con la infección por HSV-1.

ABSTRACT

Introduction: Genital infection caused by HSV-2 is the most common ulcerative sexual transmitted disease (STD). It has been associated with other STD, including HIV. It represents a major risk factor for acquiring and transmitting HIV. The cellular immune response is responsible for infection control. T-bet is a transcription factor involved in activating it. It is fundamental in the differentiation of LTCD4 + into LTh1. This would significantly determined by polymorphisms in genes. The single nucleotide polymorphisms or SNPs are most common. The SNP rs17244587 (-17426 A / G) has been associated with predisposition to infection with HSV-2 in a swedish population. This may explain, in part, the increased susceptibility to infection in some individuals, including patients HIV(+), in whom this infection is particularly important.

Hypothesis: There is a higher prevalence of allele A of the SNP 17426 A / G in individuals infected with HSV-2 than in controls, on population HIV (+).

Objective: Compare the incidence of HSV-2 infection in patients HIV (+), according to the presence of the SNP.

Methodology: The patients admitted were HIV (+) controlled in the STD center of San Jose Hospital. Samples of buffy coat were taken. They were grouped into two groups, cases: 188 HSV-2 (+) and controls: 63 HSV-2 (-). Genomic DNA was extracted and quantified. The genotyping was performed by PCR-RFLP. All cases were HSV-1 (+) and all controls (-).

Results: No differences were found when comparing the groups in relation to presence of SNP. There were significant differences about the existence of other STD in presence of SNP. Both groups were in equilibrium of Hardy-Weinberg (HW).

Discussion: The frequency of allele A in this group of patients HIV (+) is lower than described in study of swedish population infected with HSV-2. Although the frequency of this SNP in Latin-American population is not described, it is expected to be an intermediate position between European and Asian population, which seems consistent with our results. Secondly it was found that both groups were in HW equilibrium, indicating that the method genotyping is reliable. Although not significant differences between groups where found, the A allele was more common in the group of cases showing a tendency that it could represent a risk factor for HSV-2 infection in HIV(+) patients. In addition, intervals of trust are extremely broad (imprecise) and perhaps this could be amended with a study sample

higher. This polymorphism is located in the 3' untranslated region and is transcribed into mRNA. We could theorize that this polymorphism could affect the stability of mRNA and consequently affect the function of T-bet. This would lead to poor activation of the Th1-type immune response, with decreased IFN γ production and decreased function of effectors' elements. This could explain the higher susceptibility to infection with HSV-2 in patients carriers of this polymorphism. Finally, regarding the socio demographic characteristics associated with the allele A, sex and others STD were considered. No significant differences in sex were found, while differences were found in the presence of other STD. The latter could be explained by the above mentioned, namely that the presence of this allele produces a less efficient immune response and so most infections occur. Since by chance all cases were HSV-1 (+), and all controls (-), It is possible that this polymorphism may or may not have a relationship with the HSV-1 infection. **Conclusion:** We found no statistically significant association between the polymorphism rs17244587 in TBX21 gene with HSV-2 infection in HIV (+). However the presence of allele A was associated with a history of STD in patients. Since the distribution of polymorphism varies among different populations, it is necessary to identify polymorphism of fundamental importance, prevalent in our population (Latin-American). We can't exclude that this polymorphism may have or not relation with HSV-1 infection.

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del HSV-2

La infección genital provocada por el virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2) es la enfermedad de transmisión sexual ulcerativa más frecuente a nivel mundial, reportándose que hasta el 25% de la población adulta se encuentra infectada con este virus (1). Se ha convertido en un importante problema de salud pública en los últimos años, debido al notable aumento de la prevalencia de infecciones por el HSV-2 desde finales de 1970 (2). Así, representa una fuente importante de morbilidad por variadas razones, desde las molestias físicas y efectos psicológicos de las reactivaciones, hasta graves complicaciones en pacientes inmunocomprometidos y neonatos (2). Igualmente, la infección por HSV-2 se ha relacionado con otras infecciones como la sífilis, entre otras infecciones de transmisión sexual (ITS), y como cofactor en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (3,4,5).

En una revisión global publicada por la Organización Mundial de la Salud en el año 2008, el número total estimado de personas de entre 15 y 49 años que viven con el HSV-2 en el mundo es de 536 millones. Además existirían más mujeres que hombres infectados, con un estimado de 315 millones de mujeres infectadas, en comparación a 221 millones de hombres infectados. Por otro lado la prevalencia aumenta con la edad, con una incidencia máxima entre los 35 a 39 años de edad. Asimismo ésta varía considerablemente por región. En general, la prevalencia es mayor en países en desarrollo que en países desarrollados, con algunas excepciones. Así la prevalencia de infección por HSV-2 en Latino América es más bien intermedia con 38,6 millones de infectados entre 15 y 49 años (6).

La incidencia o número estimado de nuevas infecciones por HSV-2 entre los 15-49 años de edad a nivel global es de 23,6 millones, de los cuales 12,8 millones son mujeres y 10,8 millones hombres. Además el número de nuevas infecciones es mayor en los grupos de edad más jóvenes, y disminuye posteriormente debido a un descenso en el número de personas susceptibles. La incidencia también varía entre las distintas regiones. Así la incidencia de infección por HSV-2 en Latino América es

más bien intermedia con 2.534.000 nuevos infectados entre 15 y 49 años anualmente (6).

En Chile al igual que en el resto del mundo el herpes genital es causado principalmente, por el HSV-2 (7). Los registros de casos de herpes genitales diagnosticados clínicamente en los servicios centinelas de detección de enfermedades de transmisión sexual del sistema público de salud reportan un 3,8% de casos dentro del total de las ITS notificadas (8). Un estudio del año 2005 en pacientes atendidos en centros de referencia de ITS muestra una seroprevalencia intermedia entre las publicaciones mundiales con 43% de pacientes positivos (9). La seroprevalencia en población HIV(+) en estos centros de ITS es de 76% (10).

2. Características del HSV-2

El HSV-2 es miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Simplexvirus*. Es un virus DNA de doble cadena, con un tamaño entre 150 y 200nm. El virus maduro tiene una nucleocápside de simetría icosaédrica, un tegumento y un manto. El genoma codifica para 80-200 productos génicos. La entrada del virus a la célula huésped de piel y mucosas ocurre en varias etapas secuenciales, involucrando la interacción de múltiples glicoproteínas virales con moléculas en la superficie celular. Posteriormente la cápside es liberada en el citoplasma y transportada hacia el núcleo, donde ocurren los procesos de transcripción de genes y replicación del genoma. La transcripción ocurre de manera secuencial. Consecutivamente ocurre el ensamblaje de las partículas virales en el núcleo, y las cápsides adquieren su envoltura en la membrana interna de éste. La envoltura entonces se funde con la membrana nuclear externa y la nucleocápside es liberada al citoplasma donde madura y es exportada por el aparato de Golgi al exterior. Después del ensamblaje exitoso de viriones el virus es liberado y penetra en terminaciones nerviosas sensoriales y de forma retrógrada alcanza los ganglios sensitivos sacros. El virus puede persistir en una forma inactiva conocida como infección latente en los ganglios nerviosos. El virus puede reactivarse desde los núcleos de las neuronas, viajar hacia el sitio inicial de infección o cercano a éste y replicar nuevamente, en lo que se denomina una recurrencia viral (11).

