

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y CO-RECEPTORES  
EN CÉLULAS DE MUCOSA ENDOCERVICAL DE MUJERES  
INFECTADAS POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA  
HUMANA BAJO TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL**

**Por**

**PAULO LÓPEZ GUILLÉN**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad  
en Microbiología**

**Febrero, 2013**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y CO-RECEPTORES  
EN CÉLULAS DE MUCOSA ENDOCERVICAL DE MUJERES  
INFECTADAS POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA  
HUMANA BAJO TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL**

**Comité de tesis**

---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
Director de Tesis

---

**Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales**  
Secretario

---

**Dr. Juan Manuel Alcocer González**  
Primer vocal

---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Segundo vocal

---

**Dr. Gerardo del C. Palacios Saucedo**  
Tercer vocal

---

**Dr. Moisés A. Franco Molina**  
Suplente

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios nuestro Señor***

por la maravillosa oportunidad de vivir, por su amor,  
por las personas que ha puesto en mi camino.

### ***A mis padres***

***José López García (QEPD)***  
***y Ma. De Jesús Guillén Pérez***  
Por su infinito amor

### ***A mi esposa***

***Gloria Rocío Sánchez Amaya***  
***Y a mis hijas***  
***Paola y Andrea***

por su paciencia, amor, apoyo y comprensión  
Porque ustedes son parte indispensable de mi vida  
Las personas que más quiero y admiro.

## FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de investigación fue financiado:

Por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el proyecto titulado: **“Participación de las células dendríticas en la inmunopatogénesis de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana y en la co-infección por *Mycobacterium tuberculosis* (SEP-2004-C01-46101).**

Por el programa de apoyo a la investigación científica y tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León titulado **“Determinación de la expresión de CCR5 y CXCR4 en Mucosa Endocervical de mujeres infectadas con VIH” (Clave SA-1450-06).**

Por el apoyo brindado a la investigación científica de este trabajo por parte del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología de la UANL bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

## **ÁREA DE TRABAJO**

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en la Unidad de Infectología Molecular (UIMO) del Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. bajo la dirección general de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y de la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales.

## AGRADECIMIENTOS

***A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla***

Jefe del Depto. de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Agradezco la oportunidad que me ofreció y por haber tenido la confianza de apoyarme en la realización de esta tesis doctoral.

***A la Dra. Lydia G. Rivera Morales, al Dr. Juan Manuel Alcocer González, al Dr. Pablo Zapata Benavides, al Dr. Gerardo del C. Palacios Saucedo*** por su amistad y apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

***Al M. en C. José Manuel Vázquez Guillén, Q.B.P. Antonio Ramírez Pineda y a la Q.B.P. Patricia Amaya García*** por su ayuda y por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo y porque de alguna manera han contribuido en la realización de este trabajo.

***A todo el personal del:***

- ***Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL***
- ***Unidad de Infectología Ext. HGZR 45 IMSS Jalisco***
- ***Clínica de Displasias HGZR 45 IMSS Jalisco***

Que de alguna manera contribuyeron para que esta tesis llegara a su término.

**GRACIAS**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>NOMENCLATURA.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 Marco histórico.....	3
2.2 Definición de la enfermedad VIH/SIDA.....	5
2.3 Situación actual del VIH/SIDA.....	7
2.3.1 Situación mundial .....	7
2.3.2 Situación en México.....	9
2.4 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) .....	11
2.4.1 Estructura del VIH.....	11
2.4.2 Genoma.....	12
2.4.3 Ciclo de Replicación Viral .....	16
2.4.4 Clasificación del VIH-1.....	18
2.4.4.1 Subtipos virales.....	19
2.5 Inmunopatogénesis del VIH.....	24
2.5.1 Tropicismo e Infección a Órganos Linfáticos.....	27
2.5.2 Receptores de Quimiocinas. ....	27
2.5.3 Tropicismo celular del VIH (virus T tropic y M tropic) .....	29
2.5.4 Interacción CCR5/CXCR4 con el VIH. ....	30
2.5.5 Células Dendríticas: Células Presentadoras de Antígenos.....	31

2.5.6 Subpoblaciones de Células Dendríticas.....	32
2.5.7 Papel de las Células Dendríticas en la Infección por el <i>VIH-1</i> .....	33
2.5.8. Interacción Célula Dendrítica- <i>VIH-1</i> : <i>DC SIGN</i> .....	34
2.5.9 El VIH a nivel mucosa endocervical.....	36
2.6 Terapia antiretroviral.....	37
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 Objetivo general.....	40
4.2 Objetivos específicos.....	40
<b>5. ESTRATEGIA GENERAL .....</b>	<b>41</b>
<b>6. MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
6.1 Pacientes y toma de muestra.....	42
6.2 Evaluación de Carga Viral y Cuenta de Linfocitos T CD4.....	42
6.2.1 Carga Viral.....	42
6.2.2 Cuenta de CD4.....	43
6.3 Extracción de ARN.....	43
6.4 Síntesis de ADN Complementario.....	44
6.5 Análisis de la expresión mediante PCR en tiempo real.....	45
6.5.1 Diseño del Ensayo TaqMan.....	45
6.5.2 Preparación de las reacciones.....	46
6.5.3 Interpretación de resultados de PCR cuantitativo en tiempo real...	47
6.6 Análisis estadístico de la Expresión de CXCR4, CCR5 y DC-SIGN	47
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
7.1 Obtención y Clasificación de Muestras de Pacientes <i>VIH-1</i> +.....	48
7.2 Extracción, Calidad y Cuantificación de la Concentración del ARN Obtenido.....	49
7.3 Concentración de ARN obtenido.....	50
7.4 Concentración de <i>ADNc</i> sintetizado.....	50

7.5 Amplificación de GAPDH mediante PCR convencional.....	51
7.6 Amplificación por PCR tiempo real.....	52
7.7 Cuantificación de la expresión de los receptores mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .....	54
7.8 Análisis estadístico.....	57
<b>8. DISCUSION.....</b>	<b>59</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>64</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>65</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO.....</b>	<b>72</b>
<b>LOGROS ALCANZADOS.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Clasificación de la infección por el VIH y criterios de definición del SIDA para adultos y adolescentes.	6
2. Cifras estimadas de población infectada por VIH-1 a nivel mundial por región geográfica para el año 2011	8
3. Categorías de transmisión del VIH en México.	9
4. Casos de SIDA diagnosticados por Entidad federativa	10
5. Genes del Virus de Inmunodeficiencia Humana y sus funciones más importantes.	15
6. Diferentes Subpoblaciones de Células Dendríticas encontradas en sangre periférica y sus respectivos marcadores de superficie	33
7. Drogas antirretrovirales actualmente disponibles en el mercado	37
8. Secuencias de iniciadores y sondas diseñadas con base en las secuencias reportadas en el Banco de Genes para la cuantificación por PCR tiempo real	46
9. Historial Clínico y Epidemiológico de las Pacientes Infectados por el VIH-1	48
10. Concentración del ARN obtenido	50
11. Concentración del ADNc sintetizado	51
12. Análisis de la expresión del receptor DC-SIGN mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	54
13. Análisis de la expresión del coreceptor CCR5 mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .	55
14. Análisis de la expresión del coreceptor CXCR4 mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>PÁGINA</b>
1.	Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana	12
2.	Genoma del VIH-1.	16
3.	Ciclo de replicación del VIH-1.	18
4.	Clasificación del VIH	19
5.	Tipos, grupos y subtipos virales del VIH	20
6.	Distribución mundial de subtipos de VIH-1	21
7.	Árbol filogenético con los grupos y subtipos de VIH y VIS	23
8.	Historia Natural de la Infección por VIH	25
9.	Electroforesis en gel de agarosa para verificar la calidad de todos los ARN	49
10.	Amplificación de GAPDH mediante PCR convencional	51
11.	Amplificación por PCR en tiempo real del control endógeno rRNA 18s	52
12.	Amplificación por PCR en tiempo real del receptor DC-SIGN	52
13.	Amplificación por PCR en tiempo real del co-receptor CCR5	53
14.	Amplificación por PCR en tiempo real del co-receptor CXCR4	53
15.	Expresión relativa de los co-receptores CCR5, CXCR4 y del receptor DC-SIGN	58

## NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Acido desoxiribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARV	Virus Asociado al SIDA
CCR5	Receptor de Quimiocinas humano, CCR5
CD	Célula Dendrítica
CDC	«Centers for Disease Control». Centros para el control de enfermedades en Estados Unidos.
CD4	Linfocitos que expresan el receptor de superficie CD4 <sup>+</sup> , LT CD4
CDS	Complejo demencia del SIDA
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
Ct	Punto de Corte ( <i>Threshold Cycle</i> )
CV	Carga viral
CXCR4	Receptor de Quimiocinas humano, CXCR4
dNTP's	Dinucleótidos trifosfatados
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
gp120	Glicoproteína 120
IP	Inhibidores de la proteasa
ITIAN	Análogos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa
ITINN	Análogos no nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa
mL	Mililitro
ng	Nanogramo
ng/μL	Nanogramo por microlitro
NK	Células Asesinas Naturales ( <i>natural killers</i> )
nm	Nanómetros
ONUSIDA	Programa conjunto de las naciones unidas para el SIDA
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>polimerase chain reaction</i> )
R5	Virus con tropismo a macrófagos (Virus M tropic)
SI	Sistema inmune

SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema nervioso central
tm	Temperatura de alineamiento ( <i>Melting Temperature</i> )
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
UDI	Usuarios de drogas intravenosas
VIH-1	Virus de Inmunodeficiencia tipo 1
VIH-2	Virus de Inmunodeficiencia tipo 2
VIS	Virus de Inmunodeficiencia del simio
VRS	Virus Relacionado al SIDA
X4	Virus con tropismo a Linfocitos T (virus T tropic)
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Microgramo por microlitro
$\mu\text{L}$	Microlitro

## RESUMEN

Diferentes estudios han demostrado que los niveles de expresión de los receptores DC-SIGN y de los co-receptores CCR5 y CXCR4 pueden afectar la entrada viral y por ende promover la infección en mucosa cervical por VIH. El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles de expresión de ARNm del receptor DC-SIGN y de los co-receptores CCR5, CXCR4 en muestras de cérvix de mujeres mexicanas infectadas por VIH-1 y que adquirieron la infección por transmisión heterosexual. Para este estudio se incluyeron veintiséis mujeres infectadas por VIH que acudieron a un Centro de Salud especializado en enfermedades infecciosas. Se aisló el ARN del cuello uterino de todas y cada una de las pacientes y se analizó la expresión génica mediante PCR en tiempo real. Los niveles de expresión para ARNm de CCR5 (mediana 1,82; rango de 0.003 a 2.934) fueron más altos que los observados para el correceptor CXCR4 (0,79; 0,0061 a 3,312) y el receptor DC-SIGN (0,33; 0.006-532) ( $p < 0,05$ ). Se encontró una alta correlación entre los niveles de expresión del ARNm de estos tres receptores ( $r_s = 0,52$  a  $0,85$ ,  $p < 0,01$ ). Los niveles de expresión de los receptores de quimiocinas analizados en el cuello del útero son diferentes el uno del otro y también varía de mujer a mujer, y sugieren que la expresión de los receptores de quimiocinas en los tejidos genitales pueden estar jugando un papel en la transmisión del VIH.

## ABSTRACT

A number of studies have demonstrated that receptor and co-receptor expression levels may affect viral entry and promote cervical HIV infection. The aim was to evaluate the expression levels of CCR5, CXCR4 and DC-SIGN mRNA in a sample of heterosexual HIV infected Mexican women. We enrolled twenty-six HIV heterosexual infected women attending a local infectious diseases medical unit. RNA was isolated from the cervix and gene expression analysis was performed using real-time PCR. Expression rates for mRNA of CCR5 (median 1.82; range 0.003–2934) were higher than those observed for CXCR4 (0.79; 0.0061–3312) and DC-SIGN (0.33; 0.006–532) receptors ( $p < 0.05$ ). A high correlation was found between the mRNA expression levels of these three receptors ( $r_s = 0.52$  to  $0.85$ ,  $p < 0.01$ ). Expression levels of the tested chemokine receptors in the cervix are different from each other and also vary from woman to woman, and seem to support the suggestion that chemokine receptor expression in genital tissues may be playing a role in the HIV transmission.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fue descrito como una rara enfermedad en el inicio de la década de 1980. En aquella época los individuos que adquirieron esta enfermedad eran susceptibles a adquirir infecciones por microorganismos oportunistas poco comunes, como consecuencia del deterioro grave y progresivo del sistema inmune. En 1983 se identificó al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) como el agente etiológico de la enfermedad.