3. Patogenia del HSV-2

La patogenia es dependiente del contacto directo de una persona susceptible con un individuo infectado. El virus debe entrar en contacto con superficies mucosas o piel dañada, donde realiza su ciclo replicativo. Luego el virus es transportado de forma retrógrada por terminaciones nerviosas sensitivas regionales al ganglio dorsal sensitivo donde establece latencia. Aunque la replicación puede a veces llevar a enfermedad e infrecuentemente resultar en condiciones graves, como infecciones del sistema nervioso central, en general predomina el estado de latencia. Algunos estímulos pueden causar reactivaciones, entonces el virus replica nuevamente en sitios mucocutáneos (11).

4. Cuadro clínico: Herpes genital

La adquisición de la infección es en general por contacto sexual. Como se ha mencionado anteriormente, el herpes genital en nuestro país es producido mayormente por HSV-2. Las infecciones por HSV-1 son usualmente menos severas y cursan con menos recurrencias. Tanto la primoinfección como las reactivaciones pueden ser sintomáticas o asintomáticas, situación que representa una importante fuente de contagio. El herpes genital primario es la manifestación clínica de la primoinfección y se asocia a una mayor excreción viral y más prolongada que las reactivaciones. Las complicaciones sistémicas son relativamente raras, sin embargo puede ocurrir meningitis aséptica y lesiones extragenitales. El herpes genital recurrente es una forma clínica menos severa (12).

5. Infección por HSV-2 y HIV

La infección por HSV-2 es un factor de riesgo importante para la adquisición y transmisión del HIV. En un meta análisis del año 2002 se reporta que esta infección dobla el riesgo de ser infectado por HIV por transmisión sexual (13). Existiría una relación sinérgica entre ambos. El HSV-2 causa úlceras y micro ulceraciones frecuentemente no percibidas por el individuo infectado provocando una pérdida de la barrera mucosa facilitando la entrada del HIV. Además, en las lesiones ulcerativas del HSV-2 habría un reclutamiento importante de LTCD4+, células blanco del HIV y esto

podría facilitar la infección. De la misma forma los episodios de reactivación del HSV-2 en pacientes HIV(+), se relacionan con aumentos de la carga viral de HIV, con lo que aumenta el riesgo de transmisión de este virus a personas susceptibles. Por otro lado en pacientes HIV(+) e infectados por HSV-2 los cuadros de herpes genital serían más frecuentes, prolongados y con lesiones atípicas. Además aumentaría la frecuencia de excreción de HSV-2 favoreciendo su transmisión a individuos susceptibles (5,14,15).

6. Respuesta inmune en la infección por HSV-2

La respuesta inmune celular e interferones (IFN) son probablemente los mediadores inmunológicos más eficientes en la respuesta frente a la infección por HSV-2. En un primer momento los IFN de tipo I (α, β) bloquean la replicación viral, aumentan la expresión de moléculas de histocompatibilidad tipo I estimulando la citotoxicidad mediada por células y actividad de células natural killer (NK)(16,17). Una vez que se ha montado una respuesta inmune (RI) adquirida es la RI celular la que se encargará de contener el virus (18). La activación de linfocitos T (LT), NK y producción de IFN es regulada finamente y se compone de una intrincada red de señalización. T-bet es uno de los factores involucrados en la activación de RIA, siendo muy importante ya que influye en la función de NK, LT y producción de IFN γ . T-bet es un factor de transcripción codificado por el gen TBX21 perteneciente a la familia de genes T-box, factores de transcripción que comparten un dominio de unión a DNA y estarían involucrados en la regulación de procesos de desarrollo celular. T-bet se expresa tempranamente en la diferenciación de LTCD4+ en LTh1 y actúa como un potente inductor de IFN γ , la cual es la citoquina característica del linaje Th1. La inducción de T-bet puede ocurrir en varias formas distintas dependiendo del tipo celular y factores. Aunque se reconoce como el principal regulador de la diferenciación hacia Th1 se expresa en un amplio rango de células inmunes lo que lo transforma en un factor crucial en la protección del huésped contra virus y otros microorganismos invasores. La inducción de T-bet es aumentada por señales mediadas por el receptor TCR junto con STAT-1. La expresión de T-bet lleva a la expresión de IL-12R β 2 y activación por IL-12, lo cual a su vez a través de STAT-4 genera reestructuración de la

cromatina del gen de IFN γ , con producción de IFN γ . T-bet también puede actuar directamente en el gen de IFN γ iniciando su transcripción. IFN γ puede ejercer una retroalimentación positiva aumentando la expresión de T-bet a través del receptor de IFN γ y STAT-1, de forma auto y endocrina, en consecuencia generando un loop de amplificación que estabiliza la expresión de T-bet y la diferenciación hacia Th1 (figura 1). No obstante las funciones efectoras de T-bet no están limitadas a la diferenciación hacia Th1 ya que se ha relacionado con la función de múltiples células inmunitarias tanto de la respuesta inmune innata como adquirida. En la respuesta inmune innata estaría involucrada en la activación de NK, aumentando su actividad citotóxica y en la activación de células dendríticas plasmocitoides productoras de INF de tipo I. Por otro lado en la respuesta inmune adquirida además de estimular la diferenciación de linfocitos vírgenes hacia Th1 y producción de IFN γ , estimularía un cambio de clase en linfocitos B hacia anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento, estimulación de la citotoxicidad en LTCD8+, cambio de receptores de quimioquinas con expresión de CXCR3 favoreciendo la migración del LTh1 activado a la periferia, entre otros (19,20).