Desde su descubrimiento, la infección VIH-SIDA ha provocado una serie de cambios sociales, económicos y científicos a nivel mundial, puesto que se ha convertido en una de las pandemias más preocupantes. Una de las vías de transmisión más importantes del *VIH-1* es la sexual, donde pequeñas cantidades de virus cruzan el epitelio mucoso alcanzando eventualmente el tejido linfoide donde establece una infección permanente. El punto central de la infección por VIH, es la interacción de la glicoproteína gp120 con los receptores CD4, CCR5 y CXCR4, presentes en las células diana como los linfocitos T, macrófagos, y otro tipo de células que posean estos receptores que los hace susceptibles de ser infectadas por este virus. Se ha demostrado que el sinergismo entre el receptor CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 son indispensables para llevar a cabo la fusión exitosa y el proceso infectivo.

Sin embargo hay otro tipo de células llamadas células dendríticas que abundan en superficies mucosas como la orofaringe, recto y la mucosa genital. La presencia de éstas, en las superficies mucosas y en sangre las identifica como una de las poblaciones celulares implicadas en el contacto temprano con el virus a través de uno de los receptores de membrana llamado *DC-SIGN* (“Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-Grabbing Nonintegrin”). Debido a la capacidad que presenta el *DC-*

*SIGN* para unirse con alta afinidad y transmitir el VIH-1, se contempla que este receptor también juegue un papel importante en la transmisión sexual del VIH.

En la actualidad existe un gran número de terapias antirretrovirales encaminadas a mejorar la calidad de vida de los pacientes, inhibiendo la eficiencia de infección del virus. El nivel de acción de las terapias es diverso, sin embargo va dirigido hacia puntos vitales en el proceso de infección. Existen drogas que inhiben la entrada del virus, bloqueando al receptor CD4 o a los correceptores CCR5 y CXCR4. En el mismo grupo se encuentran aquellas que inhiben la fusión de membranas, interfiriendo con la glicoproteína gp41 del VIH-1. Además existen numerosas drogas que alteran el ciclo de replicación viral, una vez que la infección se ha llevado a cabo. Las cuales incluyen a la gran mayoría de terapias antirretrovirales a nivel comercial que se aplican en la actualidad.

A excepción de los inhibidores de la fusión, la gran mayoría de las terapias antirretrovirales que se aplican en la actualidad van encaminadas a la inhibición de la replicación viral en la fase intracelular. Sin embargo poco se sabe sobre la influencia de tales terapias en la modulación de los niveles de la expresión de estos receptores y correceptores celulares.

Por todo lo anterior, es importante determinar la expresión de los receptores *DC-SIGN* y de los correceptores CCR5 y CXCR4 presentes en las células de la mucosa cervical de mujeres con infección por VIH bajo terapia antirretroviral, ya que cualquier variación en ellos podrían correlacionar el impacto de la efectividad o bien de la falla de las terapias antirretrovirales. De tal manera que el éxito para prevenir o tratar enfermedades de transmisión sexual podría depender de un mejor conocimiento de la interacción inmunológica de estos receptores y correceptores con el VIH a nivel de la mucosa cervical.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Marco Histórico

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) surgió como un nuevo síndrome que se presentaba en hombres jóvenes homosexuales de la cual no se tenía conocimiento, los primeros casos fueron reportados en el año 1981, éstos presentaban infecciones por microorganismos oportunistas y cierto tipo de neoplasias. Este síndrome se caracterizaba por provocar un deterioro grave, progresivo e irreversible del sistema inmune (SI) llevando al paciente invariablemente a la muerte (CDC. Morb Mortal Wkly Rep. 1981).

En el año de 1982 este síndrome fue denominado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) por el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC) de Atlanta, GA, Estados Unidos de América (EUA) (Morison, 2001). El significado del acrónimo SIDA hace referencia a un conjunto de diversas patologías en el huésped provocadas por una inmunodeficiencia celular.

El agente etiológico del SIDA se conoció más tarde en 1983 cuando Luc Montagnier *et. al* del Instituto Pasteur en Francia aislaron un retrovirus de sangre periférica de un paciente que presentaba linfadenopatía generalizada por lo que lo denominaron virus asociado a la linfadenopatía (VAL) (Barré-Sinussi *et al.*, 1983). En 1984 Robert Gallo *et. al.* en el Instituto Nacional de Salud (NIH) y Levy en EE.UU. lo nombraron HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus*) por su tropismo a los linfocitos T humanos (Gallo RC, Montagnier L.2003). Fue hasta 1986 cuando el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV) de la Sociedad Internacional de Microbiología acordó

denominarlo “Virus de la Inmunodeficiencia Humana” (VIH) y en ese mismo año se detectó en países de África Occidental un segundo retrovirus humano en pacientes afectados de SIDA, que fue denominado VIH-2, para distinguirlo del clásico agente del SIDA (VIH-1) (Vidal-Lampurdanés and Pumarola-Suñé, 1996).

Los primeros casos reportados en 1981 fueron descritos en pacientes jóvenes homosexuales y bisexuales los cuales presentaban una infección poco común causada por *Pneumocystis carinii* (actualmente conocido como *P.jirovecii*) (Helweg-Larsen J. 2004) un hongo que parasita los pulmones y dificulta la respiración causando un cuadro de neumonía. Hasta ese momento, *P. jirovecii* se había relacionado con pacientes que presentaban inmunodeficiencia celular congénita grave, leucemias, inmunosupresión, y pacientes que han sido sometidos a trasplantes.

Tiempo después se reportaron 26 casos de pacientes homosexuales, que padecían un cáncer maligno llamado Sarcoma de Kaposi (SK), limitado a varones de edad avanzada y ascendencia mediterránea o judía en Europa y EUA, por lo que la incidencia de este trastorno en pacientes jóvenes resultó ser extraña y preocupante (CDC. MMWR, 1981).

El desarrollo de las patologías mencionadas, solo se presentaba en individuos con un deterioro inmunológico celular progresivo y no en pacientes sanos. A la fecha, la mayoría de los pacientes infectados con VIH, han sido víctimas de una gran variedad de patógenos oportunistas de origen viral, bacteriano, fúngico y por protozoos, causando infecciones graves recurrentes. La importancia de la infección por VIH, radica en la disminución de la capacidad de respuesta del sistema inmune (SI), como consecuencia del efecto lítico producido en las células infectadas. Además es capaz de dañar el sistema nervioso central (SNC), producir efectos malignos y el síndrome de desgaste asociado a SIDA.

## 2.2. Definición de la enfermedad VIH/SIDA

El Centro de Control de Enfermedades (CDC, *Centers of Disease Control and Prevention*) ha creado un sistema de clasificación, para definir los estadios de infección de VIH que desencadena posteriormente a SIDA (CDC. MMWR, 1992).

El agente etiológico es el retrovirus denominado VIH, que infecta principalmente a células que poseen el receptor de superficie CD4+ como los linfocitos T cooperadores, por la afinidad que existe entre el virus y el marcador de superficie CD4. Los linfocitos T CD4+ desarrollan funciones vitales dentro del sistema inmunológico, por lo tanto la pérdida de las funciones, provocada por la infección resulta en un deterioro progresivo del Sistema Inmune.

Es por esto que la historia natural de la infección por VIH comienza con un estadio asintomático hasta provocar severas inmunodeficiencias, infecciones oportunistas graves y cáncer. Debido a lo anterior, el CDC clasifica a las personas infectadas de acuerdo a tres condiciones clínicas del paciente y tres rangos de cuentas de Linfocitos T CD4+ que presentan (Tabla 1).

Los criterios para designar a personas mayores de 13 años como VIH+ son los siguientes: (CDC.MMWR, 1992)

- Detectar la presencia de anticuerpos anti-VIH, mediante inmunoensayos enzimáticos, inmunofluorescencia y Western Blot.
- Identificación directa del virus en tejidos del paciente mediante aislamiento viral.
- Detección de antígenos del VIH.
- Los resultados positivos de otras pruebas altamente específicas pueden ser incluidos como un criterio válido de infección.

Cuando el paciente es diagnosticado como VIH<sup>+</sup>, su progresión a SIDA es determinada por el sistema de clasificación de CDC. Dentro de las categorías según las cifras de LT CD4, se hace referencia a 3 categorías, la primera de ellas es aquella en donde los pacientes presentan números iguales o mayores a 500 células/mL, la segunda categoría es cuando presentan de 200-499 células/ $\mu$ L y por último aquellos pacientes que presentan menos de 200 células/ $\mu$ L (CDC.MMWR, 1992).

**Tabla 1. Clasificación de la infección por el VIH y criterios de definición del SIDA para adultos y adolescentes (> 13 años).**

Cuentas de CD4	Categorías clínicas		
	A	B	C
<b>Categoría según la cifra de linfocitos CD4</b>			
$\geq 500 / \mu\text{L}$	A1	B1	C1
200 - 499/ $\mu\text{L}$	A2	B2	C2
$< 199/\mu\text{L}$	A3	B3	C3

Tomado de: CDC. MMWR. 1992

En cuanto a las categorías clínicas, la **Categoría A** consiste en una o más de las siguientes condiciones:

- Infección asintomática por VIH
- Linfadenopatía generalizada persistente.
- Infección aguda por VIH acompañada por alguna enfermedad.

**Categoría B.** Se incluyen a pacientes que presentan condiciones sintomáticas, además de contar con la infección por VIH e inmunodeficiencia celular. Ejemplos de condiciones clínicas incluidas en la categoría B.

- Angiomatosis bacilar.

- Candidiasas orofaríngea o vulvovaginal persistente.
- Displasia cervical.
- Fiebre (38.5 °C) o diarrea con duración de hasta un mes.
- Neuropatía periférica.

Dentro de la **Categoría C**, se incluyen a aquellos pacientes que presentan condiciones presentes en las categorías A y B, además de una inmunodeficiencia celular progresiva. Resultado de una disminución severa en la calidad de respuesta del sistema inmune, al disminuir las cuentas de linfocitos T (menos de 200 células/  $\mu$ L).

A continuación se muestran las condiciones más representativas de la categoría C:

- Coccidioidomicosis diseminada o extrapulmonar.
- Criptococosis extrapulmonar.
- Enfermedad por Citomegalovirus.
- Retinitis por Citomegalovirus.
- Encefalopatía por VIH.
- Histoplasmosis diseminada o extrapulmonar.
- Sarcoma de Kaposi.
- Linfoma de Burkitt
- Infección por *Mycobacterium tuberculosis*.
- Septicemia por *Salmonella*, recurrente.
- Síndrome de desgaste por VIH.

## **2.3 Situación actual del VIH/SIDA**

### **2.3.1. Situación Mundial del VIH**

El reporte global de la epidemia causada por el VIH en el 2011, se estima que existían 34. 2millones de personas viviendo con el VIH-1, de los cuales 30.7 millones eran adultos, 16.7 millones mujeres, y 3.4 millones eran niños menores de 15 años, en

ese mismo año, fueron reportadas 2.5 millones de personas nuevamente infectadas, de las cuales fueron reportadas más de siete mil nuevas infecciones por VIH por día, seis mil fueron adultos mayores a los 15 años de edad y de éstos el 47 % eran mujeres y el 41% eran individuos jóvenes con edades entre los 15-24 años de edad. La epidemia había causado la muerte de 1.7 millones de personas para el año 2011. La región más afectada por el VIH es el África Subsahariana (Tabla 2) (ONUSIDA, 2011).

**Tabla 2. Cifras estimadas de población infectada por VIH-1 a nivel mundial por región geográfica para el año 2011**

<b>Zona geográfica</b>	<b>Población Infectada</b>
1. América del Norte,	1.400,000
2. Región del Caribe	230,000
3. América del centro y sur	1,400,000
4. Europa Occidental y Central	860,000
5. África del Norte y Oriente Medio	330,000
6. África Subsahariana	23,500,000
7. Europa Oriental y Asia Central	1,500,000
8. Asia oriental	830,000
9. Asia sudoriental y del sur	4,200,000
10. Oceanía	53,000

Fuente: ONUSIDA, 2011.

### 2.3.2. Situación en México

La epidemia del SIDA en México es predominantemente sexual, ya que este tipo de transmisión ha sido la causante de poco más del 90% de los casos acumulados de SIDA (Tabla 3). Con anterioridad, el foco de la epidemia se concentraba fundamentalmente en el grupo de homosexuales, con poco más de 50% del total de casos acumulado. Sin embargo, se está presentando una tendencia ascendente, en los últimos años en los casos de transmisión de tipo heterosexual (CENSIDA, 2011).

**Tabla 3. Categorías de transmisión del VIH en México.**

Categorías	Porcentaje
Homosexuales (HSH)	36.9 %
Bisexual	22.0 %
Heterosexual	37.3 %
Sexual	96.2 %
Transfusión sanguínea	1.0 %
Hemofílico	0.4 %
Donador	0.3 %
Drogas Intravenosas	1.6 %
Exp. Ocupacional	0.0 %
Homosexuales y Uso drogas	0.5 %
Perinatal	2.30%
Se desconoce*	40.1 %

Fuente. CENSIDA, 31 Dic 2011

\* La categoría “Se desconoce” se excluyó del cálculo de los porcentajes, sin embargo dicha cifra se muestra para conocer su magnitud.

Desde el inicio de la epidemia y hasta el 30 de Septiembre del 2012, en el Registro Nacional de Casos de SIDA se han registrado de manera acumulada en México 159,411 mil casos de SIDA, de los cuales el 82.1 % son hombres y el 17.9 % son mujeres. Por cada cinco casos acumulados de VIH/SIDA en hombres se ha observado un caso en mujeres; y en los casos sexuales esta relación se conserva. Es importante destacar que el 65.7 % de los casos acumulados y que constituyen el grupo más afectado, corresponden a personas en edades laboralmente productivas que incluyen desde los 25 a los 44 años de edad. El número de defunciones reportados en el año 2011 fue de 4,769.

Con respecto a los casos notificados de SIDA de acuerdo a la Entidad Federativa los primeros cinco lugares lo ocupan: Distrito Federal, México, Veracruz, Jalisco y Puebla respectivamente, las cifras se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Casos de SIDA notificados por Entidad Federativa**

Lugar	Entidad Federativa	Casos acumulados
1	Distrito Federal	24,934
2	México	17,245
3	Veracruz	14,653
4	Jalisco	12,234
5	Puebla	7,166

Fuente: CENSIDA, 2012

En México la epidemia del VIH-SIDA se encuentra relativamente estable, concentrada en grupos de población que tienen prácticas de riesgo; como hombres que tienen sexo con hombres, sexoservidoras y usuarios de drogas intravenosas. Sin embargo el reto epidemiológico consiste en evitar que la epidemia se generalice a la población en general.

## 2.4 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

### 2.4.1 Estructura del VIH

El VIH es un retrovirus esférico, pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Lentiviridae*, cuyos miembros se caracterizan por poseer la capacidad de infectar células del sistema inmunológico y de ser causa de infección persistente que se manifiesta de forma clínica después de prolongados períodos de tiempo (Vidal-Lampurdanés y Pumarola-Suñé, 1996).

El virus tiene un tamaño variable de 100-120 nm, presenta dos copias de ARN monocatenario de polaridad positiva, consta de una envoltura lipídica, una matriz y una nucleocápside central donde se localiza el material genético y las enzimas necesarias para el ciclo viral, aproximadamente tiene 9.5 kb de longitud. La envoltura lipídica del VIH proviene de la membrana de las células infectadas y contiene las glicoproteínas gp120 y gp41, que son consideradas como proteínas principales que interactúan con el receptor CD4<sup>+</sup> de los linfocitos T (LT). En la parte interna de la membrana lipídica se localiza la matriz formada por la proteína p17, mientras que la nucleocápside está formada por la proteína p24. También contiene la proteína p7, que se encuentra unida al ARN viral. Además del material genético, la nucleocápside contiene las enzimas: integrasa, proteasa y transcriptasa inversa indispensables para la replicación viral (Figura 1).

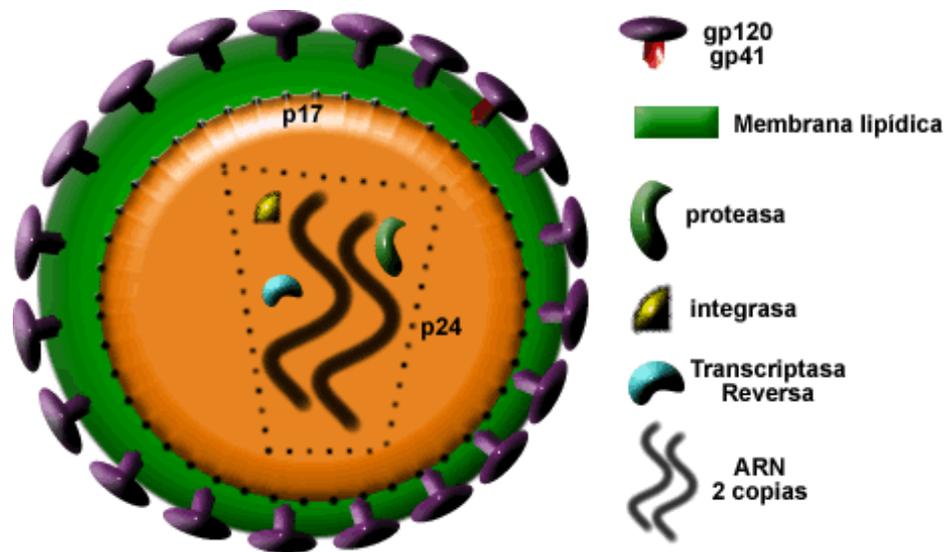


Figura 1. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana

### 2.4.2 Genoma

El genoma del VIH-1 contiene otros genes además de los que codifican para proteínas estructurales y enzimáticas antes mencionados; dos genes reguladores *tat* y *rev*, y genes que codifican para proteínas accesorias y regulatorias *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *vpx* y *tev* (Tabla 5) Vidal-Lampurdanés y Pumarola-Suñé, 1996, Kuiken, C. *et. al.* 2011.

**Proteínas estructurales.** Los productos de los genes *env*, *gag* y *pol*, contienen la información necesaria para las proteínas estructurales y constitutivas del nuevo virión.

- **Env**, codifica para gp160, el cual es precursor de las glicoproteínas de superficie gp120 y gp41 localizadas en la membrana plasmática.
- **Gag**, codifica las proteínas de la cápside (antígenos de grupo específicos), cuyo precursor es la proteína p55, es escindida por la proteasa viral para generar a p17, p24, p7 y p9. La proteína p17, forma parte de la matriz, p24 forma parte de la

cápside del núcleo viral, p7 esta presente en la nucleocápside, siendo una proteína de unión al ARN, mientras que p6 se une a *Vpr*.

- ***Pol***, codifica para las tres enzimas localizadas en el núcleo de la cápside: *transcriptasa inversa* (p66), *integrasa* (p31) y *proteasa* (p15), a partir de la poliproteína precursora Gag-Pol, procesada por la proteasa viral. La *transcriptasa inversa* realiza la retrotranscripción del ARN viral a ADN bicatenario. La enzima *integrasa*, integra el ADN proviral al genoma de la célula huésped. La enzima *proteasa*, realiza el corte y maduración de las proteínas producidas por ***gag*** y ***pol***.

**Proteínas reguladoras.** Modulan los pasos transcripcionales y post-transcripcionales de la expresión génica del virus y son necesarias para su propagación.

- ***Tat*** (p16/p14) actúa como transactivador de la expresión génica del VIH. Junto con ***Rev***, actúa como factor viral regulador del VIH, mejorando el proceso de transcripción. En el núcleo celular, ***Tat*** se une a la secuencia ***Tar*** (secuencia blanco para la transcripción viral), así comienza el inicio de la transcripción y elongación a partir del promotor LTR (***Long Terminal Repeat***), el cual indica el inicio y el final de todos los genes del VIH.
- ***Rev*** (p19) es el segundo factor regulador del VIH, es una fosfoproteína de 19 kDa, localizada en el núcleo/nucleolo celular. Actúa como un factor de estabilidad y sirve para el transporte del ARNm viral fuera del núcleo. Para llevar a cabo su función ***Rev*** recicla su localización del núcleo al citoplasma y viceversa. ***Rev*** es considerada la proteína reguladora más conservada en los lentivirus.

**Proteínas accesorias o auxiliares.** Son proteínas adicionales asociadas y no asociadas al virión producidas por el VIH.

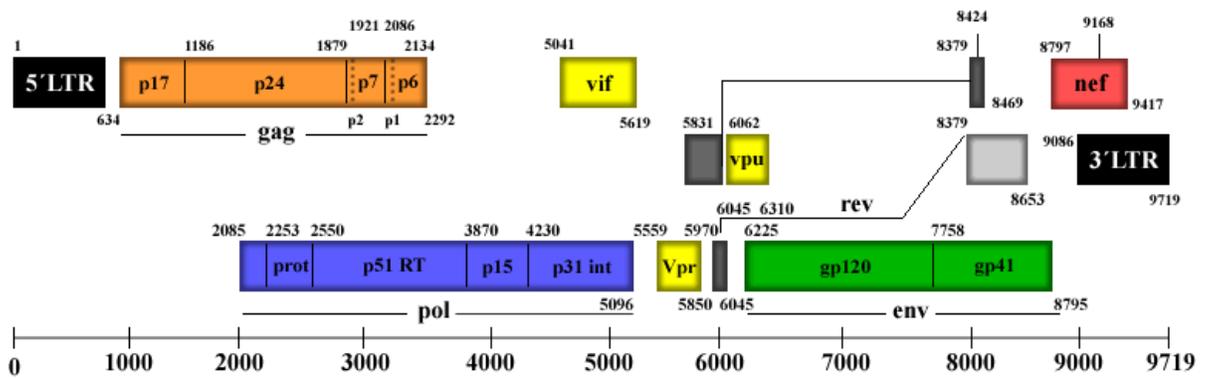
- *Nef* (p15-p27), es una de las primeras proteínas producidas en células infectadas, además de ser la más inmunogénica de las proteínas accesorias, su principal función es mantener elevadas las cargas virales. También promueve la regulación negativa de CD4 y del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (**M**ayor **H**istocompatibility **C**omplex class I), e incrementa la infectividad viral.
- *Vif* (*Viral Infectivity Factor*) (p23), es una proteína de aproximadamente 23 kDa. Promueve la maduración del virión e infectividad pero no la producción viral.
- *Vif* es una proteína citoplasmática presente en dos formas, citolítica soluble y asociada a membrana. Es su forma asociada a membrana, *Vif* es una proteína periférica de membrana altamente asociada al lado citoplasmático de las membranas celulares.
- *Vpr* (*Viral Protein R*) (p10-15), es una proteína de 96 aminoácidos (14 kDa) la cual esta incorporada dentro del virión. Interactúa con p6 y está localizada en el núcleo. Promueve la localización nuclear del complejo de reintegración, inhibe la división celular, transactiva genes celulares e induce la diferenciación celular.
- *Vpu* (*Viral Protein U*) (p16), promueve la degradación de CD4 en el retículo endoplásmico y la liberación extracelular de las partículas virales.

**Tabla 5. Genes del VIH y sus funciones más importantes.**

<b>GEN</b>	<b>PROTEÍNA</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<i>env.</i>	<b>Gene que codifica para componentes de envoltura</b>	
	gp160	Glicoproteína precursora
	<b>gp120</b>	Glicoproteína de la envoltura
	gp41	Glicoproteína que participa en la interacción con receptores y correceptores y fusión de membranas
<i>gag</i>	<b>Gene que codifica para componentes centrales</b>	
	p55	Precursor
	CA, p24	Proteína de la nucleocápside
	MA, p17	Proteína de la matriz
	NC, P7	Ribonucleoproteínas asociadas al ARN viral
	p6	Se une a Vpr
<i>pol</i>	<b>Gene que codifica para componentes enzimáticos virales</b>	
	Transcriptasa reversa, (TR) p51/ p66	Retrotranscripción del genoma viral con actividad RNAasa
	Integrasa, (IN) p31	Integración del genoma viral retrotranscrito
	Proteasa (PR), p15	Procesamiento de proteínas virales que forman la estructura del virión.
	<b>Genes reguladores</b>	
<i>tat</i>	Tat, p16/p14	Transactivación
<i>rev</i>	Rev, p19	Regulación del transporte y procesamiento del ARN
	<b>Genes que codifican para proteínas accesorias y/o auxiliares</b>	
<i>nef</i>	Nef, p25/p27	Retrotranscripción; infectividad.
<i>vif</i>	Vif, p23	Infectividad viral
<i>vpr</i>	Vpr, p10-15	Transactivador
<i>vpu</i>	Vpu, p16	Promueve la liberación extracelular de viriones

Fuente: Kuiken C. HIV Sequence Compendium 2011

El genoma del VIH-1 (Figura 2) está flanqueado el provirus integrado por dos regiones *LTR* (*Long Terminal Repeat: 5' a 3'*), la secuencia del VIH consta de aproximadamente 9,719 pb, contiene regiones reguladoras importantes, especialmente para la iniciación de la transcripción y poliadenilación. La organización genómica del VIH-1 es similar a la de otros retrovirus, e incluye los genes que codifican para su estructura y proteínas enzimáticas *gag*, *pol* y *env*.