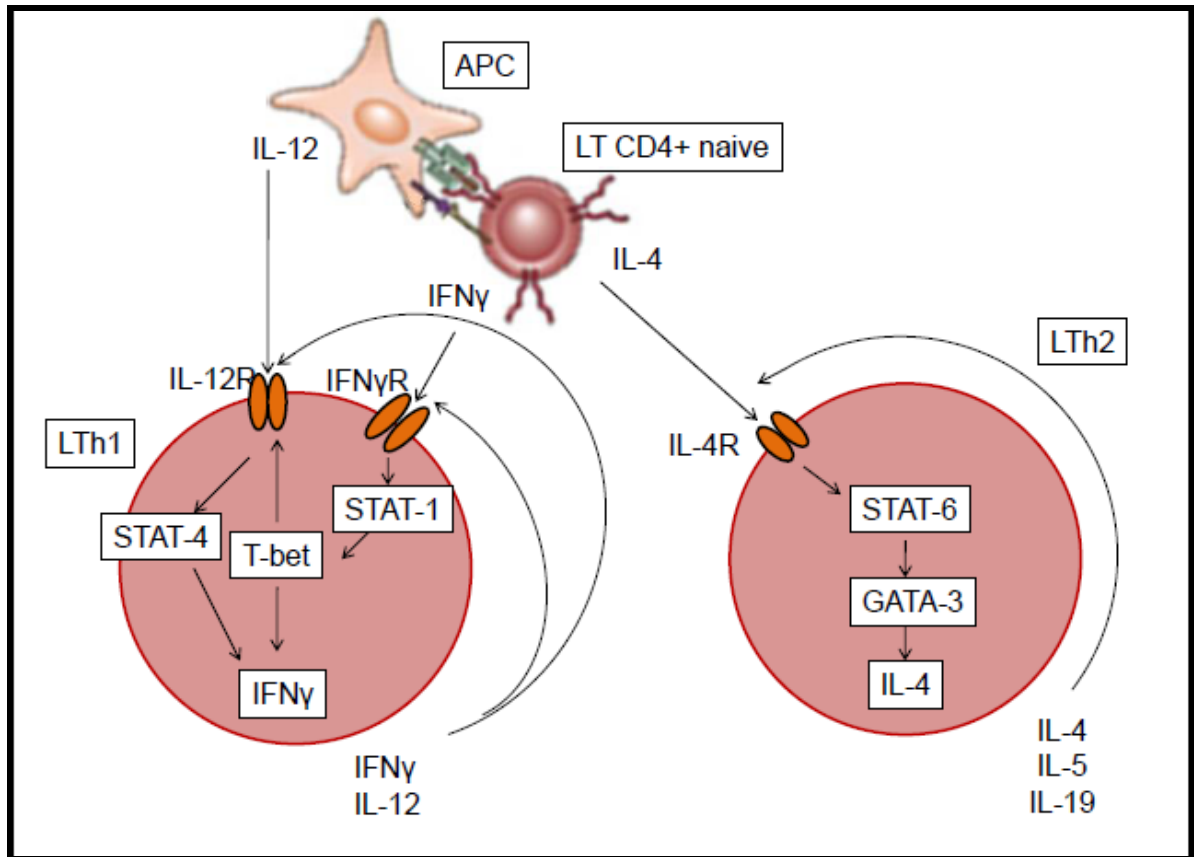


Figura 1. Activación de la respuesta inmune adquirida de tipo Th1

7. T-bet y HIV

Con respecto a la infección por HIV y el factor T-bet, sólo existe un estudio de células infectadas por HIV in vitro, en el cual se observa una inducción del factor T-bet mediada por la proteína viral Tat. Esto promueve una respuesta inmune Th1 y por lo tanto aumenta la producción de IFN γ , inhibiendo de esta forma la replicación del virus (21).

8. Polimorfismos genéticos en la infección por HSV-2

Existen numerosos factores de riesgo identificados en la infección por HSV-2, entre los que destacan la edad, número de parejas sexuales, nivel socioeconómico, consumo de alcohol, inicio de actividad sexual temprana y falta de uso de preservativo, entre otros (22,23,24). Tanto la susceptibilidad como la evolución frente a las patologías infecciosas son muy variables y estarían determinadas por múltiples factores

del hospedero, agente y ambiente. La variabilidad genética en el hospedero estaría determinada de forma importante por polimorfismos en genes - que tendrían un rol en la adhesión, inmunidad innata y adquirida. Estas variaciones serían fundamentales en algunos patógenos como HIV y VRS (25). Como se ha enunciado anteriormente, los efectos clínicos de la infección por HSV-2 puede ser variable, desde una portación asintomática hasta infecciones recurrentes y severas. Los mecanismos subyacentes a los distintos resultados de esta enfermedad son desconocidos. Sin embargo altos niveles de IFN γ , infección previa por HSV-1, ciertos alelos HLA, ciertas variantes del gen codificante para el receptor Toll 2 (TLR2) y altos niveles de lecitina aumentan la posibilidad de una infección asintomática (19).

El avance en técnicas de genotipificación y secuenciación del genoma humano, ha permitido a los investigadores estudiar el rol que pueden tener los polimorfismos genéticos en el desarrollo de diversas enfermedades. Los polimorfismos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en individuos, se transmiten a la descendencia y alcanzan frecuencias mayores a 1% en la población tras múltiples generaciones. Los polimorfismos de un nucleótido o SNP (single nucleotide polymorphism) son los más comunes en el genoma humano; y corresponden a la sustitución de un nucleótido por otro. La mayoría de los SNP son bialélicos, es decir, están constituidos por sólo dos posibles nucleótidos (o alelos). Se denominan alelos “mayor” y “menor” de acuerdo a las frecuencias observadas en la población general. Además, dado que los humanos son diploides (cromosomas de origen materno y paterno), para cada SNP un individuo puede presentar uno de los siguientes genotipos: homocigoto para el alelo mayor, heterocigoto u homocigoto para el alelo menor. Gran parte de los SNP ocurren en zonas no codificantes del genoma. En otras ocasiones, los polimorfismos ocurren en zonas codificantes, pudiendo provocar un cambio de aminoácido en la proteína final, determinando una modificación de su función o conformación. Del mismo modo, las variaciones pueden ocurrir en zonas promotoras de un gen, o en intrones, pudiendo modificar así su expresión (26). En el gen TBX21, que consiste en 6 exones y 5 intrones y se localiza en el cromosoma 17 en humanos, se han identificado varios SNP. Algunos de ellos han sido relacionados con algunas enfermedades, como asma y diabetes tipo 1 (27,28,29,30).

El SNP rs17244587(-17426 A/G) ha sido asociado a predisposición a la infección por HSV-2 (31). Este SNP se ubica en la región 3' no codificante, y es transcrito a RNA mensajero. Es bialélico, siendo el alelo G el más frecuente (mayor) y el alelo A menos frecuente (menor). En europeos el alelo A es de 12,1%, mientras que en asiáticos es de 4,8% y en africanos de 3,8% (32). La frecuencia de ambos alelos en población latinoamericana no ha sido descrita. Su frecuencia en otras poblaciones es variable (32).