Fuente: Kuiken C. HIV Sequence Compendium 2011

Figura 2. Genoma del VIH-1.

### 2.4.3 Ciclo de Replicación Viral

**Unión y fusión.** La unión del VIH-1 con los Linfocitos T/Macrófagos requiere la interacción del loop V3 (asa *Variable 3*) presente en la glicoproteína de superficie gp120 del VIH con el receptor CD4<sup>+</sup>, además de la interacción con los receptores de quimiocinas CCR5/CXCR4. La unión de gp120-CD4<sup>+</sup> y el receptor de quimiocinas CCR5/CXCR4 genera un cambio conformacional en gp120, la anterior expone a la glicoproteína transmembranal gp41, lo que promueve la fusión de membranas entre el VIH y la célula diana y, libera el material genético (ARN) en conjunto con los componentes virales (transcriptasa inversa, integrasa y proteasa) dentro del citoplasma del LT CD4<sup>+</sup> (Figura 3).

**Transcripción inversa.** En el citoplasma de la célula huésped, la transcriptasa inversa (TI) del VIH convierte las dos cadenas sencillas de ARN viral a ADN de doble cadena (ADNs). El cual migra posteriormente hacia el interior del núcleo celular.

**Integración.** El ADN viral recién formado ingresa al núcleo celular, donde la enzima viral “integrasa” agrega el ADN viral al ADN celular en regiones aleatorias del genoma. El ADN viral recién integrado es llamado “provirus”, y permanece inactivo por un periodo de tiempo variable, en el cual pocas o incluso ninguna copia del VIH es producida.

**Transcripción.** El provirus en estado de inactivación se expresa cuando la célula huésped recibe un mensaje para activarse. Utiliza a la enzima huésped “ARN polimerasa” para crear copias del material genómico del VIH, así como pequeñas porciones de ARN llamadas ARNm (ARN mensajero) empleadas en la producción de cadenas largas de proteínas virales.

**Ensamblaje.** El ARN viral es transportado hacia el citoplasma celular, para ser traducido a proteínas en el ribosoma celular. Una vez que el precursor proteico viral se ha transcrito completamente, la enzima viral “proteasa” lo corta en proteínas funcionales de menor tamaño. De esta manera, se producen y se ensamblan todos los componentes necesarios para la replicación del VIH (proteínas estructurales, reguladoras y auxiliares), y las copias de ARN dentro de una nueva partícula viral.

**Gemación.**

Las partículas virales recién formadas migran hacia la membrana plasmática de la célula huésped, de la cual toman parte para formar la cubierta del virión, integrándose a la cubierta del virus las glicoproteínas gp120 y 41. Una vez completado el proceso de gemación, el virión es liberado y comienza la infección de otra célula diana.

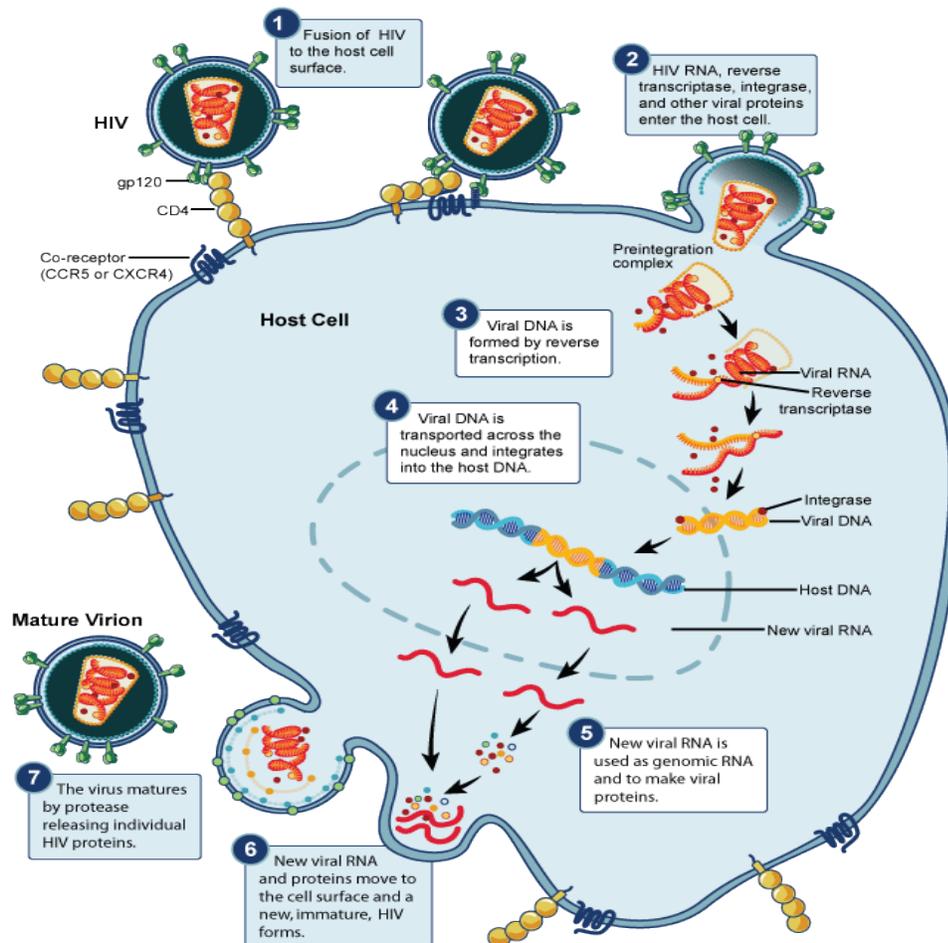


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH-1.

#### 2.4.4 Clasificación del VIH-1

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*, dentro de esta familia se encuentran los retrovirus *transformantes* (como el HTLV-1, Virus Linfotrópico de las células T humanas) que inducen la transformación tumoral de la célula huésped y los llamados retrovirus citopáticos *no transformantes* mejor conocidos como lentivirus al cual pertenece el VIH (Figura 4).

En la actualidad existen dos tipos de VIH capaces de producir SIDA, denominados VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 se encuentra ampliamente distribuido y es la causa de la pandemia a nivel mundial, mientras que el VIH-2 se encuentra limitado a una zona de África occidental, presenta mayor homología con el Virus de Inmunodeficiencia de los Simios (VIS).

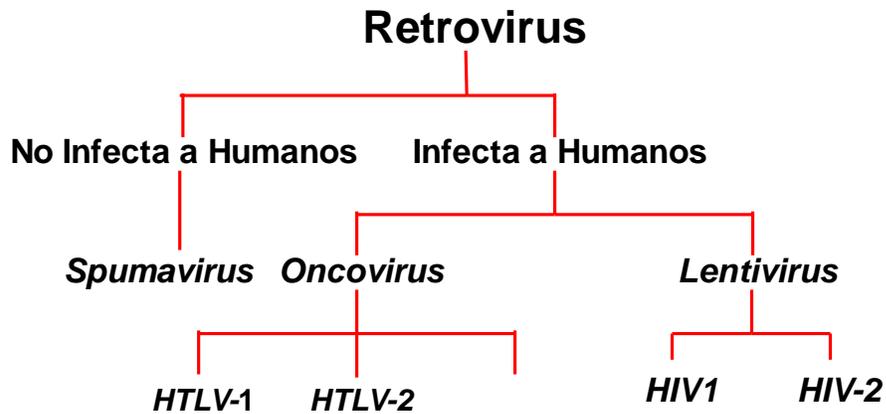
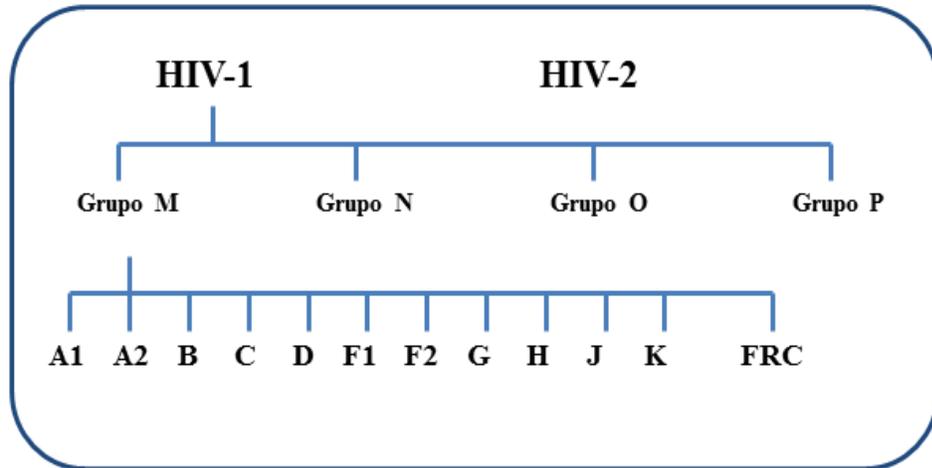


Figura 4. Clasificación del VIH-1.

#### 2.4.4.1 Subtipos virales

Globalmente las cepas circulantes del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) exhiben un extraordinario grado de diversidad genética que puede influir en varios aspectos, como son el tropismo, la virulencia, transmisión de la infección, así como en su inmunogenicidad. El VIH-1 se le ha categorizado en cuatro diferentes grupos: M (mayor), O (*outlier*), N (nuevo) y P (relacionado al gorila). Los virus pertenecientes al grupo M comprenden los subtipos de la A-K. La predominancia de uno o varios de los subtipos del VIH-1 se ha visto que está asociada con ciertas regiones geográficas. La mayoría de las infecciones son causadas por el VIH-1 grupo M, el cual se divide en subtipos, sub-subtipos y formas recombinantes circulantes (FRC), los subtipos encontrados dentro del grupo M están: A1, A 2, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K, los subtipos E y el subtipo I son considerados como recombinantes intersubtipo (Figura 5) (Kuiken *et al*, 2011).



**Figura 5. Tipos, grupos y subtipos virales del VIH**

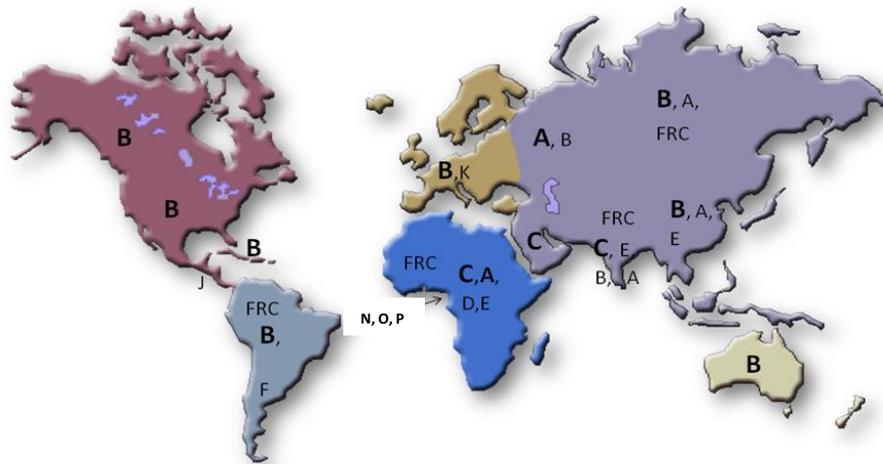
La prevalencia exacta de las cepas recombinantes no es bien conocida, ya que pocos estudios sistemáticos se han realizado para hacer frente a este problema, aunado a que la distribución mundial de las distintas formas de VIH-1 es un proceso dinámico. A medida que dos, tres o más subtipos de VIH-1 se entremezclan, la probabilidad de generar nuevos virus recombinantes se incrementará, por lo que es necesario un continuo monitoreo para determinar la presencia de nuevos subtipos, subsubtipos y grupos (como el grupo P encontrado en el año 2009) es importante para trazar el surgimiento de nuevas FRC en todo el mundo( Kuiken *et al* , 2011).