En ratones, se ha demostrado que la transcripción del factor T-bet, característico de una respuesta celular de tipo Th1 es fundamental en la respuesta inmune innata y adquirida en la infección por HSV-2. Este factor sería primordial en las respuestas mediadas por células NK y linfocitos T CD4+. Los ratones deficientes de este factor tendrían mermada de forma importante su respuesta frente a este agente, con menor actividad citotóxica y producción de IFN γ (19). En un estudio sueco del año 2008, en población caucásica asistente a una clínica de ITS se asoció una mayor frecuencia del alelo A en los infectados por HSV-2 (31) Esto podría explicar en parte la mayor susceptibilidad a la infección por HSV-2 en algunos individuos, incluidos los pacientes HIV(+), en los cuales esta infección sería particularmente importante. Dada la alta prevalencia de infección por HSV-2 en nuestra población y la gran relevancia que tiene esta infección en pacientes HIV (+) creemos que sería un primer paso relevante estudiar la prevalencia de este SNP en este grupo de especial riesgo.

HIPÓTESIS

Existe una mayor prevalencia del alelo A del polimorfismo -17426 A/G en la región no codificante en el extremo 3' del gen *TBX21*, en individuos HIV (+) infectados por HSV-2 que en controles.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la incidencia de infección por HSV-2 en pacientes HIV(+), de acuerdo a la presencia del alelo A del SNP -17426 A/G en la región no codificante en el extremo 3' del gen *TBX21*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la identificación del SNP -17426 A/G en la región no codificante en el extremo 3' del gen *TBX21*, en muestras sanguíneas de pacientes HIV(+).
2. Determinar la frecuencia del alelo A en pacientes HIV(+), infectados con HSV-2 y en controles HSV-2 (-).
3. Identificar características socio-demográficas de estos pacientes, asociadas a la presencia del SNP -17426 A/G en la región no codificante en el extremo 3' del gen *TBX21*.

METODOLOGÍA

1. Pacientes

En el presente estudio, los pacientes ingresados fueron seleccionados a partir de una población de pacientes HIV (+) controlados en el Centro de ITS del Hospital San José, los cuales habían participado anteriormente en un estudio de incidencia de infección por HSV-2. Previo consentimiento informado se tomaron muestras de sangre, de las cuales se separó y almacenó el buffy coat a -80°C desde su recolección. A partir de las muestras de suero se identificó la presencia de anticuerpos específicos anti HSV-2 agrupándolos en grupo casos: HSV-2 (+) y controles HSV-2(-). Los datos sociodemográficos utilizados fueron obtenidos de la información recolectada en el estudio de incidencia de infección por HSV-2.

2. Cálculo del tamaño muestral

Para el cálculo de tamaño muestral del presente estudio, se adoptaron los siguientes supuestos según las frecuencias alélicas publicadas en el único estudio en humanos: nivel de confianza 5%, poder de 80% (19). Según estos supuestos el tamaño muestral necesario es de 188 casos y 63 controles.

3. Extracción del DNA genómico

La extracción de DNA a partir de muestras de buffy coat se realizó con un kit comercial: High Pure Viral Nucleic Acid Kit. Brevemente la lisis celular se realiza mediante la incubación de la muestra en presencia de proteinasa K, luego los ácidos nucleicos se unen a la superficie de fibras de vidrio, en una columna, en presencia de una sal, para finalmente ser eluidos (figura 2).

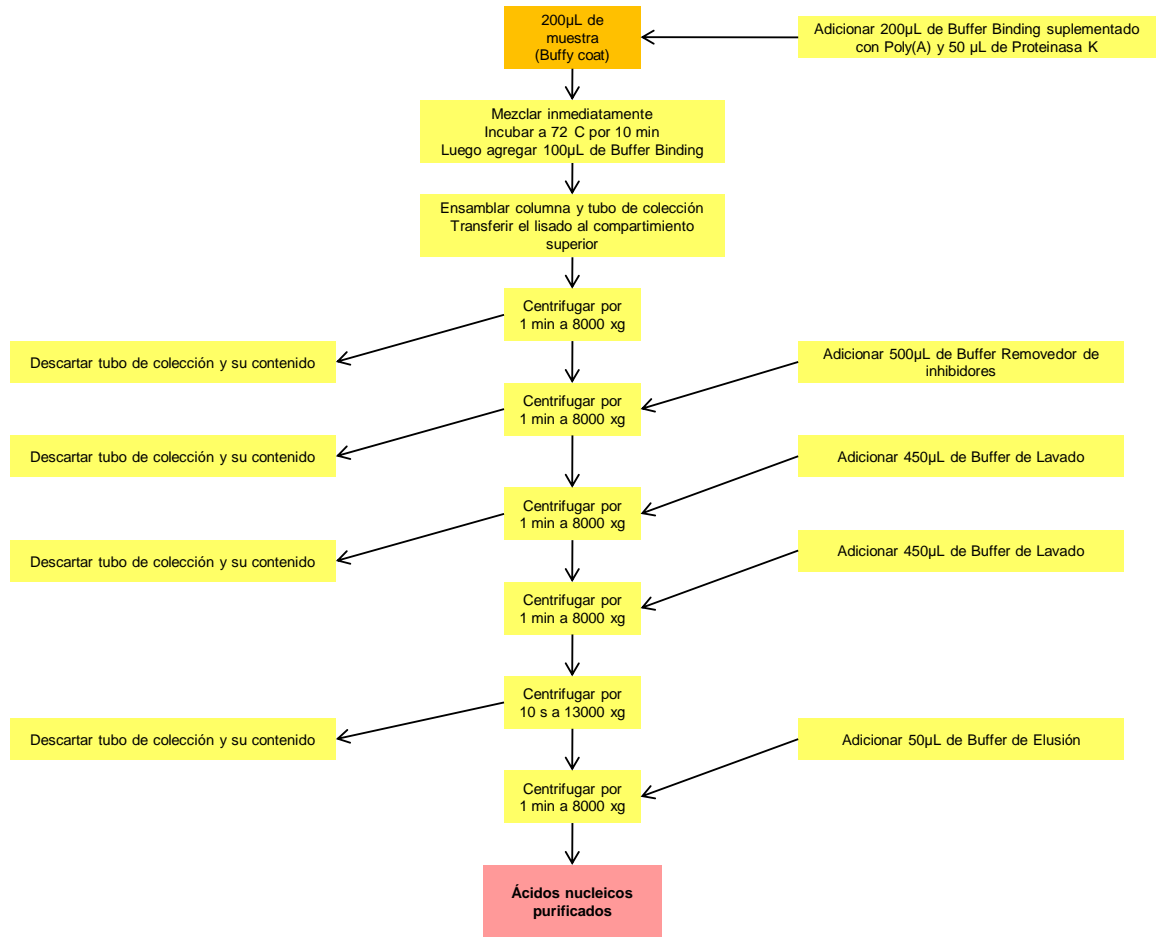


Figura 2. Protocolo de extracción de DNA con High Pure Viral Nucleic Acid Kit

4. Cuantificación del DNA extraído

La cuantificación del DNA extraído se efectuó a través de espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260nm.

5. Genotipificación

La genotipificación se realizó mediante PCR-RFLP. Se diseñaron dos PCR, para cada uno de los alelos (A y G). Esta técnica pretende obtener amplificadores que contengan una secuencia de corte específica susceptible de ser reconocida por una enzima de restricción. Como en estos casos no existían sitios naturales de restricción, se diseñaron partidores en los cuales se introdujo un cambio nucleotídico, que

no incluía al polimorfismo, pero que generó una secuencia susceptible de ser reconocida por una enzima de restricción. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µL, en un termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems), las condiciones específicas de las reacciones de PCR para cada alelo se detallan en la figura 4.

Polimorfismo	Partidores*	Condiciones PCR	Tamaño amplificado
TBX21 12426 • G/G	D: CCACGATGAAACCTGAGAG <u>Alelo G:</u> R ₁ : ATGCAAAAAGCTCCTTCA <u>G</u> G	MgCl:3mM, Partidores: 0,2 µM, DMSO:0,6µL (94°C1",56°C1",72°C1") 40ciclos	144pb
	<u>Alelo A:</u> R ₂ : CTAGATGCAA- AAAGCTCCT <u>A</u> C	MgCl:3mM, Partidores: 0,2 µM, DMSO:0,6µL (94°C1",56°C1",72°C1") 40ciclos	148pb

Figura 4. Condiciones específicas utilizadas en la PCR del SNP estudiado

* Partidores diseñados durante el desarrollo de la tesis. El "mismatch" introducido se destaca en negrita y subrayado. Tamaño de amplificado esperado antes de la digestión con enzimas de restricción.

Los productos amplificados fueron digeridos según el protocolo indicado por los proveedores (figura 5). Los amplificados y los fragmentos digeridos se visualizaron en geles de poliacrilamida al 12% teñidos con nitrato de plata, utilizando DNA Ladder de 25 pb (Invitrogen®) como estándar de tamaño molecular. Se obtuvieron distintos patrones de digestión dependiendo si el amplificado contenía o no la secuencia de corte (figura 5, 6). Esto permitió identificar si el gen contenía o no el alelo de interés.

Polimorfismo	Enzima de restricción <ul style="list-style-type: none"> Nombre Sitio de corte 	Condiciones digestión	Tamaño fragmentos
TBX21 12426 G/G	Hae III 5'... GGCC... 3' 3'... CCGG... 5'	37°C (overnight)	124pb 20pb
TBX21 12426 A/G	Pci I 5'... ACATGT... 3' 3'... TGTACA... 5'	37°C (overnight)	124pb 24pb

Figura 5. Condiciones específicas utilizadas en la digestión por enzimas de restricción

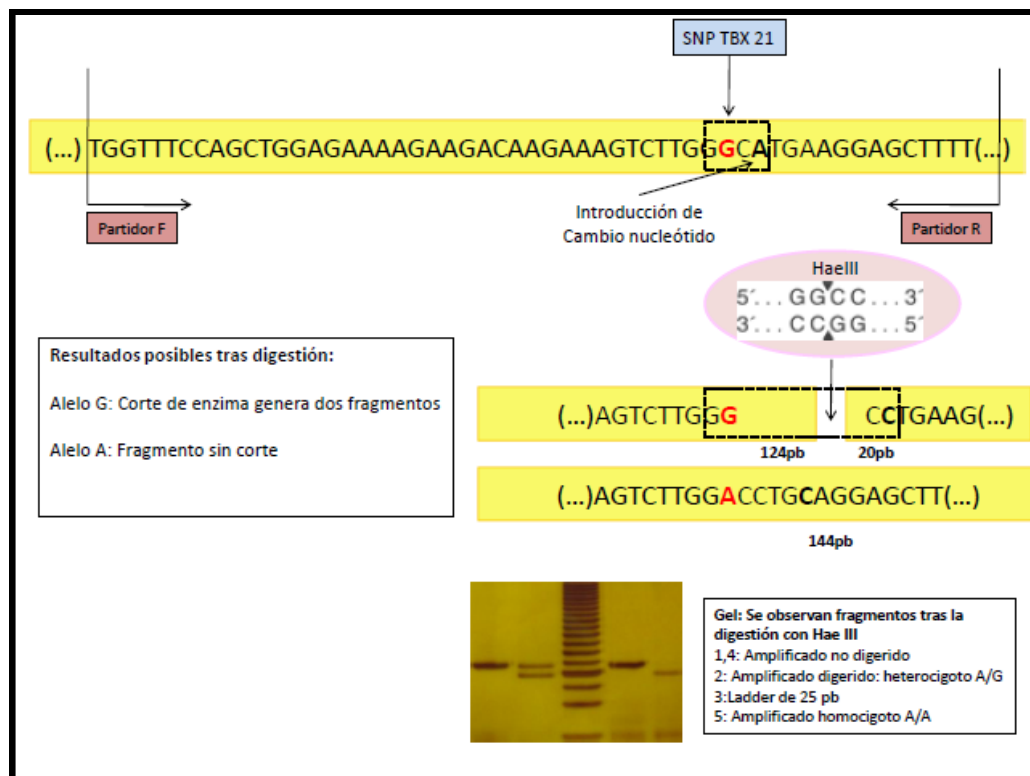


Figura 6. Esquema técnica PCR alelo G y posterior digestión (RFLP) con enzima HaeIII