Los subtipos B y C del Grupo M causan la mayor parte de la pandemia a nivel mundial. El subtipo C predomina en el sur y este de África, India y Nepal. Es responsable de la epidemia más agresiva y del 50% de todas las infecciones. El subtipo B ha sido históricamente el más común en Europa, América, Japón y Australia. Sin embargo otros subtipos se están tornando más frecuentes en la pandemia europea, acumulando por lo menos 25% de las nuevas infecciones ( Kuiken *et al* , 2011).

En México se analizó en un estudio multicéntrico de cinco de los estados con más frecuencia de casos de SIDA en un grupo de homosexuales, este estudio reveló que el subtipo B es el subtipo predominante en México (Rivera-Morales *et al*, 2001). Sin embargo en el año 2011 fue reportado el primer caso informado de una infección por

VIH-1 subtipo C cuyo diagnóstico fue establecido en un paciente sudafricano que falleció en México por Linfoma no Hodgkin asociado a SIDA (Rivera-Morales *et al*, 2011).

El subtipo A y la CRF A/G predominan en África Occidental y Central. El subtipo D, esta generalmente limitado al Oriente y Centro de África. La CRF A/E, originaria de África Central, prevalece en el sureste de Asia. El subtipo F ha sido encontrado en África Central, Sudamérica y el este de África. El subtipo G y la CRF A/G han sido detectados en África Oriental y Occidental, además de Europa central. Los subtipos H y J solo han sido encontrados en África Central, mientras que el subtipo K solo se ha detectado en la República Democrática del Congo y Camerún (Figura 6) (Kuiken *et al* , 2011).



**Figura 6. Distribución mundial de subtipos de VIH-1**

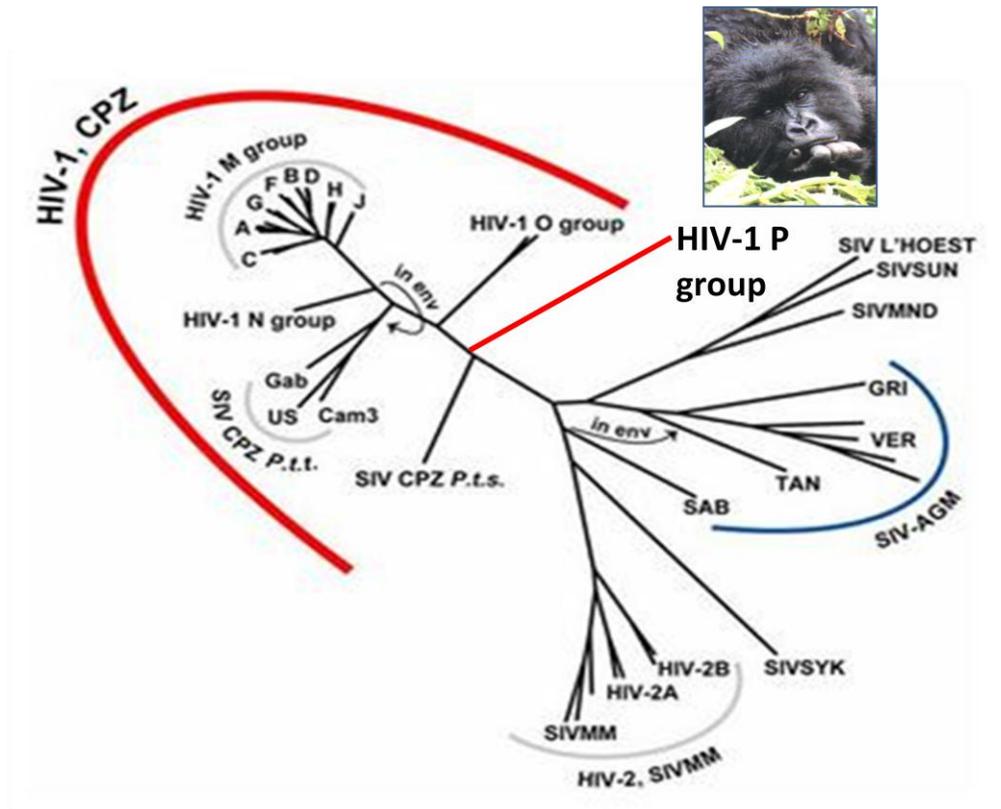
\*Las letras remarcadas en negro representan los subtipos predominantes

El grupo O, aparenta estar restringido a África Central, mientras que el grupo N, descubierto en 1998 en Camerún, es extremadamente raro. Un grupo del virus VIH-1 que también causa SIDA, pero que se caracteriza por presentar una amplia divergencia genética de las cepas del grupo M han sido identificados como virus del grupo O. La evidencia serológica de infección por virus pertenecientes al grupo O han sido reportados en pacientes de África Occidental y Central (Camerún, Gabón, Níger, Nigeria, Senegal y Togo), sin embargo también han sido reportados en otros países de

Europa y en Estados Unidos (De Leys, *et al*, 1990, Peeters, *et al*, 1996, Mulanga, *et al*, 1995, Loussert-Ajaka, *et al*. 1994).

El grupo N, es un grupo que fue detectado en una mujer de Camerún, la cual fue positiva para las pruebas de los dos grupos conocidos de VIH-1 (grupo M y O), a esta cepa de VIH-1 le denominaron YBF30, ésta reaccionó positivamente con una cepa del virus SIV, aislada de un chimpancé en Gabon, cuando el genoma fue secuenciado, el resultado confirmó que pertenecía a un grupo desconocido, al que se le denominó grupo N (New) (Balter, 1998., Simon, *et al*, 1998, Ayoub, *et al*. 2000).

El grupo P, es un grupo que fue detectado también en una mujer de 62 años que nació en Camerún, vivió en varias ciudades alrededor de Yaoundé, en Camerún. Ella tuvo 6 niños, todos nacieron antes de 1980, todos fueron alimentados con leche materna. Dos de ellos fallecieron de causas no infecciosas y ninguno de los niños son VIH positivos. Su esposo murió en 1984 por complicaciones de un accidente cerebrovascular. No hay información disponible acerca de su seropositividad. La paciente reportó tener parejas sexuales en Camerún después de que su esposo falleció. Una infección por VIH fue diagnosticada cuando ella llegó a Francia en 2004. Entre la sintomatología, reportó haber tenido pérdida de peso en el 2003 y episodios con fiebre antes de llegar a Francia. La mujer no muestra señales de SIDA, permanece sin tratamiento a pesar de ser portadora, la cepa de VIH reaccionó positivamente con una cepa del virus SIV relacionada con el gorila, cuando el genoma fue secuenciado, el resultado confirmó que pertenecía a un grupo desconocido, al que se le denominó grupo P, a esta cepa se le denominó RBF 168. La relación de los tipos de VIH-1, VIH-2, VIS, los grupos M, N, O P y los subtipos están esquematizados en el árbol filogenético mostrado en la Figura 7 (Plantier, *et al*, 2009).



**Figura 7. Arbol filogenético con los grupos y subtipos de VIH y VIS .** El Grupo M (“Mayor”) es responsable de la pandemia a nivel mundial. El grupo O (outlier) es principalmente encontrado en África Central. El Grupo N (new), es encontrado en un pequeño grupo de individuos en África Occidental. El grupo P relacionado al gorila recientemente identificado en el 2009. Los grupos restantes corresponden al Virus de Inmunodeficiencia del Simio (VIS) y VIH-2.

Por otro lado, en el caso del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 2 (VIH-2) aparentemente está confinado al oeste de África, con un foco en Angola, Mozambique y algunos casos reportados en Europa, América e India. La prevalencia del VIH-2 es más baja que el VIH-1 (Vincent *et al.*, 1997).

El VIH-2 está más relacionado al virus de Inmunodeficiencia del simio (VIS), ya que presenta una homología del 75% (Markovitz, D.M. 1993). Aunque la organización genómica y la función de los productos genéticos codificados por el VIH-2 son muy similares al VIH-1, el virus de inmunodeficiencia tipo 2 manifiesta diferir en algunas propiedades biológicas cuando se le compara con el virus de inmunodeficiencia tipo 1, sin embargo ambos virus ocasionan una enfermedad clínicamente indistinguible, se diferencia del virus tipo 1 en: que presenta una patogenicidad más baja, el período de incubación de la infección es más largo, el tiempo de progresión a SIDA es más lento, el tiempo de supervivencia con la enfermedad es más largo y por ende la enfermedad es menos agresiva, es menos citopático, menos virulento, la transmisión heterosexual y vertical (madre a hijo) es más baja, no se transmite tan eficientemente como el VIH-1, está asociado con una baja eficiencia de replicación viral, el cual pudiera explicar la latencia clínica más larga y una transmisibilidad más baja (Shanmugam V. *et al*, 2000).

## **2.5. Inmunopatogénesis del VIH**

El VIH ha sido encontrado en sangre, semen, secreciones del tracto genital femenino, leche materna y otros fluidos que contengan sangre; sin embargo hay otros fluidos corporales que pueden transmitir al VIH-1 como: fluido del sistema nervioso, articulaciones óseas. Las concentraciones del VIH-1 puede variar en estos fluidos corporales, de acuerdo al CDC se ha demostrado que aún en altas concentraciones del virus si éste se encuentra en un fluido ya seco, el riesgo de transmisión se reduce en más de un 90% la transmisión (Pantaleo, 1993).

De todos los mecanismos de transmisión, el modo de transmisión más común es el de tipo sexual, la probabilidad de que una persona se infecte por esta vía depende de sexo no protegido con una persona infectada por lo que la prevención de la infección y de las enfermedades de transmisión sexual como son las infecciones por Chlamydia,

Gonorrea, infección por el Virus del Herpes simple tipo 2, Sífilis, etc. dependerá de reducir el número de parejas sexuales y promover el uso de condón (Merson *et al.* 2000).

Una de las más sorprendentes características de la infección por *VIH-1* es la variabilidad individual en términos de progresión a *SIDA* (Massimo, 1999). La historia natural de infección de este virus varía considerablemente de un individuo a otro (Pantaleo, 1993). EL curso típico de una infección incluye los síntomas clínicos agudos, un prolongado período de latencia y finalmente, un estado de enfermedad clínica la cual es comúnmente caracterizada por infecciones oportunistas y ciertas neoplasias (Nitin *et al.* 2001).

Debido a la enorme variabilidad de factores en los hospederos y las diferencias de infectividad en distintas cepas de *VIH-1*, el tiempo para el desarrollo de *SIDA* varía de un individuo a otro; el tiempo medio desde la infección hasta el desarrollo del síndrome es alrededor de 5 a 10 años (Figura 8) (Nitin *et al.* 2001).

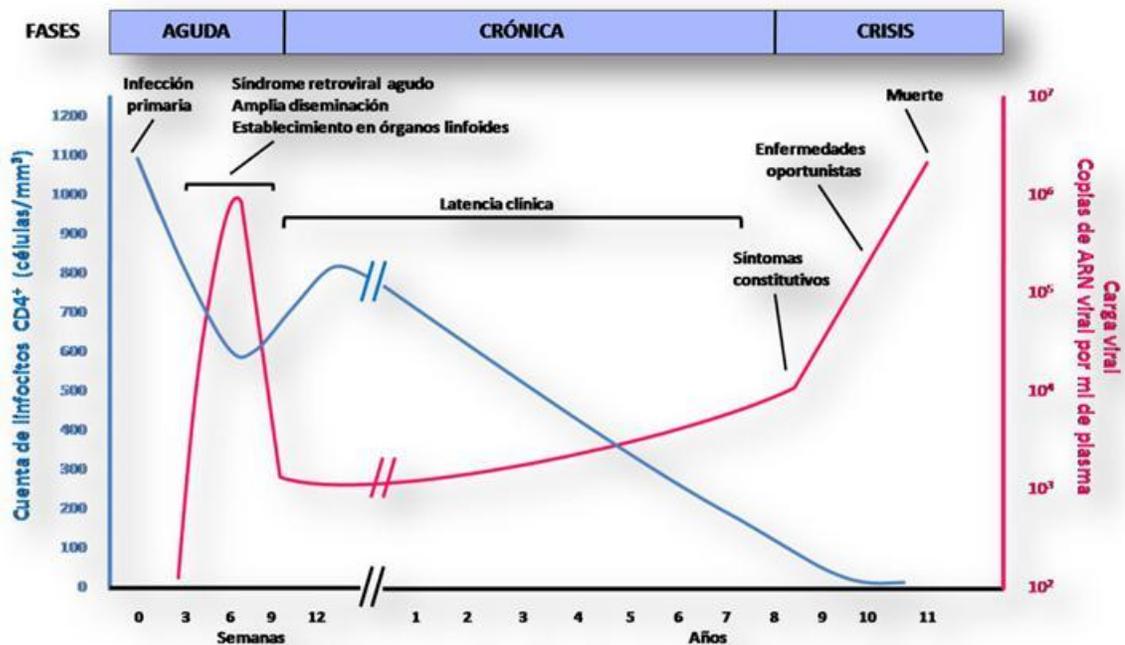


Figura 8. Historia Natural de la Infección por VIH

En base a la duración de la infección por *VIH-1* y a la cinética de los eventos virológicos e inmunológicos observados a lo largo de la enfermedad por este virus se han descrito tres patrones de evolución inmunopatológica; los típicos progresores se presentan en un 80-90% de las personas infectadas; los rápidos progresores se presentan en un 5-10%; y los lentos progresores alrededor de un 5% de los infectados por *VIH-1* (Massimo, 1999).