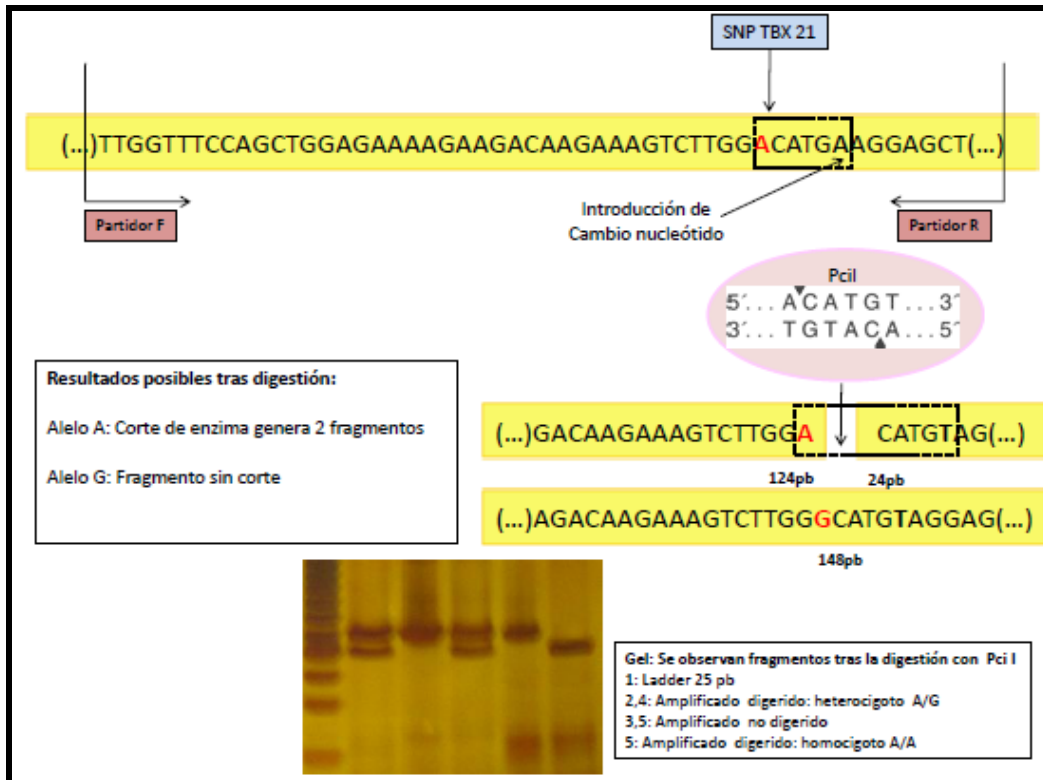


Figura 7. Esquema técnica PCR alelo A y posterior digestion (RFLP) con enzima Pci I

6. Análisis de los resultados

El análisis del polimorfismo se realizó estimando las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente. Las técnicas de laboratorio que se llevaron a cabo permiten determinar el genotipo de cada individuo. Las frecuencias genotípicas, por tanto, se estimaron directamente calculando la proporción de individuos con cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas simplemente se duplicó la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con dos cromosomas) y se calculó la proporción de cada alelo (26).

Previo al análisis de asociación del polimorfismo con la condición de estar infectado por HSV-2 debió comprobarse el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg en los grupos de estudio. El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina que frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos, considerando a los alelos independientes en su transmisión desde progenitores a descendientes y en condiciones en que no existan fenómenos de selección o mutación de éstos. Si el grupo en cuestión de en-

cuentra en equilibrio las frecuencias esperadas y observadas serán iguales. Éstas se pueden comparar utilizando un test de X^2 (26).

Para el análisis de asociación del polimorfismo con la condición en estudio (infección por HSV-2), se consideró que el polimorfismo constituye una variable categórica con tres genotipos y dos alelos posibles. De esta forma se construyeron tablas de contingencia y se pudo contrarrestar la hipótesis de asociación mediante un test de X^2 . También se calcularon los odds ratios (OD) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación (26). De esta forma se realizaron los análisis de asociación comparando los distintos grupos: Grupo control (no infectados por HSV-2/ HIV+), Grupo casos (infectados por HSV-2/ HIV+).

Para el análisis de las variables sociodemográficas se describen promedios. Las diferencias entre grupos se estudiaron a través de la prueba estadística X^2 , con un nivel de significación de 5%.

RESULTADOS

En 251 muestras se realizó la extracción de DNA y cuantificación a través de espectrofotometría. Del total de muestras, 188 correspondieron a pacientes infectados por HSV-2 (casos) y 63 muestras corresponden a pacientes no infectados por HSV-2 (controles).

Mediante la técnica de PCR-RFLP, en las 251 muestras analizadas correspondientes a casos y controles, se efectuó la identificación del alelo G y alelo A. De ellos se ha obtenido el siguiente resultado, expresado en las tablas 1 y 2.

	G/G % (n)	A/G %(n)	A/A %(n)	Total individuos
Casos	87,77% (165)	11,7% (22)	0,53%(1)	188
Controles	92,06% (58)	7,94% (5)	0% (0)	63
OR	0,943	1,547	1,060	
IC	[0,038-23,472]	[0,56-4,272]	[0,043-26,394]	
P	0,55	0,39	0,55	
χ^2	0,35	0,72	0,35	

Tabla 1. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -17426 A/G en el gen TBX21

	Alelo G %(n)	Alelo A %(n)	Total Cromosomas
Casos	93,62% (352)	6,38% (24)	376
Controles	96,03% (121)	3,97% (5)	126
OR	0,6	1,65	
IC	[0,226-1,624]	[0,616-4,42]	
P	0,31	0,31	
X²	1.01	1,01	

Tabla 2. Frecuencias alélicas del polimorfismo -17426 A/G en el gen TBX21

En primer lugar se analizó si los grupos de casos y controles cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg, Esto se realizó comparando las frecuencias esperadas de cada genotipo con las observadas utilizando un test de X^2 (Pearson). Se encontró que ambos grupos, casos y controles se encontraban en equilibrio, con un $p=0,775$ y $0,743$ respectivamente.

En segundo lugar se realizó el análisis de asociación del polimorfismo con la condición en estudio (infección por HSV-2). Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo, junto al análisis de asociación de estos se muestran en las tablas 1 y 2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los distintos grupos.

Finalmente describimos las características sociodemográficas de los pacientes, en grupo de casos y controles (Tabla 3).

Características	Casos	Controles	<i>p-value</i>
Edad (años)	39,07	35,25	0,004
Sexo			
• femenino	25	17	0,025
• masculino	163	47	
Estado civil			
• soltero o separado	127	35	0,05
• casado o conviviente	61	28	
Orientación sexual			
• heterosexual	44	37	0,0001
• homosexual	104	22	
Otras ITS			
• sí	127	29	0,002
• no	61	32	
Tiempo de diagnóstico HIV (meses)	73,7	57,5	0,04
CD4 (promedio)	402,5	302,3	0,02

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes del estudio

En los siguientes parámetros no se encontraron diferencias significativas: edad de primera relación sexual, número de parejas, número de parejas sexuales, número de parejas sexuales el último año y carga viral.

Todos los pacientes del grupo casos (HSV-2(+)/HIV+) tenían serología positiva para HSV-1 y todos los pacientes del grupo control (HSV-2(-)/HIV+) eran negativos

para la infección por HSV-1, de acuerdo a un estudio previo realizado en el Programa de Virología

Finalmente, en lo referente a características sociodemográficas asociadas al alelo A, se consideraron sexo y otras ETS. No hubo diferencias significativas en cuanto al sexo ($p=0,6947$). Si hubo diferencias significativas en cuanto a la presencia de otras ETS ($p=0,02$).