Los típicos progresores presentan el curso completo de la infección por *VIH-1* que incluye las tres fases: infección primaria, latencia y enfermedad clínica. La infección primaria se caracteriza por un síndrome clínico tipo gripe o mononucleosis infecciosa, con malestar general, fiebre, linfadenopatía, artralgias, mialgias, dolor de cabeza, dolor retroorbital y fotofobia. Ésta fase es seguida por un período de latencia de gran estabilidad en cuentas de células T CD4<sup>+</sup> en sangre, la cual puede durar de 8 a 10 años.

La progresión al *SIDA* resulta de una replicación continua del virus en los órganos linfáticos. Una progresión rápida hacia el *SIDA* durante los primeros 3 o 5 años de la infección es inusualmente presentada en ciertos pacientes en los cuales, los niveles de carga viral son relativamente altos y en contraste, la cuenta de linfocitos CD4 se presenta baja; en estos casos, no es posible definir un período de latencia durante el curso de la infección. Sin embargo, hay pacientes que aún en ausencia de terapia antirretroviral logran mantenerse en un período de latencia de la infección durante más de 15 años sin presentar síntoma alguno del estado de *SIDA*, en estos individuos, la carga viral se mantiene baja incluso indetectable, la cuenta de células CD4 se mantiene en valores superiores a 500 células CD4 por mm<sup>3</sup> (Pantaleo, 1993).

### 2.5.1 Tropismo e Infección a Órganos Linfáticos

La capacidad del *VIH-1* para infectar diferentes tipos de células varía de aislado a aislado y es referido como tropismo celular. El tropismo celular del virus se basa en la interacción específica de la glicoproteína más superficial de la envoltura vírica *gp120* y la molécula *CD4* de la superficie de la célula hospedero, siendo la principal célula diana los linfocitos *T CD4<sup>+</sup>* (*T cooperadores*), principales efectores de la inmunidad específica. Una vez que el *VIH-1* penetra en el organismo, inicia una replicación activa e invade numerosos tejidos y órganos, especialmente ganglios linfáticos (Vidal-Lampurdanés, C., Fumarola-Suñé, T.1996, Massimo, 1999).

La transmisión del *VIH-1* requiere la diseminación del virus de los sitios de infección en las superficies mucosas hacia zonas secundarias de células *T* en los órganos linfáticos, donde ocurre una extensiva replicación viral en células *T CD4<sup>+</sup>* (Tenius *et al.* 2000).

La disminución de células *T CD4<sup>+</sup>* en sangre periférica es el primer defecto inmunológico presentado en pacientes con *SIDA*. Estudios recientes dejan claro que los órganos linfáticos son el principal sitio anatómico de infección por *VIH-1*, tanto en etapas tempranas como en el estado latente de la infección. La frecuencia de células infectadas por este virus en pacientes con etapas tempranas y latentes de infección es mayor (5 a 10 veces) en nódulos linfáticos que en sangre periférica (Lane, 2010).

### 2.5.2 Receptores de Quimiocinas.

Las quimiocinas constituyen una gran familia de pequeñas glicoproteínas que regulan diversas funciones biológicas, como el tráfico de leucocitos, angiogénesis, hematopoyesis y organogénesis. Las quimiocinas realizan sus funciones al unirse a sus receptores correspondientes, los cuales pertenecen a una subfamilia de receptores similares a rodopsina de 7 dominios transmembranales (también llamados receptores de serpentina), o similares a receptores acoplados a proteína G. La nomenclatura para designar a los receptores consta de tres partes: la abreviación de la especificidad de

subclase del ligando de quimiocina (CC, CXC, XC, o CX3C), seguido de la letra R (del inglés *Receptor*) y un número asignado (Agáta Gibejová. 2000).

Los receptores de quimiocinas se clasifican en cuatro categorías: receptores promiscuos, compartidos, específicos y codificados viralmente. Los llamados Receptores promiscuos, éstos incluyen a aquellos que se unen a quimiocinas de las clases CXC o CC. Un ejemplo es el receptor de quimiocinas de eritrocitos denominado DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*), expresado también en células endoteliales. Este receptor es empleado por *Plasmodium vivax*, el causante de la malaria para invadir a los eritrocitos ( Agáta Gibejová. 2000).

Los Receptores compartidos. Son los que se unen a más de una quimiocina dentro de las clases CXC o CC. Existen tres receptores CXCR (CXCR1-3) los cuales se unen a muchas de las quimiocinas CXC, y todos los receptores CCR1-10 que se unen a las quimiocinas CC. Los Receptores específicos que se unen específicamente a una sola quimiocina, como el receptor XCR1 para linfotactina, CX3CR1 para fractalkina, **CXCR5** para BCA-1 y **CXCR4** para SDF-1 (Agáta Gibejová. 2000).

Los Receptores codificados viralmente que a pesar de que las quimiocinas y sus receptores evolucionaron como factores antimicrobianos, muchos agentes infecciosos los utilizan para facilitar sus procesos infectivos. Ciertos herpesvirus codifican receptores de quimiocinas falsas como US28 empleado por el citomegalovirus humano, que se une a las quimiocinas de la familia CC como MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5) y MCP-1 (CCL2). ECRF3 empleado por *Herpesvirus saimiri*, es selectivo para las quimiocinas de la familia CXC como IL-8 (CXCL8), GRO $\alpha$  (CXCL1) y NAP-2 (CXCL7) (Agáta Gibejová. 2000).

La estructura de los receptores de quimiocinas está intercalada en la membrana celular con un dominio N-terminal extracelular, un dominio C-terminal intracelular, y siete dominios hidrofóbicos atravesando la membrana en forma de  $\alpha$ -hélice. Esta

configuración les permite presentar cuatro dominios extracelulares y cuatro intracelulares, donde un total de seis bucles conectan los siete dominios, lo cual forma el núcleo de la estructura. Estos receptores cuentan con una cadena polipeptídica sencilla, la cual comparte del 25-80% de la secuencia de aminoácidos, además cuentan con la secuencia aminoacídica exclusiva DRYLAIV en el segundo dominio intracelular. Los receptores de quimiocinas tienen dos sitios de interacción con sus quimiocinas. El primero se encuentra en la región amino terminal, mientras que el segundo está localizado en el bucle expuesto de la cadena polipeptídica, entre la segunda y la tercera cisteína. Para que el receptor pueda llevar a cabo su función inicialmente tiene que reconocer el bucle de unión de su quimiocina correspondiente, esta interacción es necesaria para su correcta activación (Agáta Gibejová. 2000).

### **2.5.3 Tropismo celular del VIH (virus T tropic y M tropic)**

La cualidad de utilizar a CCR5 o CXCR4 como co-receptor de forma diferencial, se define como tropismo celular, característica importante en la inmunopatogénesis del Virus de la Inmunodeficiencia Humana ya que se refiere a una atracción preferencial de alta especificidad entre el virus y la célula diana. El tipo de tropismo se fundamenta en el tipo de cepa de VIH que es capaz de unirse a la célula diana correspondiente ya sean macrófagos o Linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La glicoproteína gp120 de la envoltura del VIH va a unirse específicamente a CCR5 o CXCR4 definiendo así su tropismo y su patogénesis (Zaitzeva, *et. al.* 1998, Lara-Villegas *et. al.* 2004, Cilliers *et. al.* 2003).

Se ha demostrado que los denominados virus T-trópicos infectan preferentemente a linfocitos T (co-receptor CXCR4) mientras que los virus M-trópicos (co-receptor CCR5) infectan preferentemente a macrófagos. El tercer tipo de virus que tienen la habilidad de infectar tanto a macrófagos como a linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se denominan dual-trópicos (CCR5/CXCR4). La actual nomenclatura para designar al VIH T-trópico es virus X4 y para los virus M-Trópicos es virus R5, en el caso del VIH dual trópico es virus R5X4 (Costa, J.R 1999, Littman D. 1998, Yi Y. *et. al.* 1999).

Se ha observado, que los virus R5 están involucrados en la mayoría de los casos de infección por transmisión sexual, mientras que los virus X4 predominan por lo general en estadios posteriores de la infección y pueden estar asociados a la rápida progresión a SIDA y muerte (Ostrowski MA, Justement SJ, *et. al.* 1998, Kilby, J.M. *et. al.* 2003).

#### **2.5.4 Interacción CCR5/CXCR4 con el VIH.**

Una vez que se descubrió la unión entre CCR5/CXCR4 y gp120, se demostró que los receptores de quimiocinas eran la clave para la infección del VIH con las células diana. La expresión de CXCR4 provocaba que las células CD4<sup>+</sup> fueran susceptibles a una infección productiva por parte del VIH, ya que la expresión de CD4<sup>+</sup> por si sola, no permite la infección exitosa (Robert. W. Doms, *et. al.* 1998). Los receptores de quimiocinas son los primeros sitios de unión para diversos retrovirus relacionados.<sup>28</sup> De la misma manera, se demostró que CCR5 servía como co-receptor a aquellos virus no productores de sincitia, mejor conocidos como M-Trópicos (Ostrowski MA, Justement SJ, *et. al.* 1998).

La unión del receptor CCR5 con la gp120 del VIH, adquiere relevancia debido a diversos estudios que han demostrado la existencia de una mutación homocigota CCR5Δ32 en el gen de CCR5 que confiere resistencia a la infección en pacientes que la poseen <sup>(14)</sup>. Esta mutación es una delección de 32 pb en la porción del marco de lectura abierta (ORF) del CCR5 humano, que codifica para el segundo loop extracelular entre los dominios transmembranales cuatro y cinco de la arquitectura de 7 dominios transmembranales. CCR5Δ32 codifica una proteína truncada designada Δ32, propiciando así que CCR5 no se exprese como un co-receptor funcional en la infección inicial (Agrawal L. *et. al.* 2004, Gonzalez, E. *et. al.* 2001).

CXCR4 también es indispensable para la fusión en virus T-trópicos, ya que se ha demostrado que cuando se une al ligando natural SDF-1α (*Stromal Cell-Derived Factor alpha*), inhibe la infección de virus T-trópicos pero no la de los M-trópicos. El uso de

anticuerpos monoclonales dirigidos contra CXCR4 también inhiben la infección por VIH-1 T-trópicos, dual trópicos e incluso por VIH-2. En el progreso de la infección por VIH se presentan cambios en el tipo del co-receptor utilizado. Al inicio emplea a CCR5 como co-receptor principal, iniciando cambios asociados al swich del fenotipo “no inductor de sincitios” a “inductor de sincitios” y el descenso de las cuentas de CD4<sup>+</sup> promueven el uso posterior de CXCR4. En la progresión a la enfermedad, el VIH expande su rango de co-receptores como: CCR5, CCR3, CCR2b y CXCR4. Este cambio de tropismo se basa en la secuencia del loop V3 de la gp-120 viral (Schols D. *et. al.* 1998).

### **2.5.5 Células Dendríticas: Células Presentadoras de Antígenos**

Las Células Dendríticas son potentes células presentadoras de antígenos (*CPA*), comprenden una familia multivariable de tipos celulares cuya función principal es la iniciación de la respuesta inmune primaria controlando áreas del organismo que son más susceptibles a la invasión de patógenos y además, están encargadas de identificar antígenos para iniciar una posterior presentación a los linfocitos efectores de la respuesta inmunitaria (Banchereau *et al.* 2000).