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la posible asociación del polimorfismo -17426 A/G en el gen TBX21, un gen fundamental en la activación de la RI innata y RI adquirida de tipo celular, con la predisposición a ser infectado por HSV-2. . Pese a que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de casos y controles, el alelo A fue más frecuente en el grupo de casos (infectados por HSV-2) mostrando una tendencia de que éste pueda representar un factor de riesgo para la infección por HSV-2 en pacientes HIV(+). Asimismo sólo se encontró genotipo homocigoto AA en los casos. Además los intervalos de confianza son extremadamente amplios (poco precisos) y quizás esto podría modificarse con una muestra de estudio mayor.

Nuestros resultados muestran que la frecuencia del alelo A en los pacientes HIV (+) estudiados es menor que la descrita en estudio de población sueca infectada por HSV-2. Cabe destacar que la frecuencia alélica descrita en población europea en SNP database (12%) es significativamente mayor que en otras poblaciones tales como asiáticos (4,3%) y africanos (3,8%) (32). Si bien la frecuencia de este SNP en población latinoamericana no está descrita es esperable que sea una situación intermedia entre población europea y asiática (8,45% estimado), lo cual parece concordante con nuestros resultados.

En segundo lugar se encontró que ambos grupos, casos y controles, se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto quiere decir que el método de genotipificación es confiable. Asimismo indica que la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurrieron fenómenos distorsionadores, como mutaciones o selección de un alelo.

El estudio de asociaciones de SNP con entidades patológicas en el humano tiene un alto potencial de aplicación clínica. La identificación de marcadores genéticos asociados a determinados cuadros clínicos permitiría avanzar tanto en el diagnóstico, como en el pronóstico de estas enfermedades y eventualmente entregaría posible blancos de nuevos tratamientos. De esta manera debemos preguntarnos cuales podrían ser las implicancias del polimorfismo -17426 A/G en el gen TBX21 en la función de este gen. Como hemos especificado anteriormente, este polimorfismo

se ubica en la región 3' no codificante y es transcrito a RNAm. Aunque es prematuro implicar una función sin pruebas experimentales podríamos especular ciertas consecuencias. Podríamos teorizar que este polimorfismo podría afectar la estabilidad del RNAm y consecuentemente afectar la función de T-bet. Dentro de este razonamiento se han descrito unas moléculas llamadas microRNA, éstas se asocian a la región 3' no codificante de los RNAm diana y son capaces de modificar la expresión génica. Los microRNA son hebras monocatenarias, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, y se cree que regulan casi un tercio del genoma humano. Los microRNA regulan la expresión génica uniéndose, la mayoría de las veces, a regiones 3' no codificantes en los genes blanco (33,34). Polimorfismos funcionales en las regiones 3' no codificantes en varios genes han sido asociados con enfermedades, afectando la expresión génica. Algunos de estos polimorfismos en estas regiones podrían interferir con la función de estos microRNA. Los mecanismos mediante los cuales estos polimorfismos pueden afectar la expresión génica no se conocen bien. Se ha sugerido que estos polimorfismos podrían interferir con elementos regulatorios que se unen a zonas no codificantes con pérdida de la regulación de este gen provocando disminución o aumento de la traducción (33,34). Por ejemplo, un SNP en el extremo 3' no codificante de la trombina es una causa de trombofilia hereditaria (35). La alfa-talasemia se asocia a un SNP en esta misma región en el gen de la alfa globina (36). También SNPs en regiones 3' no codificantes se asocian a infección por HPV (37). De esta forma parece posible que el polimorfismo -17426 A/G en el gen TBX21 pueda alterar la estabilidad del RNAm o algún sitio blanco de elementos regulatorios disminuyendo la traducción de T-bet. Esto llevaría a una deficiente activación de la respuesta inmune de tipo Th1, con disminución de la producción de IFN γ y disminución de la función de elementos efectoros. Esto podría explicar la mayor susceptibilidad a la infección por HSV-2 en pacientes portadores del alelo A.

En el análisis de los grupos casos y controles se encontraron diferencias significativas en cuanto a edad, sexo (masculino), estado civil, orientación sexual homosexual, otras ITS, tiempo de diagnóstico de HIV y conteo de CD4. Esto parece concordante con lo descrito en la literatura, pues muchos de estos parámetros constituyen factores de riesgo para la infección por HSV-2 (1).

Por último en lo que concierne a las características sociodemográficas asociadas al alelo A, se consideraron sexo y otras ITS. No hubo diferencias significativas en cuanto al sexo y si las hubo en relación a la presencia de otras ITS. Esto podría explicarse por lo anteriormente mencionado, es decir que por la presencia de este alelo se produzca una respuesta inmune menos eficiente y por lo tanto se presenten más infecciones. Dado que por azar todos los casos fueron HSV-1 (+), y todos los controles HSV-1 (-), no se descarta que este polimorfismo pueda tener una relación con la infección por HSV-1. No obstante debemos recalcar la gran prevalencia de infección por HSV-1 en nuestra población, por lo cual no es de extrañar que gran parte de la población infectada por HSV-2 pueda ser portadora también de HSV-1. Una forma de enfrentar la interrogante de la eventual relación del polimorfismo estudiado con este segundo agente viral sería realizar un nuevo estudio con distintos grupos de estudio para aislar las diferentes variables tanto en población HIV (+), como en población general. Sería necesario ampliar este estudio incluyendo grupos que fueran HSV-2 (+)/ HSV-1(-) y HSV-2(-)/ HSV-1(+).