Las células integrantes de esta categoría reciben diversos nombres dependiendo de su localización en el cuerpo, después de una exposición frente a algún agente patógeno, inician una cascada de eventos, tomando un papel clave en la unión entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Secuencialmente, las células dendríticas se diferencian fenotípicamente migrando a los nódulos linfáticos donde incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras, de adhesión y secretando quimocinas (Banchereau J, Steinman RM, 1998).

La captura de antígenos por células dendríticas inmaduras es efectuada de diferentes maneras, pueden tomar partículas y microorganismos mediante fagocitosis y pueden formar vesículas pinocíticas en las cuales son incluidos fluidos extracelulares y solutos en un proceso llamado macropinocitosis (Banchereau J, Steinman RM, 1998),

y por último, la expresión de una gran variedad de receptores de superficie los cuales median los procesos de endocitosis.

### **2.5.6 Subpoblaciones de Células Dendríticas**

En sangre periférica las Células Dendríticas no representan una población celular homogénea, más bien, se encuentran al menos dos poblaciones distintas que presentan diferencias morfológicas y fenotípicas. En primer lugar se encuentran las Células Dendríticas CD123<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> de morfología Plasmacitoide (*PDC; Plasmacytoid Dendritic Cells*) las cuales dependen de la IL-3 para su diferenciación a Células Dendríticas maduras (Dzionek *et al* 2000, McKenna *et al* 2005), también se han identificado dos subpoblaciones que presentan apariencia monocitoide o mieloides (*MDC, Myeloid/Monocytoid Dendritic Cells*) de expresión baja o nula de CD123 y alta de CD11c las cuales son determinadas como Células Dendríticas Mieloides tipo 1 (*MDC-1*) y Células Dendríticas Mieloides tipo 2 (*MDC-2*).

También han sido identificados diferentes marcadores antigénicos en la superficie de las células dendríticas los cuales son específicos de cada subpoblación (Dzionek *et al* 2000) y son definidos como BDCA-1, BDCA-3 y BDCA-4 (*Blood Dendritic Cell Antigen*). En sangre, la expresión de BDCA-4 es estrictamente confinada a Células Dendríticas Plasmacitoides mientras BDCA-1 es restringido para las Células Dendríticas Mieloides de tipo 1 y BDCA-3 expresado en altos niveles solo en MDC-2 (Tabla 6).

**Tabla 6. Diferentes Subpoblaciones de Células Dendríticas encontradas en sangre periférica y sus respectivos marcadores de superficie**

SUBPOBLACIÓN	MARCADOR DE SUPERFICIE	MARCADOR ANTIGÉNICO
<b>PLASMACITOIDES</b>	<b>CD123<sup>+</sup></b> <b>CD11c<sup>-</sup></b>	<b>BDCA-2*</b> <b>/BDCA-4</b> <b>(Neuropilina-1)</b>
<b>MIELOIDES</b>		
<b>TIPO 1</b>	<b>C CD123<sup>ALTA</sup></b> <b>CD11c<sup>BAJA</sup></b>	<b>BDCA-1</b> <b>(CD1c)</b>
<b>TIPO 2</b>	<b>CD1c<sup>-</sup></b> <b>CD11c<sup>BAJA</sup></b> <b>CD123<sup>-</sup></b>	<b>BDCA-3</b>
*McKenna <i>et al</i> 2005		

En una persona sana, las Células Dendríticas representan alrededor del 1% del total de las Células Mononucleares en sangre periférica; de los cuales aproximadamente 0.37% son *PDC*, 0.60% *MDC-1* y solo el 0.03% corresponde a *MDC-2*.

### 2.5.7 Papel de las Células Dendríticas en la Infección por el *VIH-1*

La infección por el *VIH-1* se ha expandido ampliamente alrededor del mundo principalmente como resultado de exposición sexual (Morison, 2001) a través del contacto de superficies mucosas (Jameson *et al* 2002) durante la transmisión sexual, el virus tiene que cruzar el epitelio mucoso y eventualmente alcanzar tejidos linfáticos donde establece una infección permanente con una replicación viral extensiva en células T-CD4<sup>+</sup> (Tenius *et al* 2000).

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la transmisión del *VIH* después de la exposición al virus en mucosas aún permanecen poco claros pero es generalmente aceptado que las células dendríticas inmaduras residentes en la piel y

superficies mucosas son una de las primeras células en interactuar con el *VIH-1* en los sitios de infección primaria (Tenius *et al* 2000, Van Kooyk and Teunis 2003, Steinman 2000, Stuart *et al* 2001).

Las Células Dendríticas son células migratorias que viajan desde la médula ósea hasta los tejidos y de ahí, a los órganos linfoides secundarios (Thurnher *et al* 2001), se ha hipotetizado que el *VIH-1* revierte la función natural de este tipo celular y explota su actividad de transporte para incrementar el acceso a los sitios de replicación en los órganos linfáticos (Jameson *et al* 2002, Van Kooyk and Teunis 2003). La base de ésta hipótesis radica en la identificación de un receptor de unión de alta afinidad a las proteínas del virus presente en las células dendríticas. Éste receptor, denominado *DC-SIGN* (*Dendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin*), media la unión de células dendríticas con el *VIH-1* y el transporte subsiguiente a células *T* permisivas (Geijtenbeek *et al* 2000, Pigué, V. and Blauvelt, A., Van Kooyk and Teunis 2003, Engering *et al* 2002, Geijtenbeek 2000, Baribaud *et al* 2002).

#### **2.5.8. Interacción Célula Dendrítica-*VIH-1*: *DC SIGN***

El *DC-SIGN* es expresado solo por células dendríticas (Tenius *et al* 2000) localizadas en sitios de exposición a antígenos como tejidos mucosos del intestino (duodeno y colon), vesícula biliar, cérvix, vagina, endometrio, bronquios pulmonares, esófago y mucosa bucal, además de sangre periférica; es una lectina tipo *C*, calcio dependiente (Su *et al* 2004) que facilita la migración de la célula a través del endotelio por unión al ligando vascular *ICAM-2* (Moléculas de Adhesión Intercelular-2). Además *DC-SIGN* también medía la interacción entre las células dendríticas y el resto de las células *T*, por unión a *ICAM-3* (Moléculas de Adhesión Intercelular-3) (Engering *et al* 2002).

*DC-SIGN* es una proteína integral de membrana tipo II con un extremo carboxilo terminal y es expresado principalmente en células dendríticas y en algunos tipos de macrófagos tisulares, incluyendo células Hofbauer en placenta humana (Baribaud *et al* 2002). *In vitro*, su expresión puede ser inducida en macrófagos derivados de monocitos

mediante tratamiento con Interleucina 13 (*IL-13*) (Baribaud *et al* 2002, Thurnher *et al* 2001). Esta proteína de membrana funciona como receptor de envolturas glicosiladas de muchas partículas víricas que incluyen al Virus del Ébola, Citomegalovirus (*CMV*), Virus de Hepatitis C (*VHC*), Dengue entre otros (Van Kooyk and Teunis 2003), estudios recientes demuestran que además sirve como anclaje de microorganismos como *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* y los parásitos *Leishmania pifanoi* y *Schistosoma mansoni* (Su *et al* 2004). Las primeras secuencias revelan que la proteína está organizada en cuatro dominios distintos, un dominio citoplasmático *N-terminal*, un dominio transmembranal hidrofóbico, una región *alfa helicoidal* y un carbohidrato carboxilo terminal como dominio de reconocimiento.

Además de la alta afinidad por los ligandos celulares endógenos ICAM-2 e ICAM-3 (Su *et al* 2004), se ha demostrado que el *DC-SIGN* se une fuertemente a la glicoproteína *gp120* de la envoltura del *VIH-1* (Geijtenbeek *et al* 2000, Banchereau 2000). Cuando el virus es transmitido sexualmente, las células dendríticas *DC-SIGN*<sup>+</sup> en tejidos mucosos capturan al *VIH-1* mediante la interacción *DC-SIGN-gp120*. Después de migrar a los órganos linfáticos, las células promueven una eficiente transfección a las células T permisivas a través del receptor, resultando en una vigorosa replicación del virus (Geijtenbeek *et al* 2000, Piguet, V. and Blauvelt, A., Engering *et al* 2002, Geijtenbeek 2000).

Diversos estudios han demostrado que viriones unidos al *DC-SIGN* pueden mantener su infectividad por períodos prologados de tiempo, esto a pesar de las evidencias que el *DC-SIGN* funciona como un receptor de antígenos (Geijtenbeek *et al* 2000).

Si bien es cierto que, tanto las Células Dendríticas de tipo Mieloide (CD11c<sup>+</sup>) como las Células Dendríticas de tipo Plasmacitoide (CD11c<sup>-</sup>) y Células Dendríticas *in viro* derivadas de monocitos expresan *CD4* y *CCR5* y por consiguiente llegan a ser infectadas de forma productiva, ha quedado demostrado que, gracias a la alta glicosilación de la molécula de superficie *gp120* del *VIH* las moléculas de tipo lectina presentes en la superficie celular representan la mayor forma de unión a las Células Dendríticas (Turville, *et al* 2001).

### **2.5.9 El VIH a nivel mucosa endocervical**

Las superficies recubiertas por mucosas juegan un papel importante en la patogénesis del VIH-1, ya que son la ruta por la cual el virus entra al organismo en la mayoría de los casos de personas infectadas, a excepción de aquellos que adquieren el virus de manera intravenosa (Mestecky J., Fultz PN. 1999).

Tanto en hombres como en mujeres, la mucosa del tracto genital es el principal portal de entrada de enfermedades de transmisión sexual (ETS), ya sean de origen viral, bacteriano, fúngico o parasítico. Datos epidemiológicos demuestran que a nivel mundial del 70-90% de todas las infecciones por VIH son adquiridas por transmisión heterosexual. Esta ruta representa la incidencia de más rápido aumento en cuanto a nuevas infecciones, especialmente entre mujeres, las cuales se infectan en mayor proporción que los hombres (Mestecky J., Fultz PN. 1999; Coombs RW 2003, Philpott S. *et. al.* 2005).

La mucosa gastrointestinal y del tracto genitourinario son las vías de adquisición del VIH en la transmisión homosexual y heterosexual respectivamente. En el mecanismo de transmisión heterosexual, el endocervix es un sitio de mucosas particularmente susceptible a la infección por VIH. El virus entra en la lámina propia, ya sea por transporte a través del epitelio o por medio de células circulantes. Posteriormente, las CD y las células de Langerhans son las primeras en ser infectadas por el VIH, las cuales a su vez interactúan con las células CD4 en los nódulos linfáticos. A nivel mucosa y epitelio endocervical, el abundante número de células CD4+ ya sean macrófagos y linfocitos residentes, así como monocitos y linfocitos circulantes sirven como células diana para el VIH. En un estudio realizado por Levine *et. Al* 1998, se encontró por citometría de flujo que a nivel endocervix el número medio de linfocitos CD4<sup>+</sup> es de 245/10,000 células, en contraste con la baja proporción de 3/10,000 células a nivel

ectocervix, y ninguna en pared y lavado vaginal (Smith PD, Li L. Meng C. 1999, Manyu Prakash, *et. al.* 2004).

La mucosa endocervical juega un papel muy importante en la etapa inicial de la infección. Debido a que una vez que se lleva a cabo el contacto sexual, aparentemente la infección comienza con variantes del VIH no inductoras de sincitios, conocidas como M-trópico al utilizar preferencialmente al co-receptores CCR5. Con el paso del tiempo existe un cambio antigénico, en el cual se emplea principalmente al co-receptor CXCR4 (Smith PD, Li L. Meng C. 1999, Manyu Prakash, *et. al.* 2004).

## **2.6 Terapia antirretroviral**

Las drogas actualmente empleadas para el tratamiento de la infección por VIH-1 pertenecen a cuatro distintas clases: (1) inhibidores de la TR análogos de nucleósidos o de nucleótidos (NRTI), los cuales actúan como terminadores de la síntesis de ADN proviral e inhiben la retrotranscripción del genoma viral en ADN, un evento crucial que ocurre en etapas tempranas del ciclo de infección; (2) inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos (NNRTI), que se unen directamente a la transcriptasa reversa viral e inhiben su función; (3) inhibidores de la proteasa (PI), son dirigidos a la enzima proteasa involucrada en los procesos de ensamblaje final de los viriones; y por último, (4) inhibidores de fusión (FI), los cuales bloquean la entrada del virus en la célula blanco (Tabla 7) (Clavel y Hance, 2004).