CONCLUSIONES

1. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia del alelo A del polimorfismo rs17244587 del gen TBX21 con la infección por HSV-2 en pacientes HIV(+).
2. Dado que la distribución de los polimorfismos genéticos es variable entre distintas poblaciones, es necesario identificar los polimorfismos prevalentes en nuestra población (latinoamericana).
3. Existe una asociación entre el alelo A del polimorfismo rs17244587 en el gen TBX21 con la presencia de otras ITS en los pacientes estudiados.
4. Dado que por azar todos los casos fueron HSV-1 (+), y todos los controles (-), no se descarta que este polimorfismo pueda tener una relación con la infección por HSV-1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brugha R, Keermaekers K, Renton A, Meheus A (1997) Genital herpes infection: A review. *Intern J Epidem* 26:698-709.
2. Fleming D, McQuillan G, Johnson R, Nahmias A, Aral O, Lee F, et al (1997) Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *N Engl J Med* 337: 1105-1111.
3. Yahya-Malima K, Evjen-Olsen B, Matee M, Fylkesnes K and Haarr L (2008) HIV-1, HSV-2 and syphilis among pregnant women in a rural area of Tanzania: Prevalence and risk factors. *BMC Infectious Diseases* 8:75-81.
4. Gottlieb S, Douglas J, Schmid D, Bolan G, Latesta M, Malotte C et al. (2002) Seroprevalence and correlates of herpes simplex virus type 2 infection In five sexually transmitted-disease clinics. *J infect Dis* 186: 1381-1389.
5. Schacker T (2001) The role of HSV in the transmission and progression of HIV. *Herpes* 8:46-49.
6. Looker K, Garnett G, Schmitd G. (2008) An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex type 2 infection. *Bulletin of the World health Organization* 86:805-813.
7. Martínez M, Saavedra T, Ojeda J, Suárez M (1996) Caracterización antigénica y genómica de virus Herpes simplex aislados de dobles infecciones Genitales. *Rev méd chile* 124: 153-159.
8. Boletín n°4 de enfermedades de transmisión sexual. Diciembre 2001. Gobierno de Chile. Ministerio de salud. Comisión nacional de sida área ETS. En: <http://www.conasida.cl>
9. Martínez M, Navarrete N, Santander E, Garmendia M, Gubelin W (2005) Seroprevalencia de la infección por virus herpes simplex tipo 2 en pacientes atendidos en centros de referencia de ETS de Santiago. *Rev Méd Chile* 133: 302-306.
10. Luzoro A, Martínez M, Santander E, Gubelin W, Afani A (2009) Herpes simplex virus type 2 incidence in HIV positive patients of the north area of Santiago, Chile. En: 67th Annual Meeting of the American Academy of Dermatology at the Moscone Convention Center, San Francisco, California.

11. Roizman B, Sears A. Herpes simplex viruses and their replication. En: Fields B, Knipe D, Howley P. Fields Virology. 3° Edición. Philadelphia. Lippincott-Raven. 1996. 2231-2242
12. Forsgren M, Klapper P. Herpes simplex virus type 1 and 2. En: Zuckerman A., Banatvala J., Schoub B., Briffiths P., Mortimer P. Principles and practice of clinical virology. 6° Edición. West Sussex. John Wiley and sons Ltd. 2009. 95-131
13. Wald A, Link K (2002) Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis. J Infect Dis. 185:45-52.
14. Celum C (2004) Interaction between HSV and HIV. Herpes 11(S1): 36-45.
15. Celum C, Levine R, Weaver M, Wald A (2004) Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble. Bulletin of the World Health Organization 82: 447-453.
16. Rasmussen S, Sorensen L, Malmgaard L, Ank N, Baines J, Chen Z, Paludan S (2007) Type I Interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-Like Receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. J virol 81(24):13315–13324
17. Harandi AM, Svennerholm B, Holmgren J y Eriksson K (2001) Differential roles of B-cells and IFN-g-secreting CD41 T-cells in innate and adaptive immune control of genital HSV-2 infection in mice. J Gen Virol 82:845–853.
18. Koelle D, Posavad C, Barnum G, Johnson M, Frank J, Corey L (1998) Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. J Clin Investig 101:1500–1508.
19. Svensson A, Nordstrom I, Sun J, Eriksson K (2005) Protective Immunity to Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Infection Is Mediated by T-bet. J. Immunol. 174:6266-6273
20. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Mecanismos efectores de la inmunidad celular. En: Abbas A., Lichtman A., Pober J. Inmunología celular y molecular. 5° edición. Ed. W. B. Saunders. 2004.303-19.

21. Kulkarni A, Ravi D, Singh K, Rampalli S, Parekh V, Mitra D, Chattopadhyay S (2005) HIV-1 Tat modulates T-bet expression and induces Th1 type of immune response. *Biochem Biophys Res Commun* 329:706-712.
22. Watson-Jones D, Weiss H, Rusizoka M, Baisley K (2007) Risk factors for herpes simplex virus type 2 and HIV among women at high risk in northwestern Tanzania: preparing for an HSV-2 intervention trial. *Acquir Immune Defic Syndr* 46(5): 631–642.
23. Jennings J, Louis T, Srikrishnan E, Mayer S, Solomon K (2008) Geographic prevalence and multilevel determination of community-level factors associated with herpes simplex virus type 2 infection in Chennai, India. *Am J Epidemiol* 167:1495–1503.
24. Moss N, Harper C, Ahrens K, Scott K, Kao S, Padian N, Raine T (2007) Predictors of incident herpes simplex virus type 2 infections in young women at risk for unintended pregnancy in San Francisco. *BMC Infect Dis* 7:113-114.
25. Kimman T, Janssen R, Hoebee B (2007) Effect of genetic polymorphisms on the susceptibility to and course of infectious diseases. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 151:519-524.
26. Iniesta R, Guinó E, Moreno V (2005) Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 19(4):333-341.
27. Dong L, Chen M, Zhang Q, Li L, Xu X, Xiao W. (2006) T-bet/GATA-3 ratio is a surrogate measure of Th1/Th2 cytokine profiles and may be novel targets for CpG on treatment in asthma patients. *Chin Med J* 119:1396-1399.
28. Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Maeda A, Ishizaki K, et al. (2006) Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 174:142-151.
29. Finotto S, Neurath M, Glickman J, Qin S, Lehr H, Green F et al. (2002) Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-338.
30. Juedes A, Rodrigo E, Togher L, Glimcher L, Von Herrath, M (2004) T-bet controls autoaggressive CD8 lymphocyte responses in type 1 diabetes. *J Exp Med.* 199:1153-1162.

31. Svensson A, Bergin A, Lowhagen G, Tunbach P, Bellner L, Padyukov L, Erikson K (2008) A 3'-untranslated region polymorphism in the TBX21 gene encoding T-bet is a risk factor for genital herpes simplex virus type 2 infection in humans. *J Gen Virol* 89: 2262-68.

32. SNP database. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=17244587. Consulta: 20 de marzo 2010.

33. Mishra PJ, Mishra P, Banerjee D, Bertino J (2008) MiRSNPs or MiR-polimorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell. *Cell cycle* 7:853-858.

34. Clinsky G (2009) Human genome connectivity code links disease-associated SNPs, micrRNAs and pyknons. *Cell cycle* 8:925-930.

35. Gehring N, Frede U, Neu Yilik G, Hubdsdoerfer P, Vetter B, Henze M, Kulozik A (2001) Increased efficiency of RNAm 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Get* 28:389-392.

36. Conne B, Stutz A, Vassali J (2000) The 3' untranslated region of messenger RNS: A molecular "hotspot " for pathology? *Nat Med* 6:637-641.

37. Jeon S, Lambert P (1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1654-1658.