En la actualidad se emplean combinaciones de drogas antiretrovirales para el tratamiento de la infección por VIH-1 que consisten en tres medicamentos; usualmente dos NRTI más un PI o un NNRTI. Este tratamiento es denominado terapia antirretroviral altamente activa (TARA) (Shafer *et al*; 2000).

**Tabla 7. Drogas antirretrovirales actualmente disponibles en el mercado.**

Nombre del Medicamento	Nombre Comercial	Nombre Alterno	Compañía*
<b>Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Nucleósidos (NRTI)</b>			
Abacavir	<a href="#">Ziagen</a>	ABC	<a href="#">GSK</a>
Didanosine	<a href="#">Videx</a>	ddI	<a href="#">BMS</a>
Emtricitabine	<a href="#">Emtriva</a>	FTC	<a href="#">Gilead</a>
Lamivudine	<a href="#">Epivir</a>	3TC	<a href="#">GSK</a>
Stavudine	<a href="#">Zerit</a>	d4T	<a href="#">BMS</a>
tenofovir**	<a href="#">Viread</a>	TDF, PMPA	<a href="#">Gilead</a>
Zalcitabine	<a href="#">HIVID</a>	ddC	<a href="#">Roche</a>
Zidovudine	<a href="#">Retrovir</a>	AZT, ZDV	<a href="#">GSK</a>
<b>Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No-Nucleósidos (NNRTI)</b>			
Delavirdine	<a href="#">Rescriptor</a>	DLV	<a href="#">Pfizer</a>
Efavirenz	<a href="#">Sustiva</a>	EFV	<a href="#">BMS</a>
Etravirine	<a href="#">Intelence</a>	ETV	<a href="#">Tibotec</a>
Nevirapine	<a href="#">Viramune</a>	NVP	<a href="#">Boehringer Ingelheim</a>
<b>Inhibidores de la Proteasa (PI)</b>			
Amprenavir (descontinuado)	Agenerase		<a href="#">GSK</a>
Atazanavir	<a href="#">Reyataz</a>	ATV	<a href="#">BMS</a>
Darunavir	<a href="#">Prezista</a>	DRV	<a href="#">Tibotec</a>
lopinavir + ritonavir	<a href="#">Kaletra</a>	LPV/r	<a href="#">Abbott</a>
Fosamprenavir	<a href="#">Lexiva</a>	FPV	<a href="#">GSK</a>
Indinavir	<a href="#">Crixivan</a>	IDV	<a href="#">Merck</a>
Nelfinavir	<a href="#">Viracept</a>	NFV	<a href="#">Pfizer</a>
Ritonavir ( <i>potenciador</i> )	<a href="#">Norvir</a>	RTV	<a href="#">Abbott</a>
Saquinavir	<a href="#">Invirase</a>	SQV	<a href="#">Roche</a>
Tipranavir	<a href="#">Aptivus</a>	TPV	<a href="#">Boehringer Ingelheim</a>
<b>Inhibidores de la Fusión (IF)</b>			
Enfuvirtide	<a href="#">Fuzeon</a>	T-20, ENF	<a href="#">Roche</a>
<b>Inhibidores de Entrada Viral</b>			
Maraviroc	<a href="#">Selzentry</a>	MVC	<a href="#">Pfizer</a>
<b>Inhibidores de la Integrasa (IIN)</b>			
Raltegravir	<a href="#">Isentress</a>	RAL	<a href="#">Merck</a>
<b>Combinaciones Fijas</b>			
abacavir + lamivudine	<a href="#">Epzicom</a>	ABC/3TC	<a href="#">GSK</a>
zidovudine + lamivudine	<a href="#">Combivir</a>	AZT/3TC	<a href="#">GSK</a>
abacavir + lamivudine + zidovudine	<a href="#">Trizivir</a>	ABC/3TC/AZT	<a href="#">GSK</a>
tenofovir + emtricitabine	<a href="#">Truvada</a>	TDF/FTC	<a href="#">Gilead</a>
tenofovir + emtricitabine + efavirenz	<a href="#">Atripla</a>	TDF/FTC/EFV	<a href="#">Gilead, BMS</a>
<b>Combinaciones Fijas Genéricas</b>			
lamivudine + zidovudine	<a href="#">Duovir</a>	3TC/ZDV	<a href="#">Cipla</a>
nevirapine + lamivudine + zidovudine	<a href="#">Duovir-N</a>	NVP/3TC/ZDV	<a href="#">Cipla</a>
nevirapine + lamivudine + stavudine	<a href="#">Triomune</a>	NVP/3TC/d4T	<a href="#">Cipla</a>

\* GSK = GlaxoSmithKline; BMS = Bristol-Myers Squibb. \*\* Análogo de Nucleótido (Clavel y Hance, 2004)  
 Adaptado de HIV-Drug Resistance Database, Stanford University 2009

### **3. HIPÓTESIS**

Los niveles de expresión del co-receptor de quimiocinas CCR5 en cérvix de mujeres infectadas con VIH-1 son mayores que los niveles del co-receptor CXCR4 y del receptor DC-SIGN, y su mayor expresión podría facilitar la transmisión de variantes R5 por vía heterosexual.

### **3. OBJETIVO**

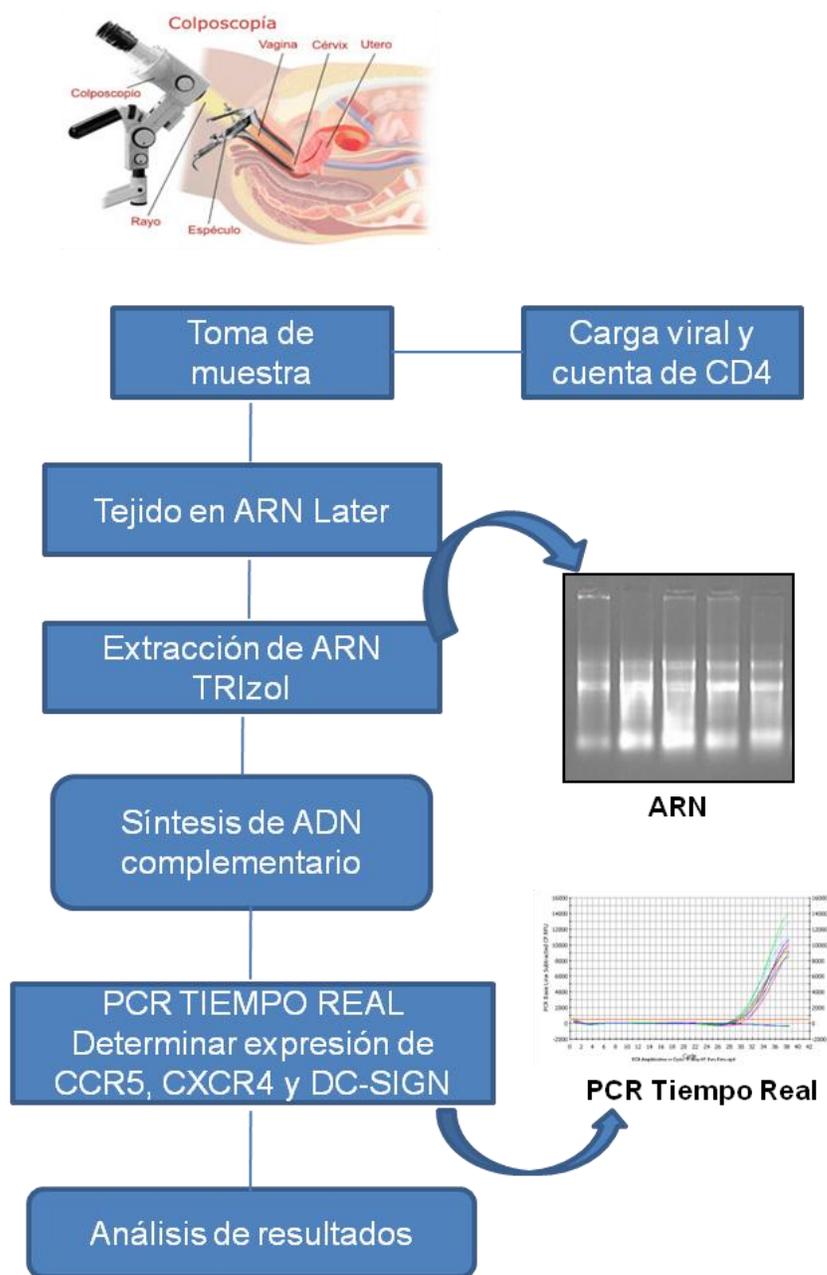
#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión de los receptores *DC-SIGN* y de los co-receptores *CCR5* y *CXCR4* en células de la mucosa cervical de mujeres sanas e infectadas con VIH-1, que se encuentran bajo terapia antirretroviral.

#### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Caracterizar la demografía, los factores de riesgo y las patologías presentes de las pacientes infectadas con VIH-1.
- b) Determinación de las subpoblaciones de LT CD4 y carga viral de las pacientes infectadas.
- c) Detectar, cuantificar y analizar la expresión del receptor *DC-SIGN* y la de los co-receptores *CCR5* y *CXCR4* en la mucosa cervical de mujeres no infectadas e infectadas con VIH bajo terapia antirretroviral.

## 5. ESTRATEGIA GENERAL



## **6. MÉTODOS**

### **6.1 Pacientes y toma de muestra**

Las pacientes incluidas en el estudio asistían a consulta en la Unidad de Infectología del Hospital Regional No. 45 “Dr. Juan I. Menchaca” del Instituto Mexicano del Seguro Social en Guadalajara, Jalisco. Todas ellas fueron seropositivas por ELISA y confirmadas por la técnica de inmunoelectrotransferencia (Western Blot). Se seleccionaron mujeres con infección sexual y asintomáticas. Una vez que cada una firmó el consentimiento informado para la realización de éste estudio se obtuvieron sus datos clínicos y aspectos epidemiológicos más recientes y se procedió con la toma de muestra. A cada paciente se le tomaron de 7-10 mL de sangre periférica por flebotomía y una biopsia superficial del cérvix que fue almacenada a temperatura ambiente en 1 mL de solución estabilizadora de ARN (RNAlater; Ambion, Austin, TX, EUA).

Para la realización de éste estudio se excluyeron pacientes que se encontraban en período menstrual, pacientes que expresaron haber tenido relaciones sexuales dentro de las 48 horas previas a la toma de biopsia, a quienes presentaban signos de alguna infección del tracto genital así como aquellas con historial de uso de drogas intravenosas o de transfusión de hemoderivados. De acuerdo a su edad, las mujeres fueron clasificadas como pre-menopáusicas (<48 años) y pos-menopáusicas (48 años o más) (Bassol-Mayagoitia 2006).

### **6.2 Evaluación de Carga Viral y Cuenta de Linfocitos T CD4**

#### **6.2.1 Carga Viral.**

Se refiere a la cantidad de partículas virales expresada en número de copias y el logaritmo base 10 de dicho número por mililitro de plasma y fue obtenida mediante RT-PCR tiempo real, empleando el Cobas Amplicor HIV-1 Monitor test, versión 1.5 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, EUA) cuyo límite de detección es de 50 copias/mL.

### **6.2.2 Cuenta de CD4.**

Se refiere a la cantidad de linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresada en números absolutos/mm<sup>3</sup> de sangre total y fue determinada utilizando citometría de flujo estándar empleando el BD Simultest / IMK Lymphocyte Kit (BD Biosciences, San José, California, EUA). En base a estos valores se determinó el grado de inmunodeficiencia de acuerdo a las cifras absolutas y al porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> por edad según los criterios del CDC de Atlanta de 1994 (CDC, 1994).

### **6.3 Extracción de ARN**

La extracción del ARN se realizó de acuerdo al método de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) basado en la técnica de Chomczynski, 1993. Antes de comenzar con la extracción, todas las muestras fueron retiradas de la solución estabilizadora. A cada muestra se le agregó 1 mL de TRIzol y fueron incubadas a temperatura ambiente por 2 horas con agitación cada 2 minutos. Una vez disgregado el tejido, se agregaron 200 µL de cloroformo (grado molecular), se mezcló por inversión, para después dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo anterior, se procedió a centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. De las tres fases obtenidas en el gradiente de densidad, se aisló la fase acuosa (translúcida), la cual contenía el ARN total. Se obtuvo la fase acuosa y se depositó en un nuevo tubo para microcentrífuga de 1.7 mL. A la fase acuosa se le agregaron 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 75% y se mezcló por inversión. Como resultado se obtuvo una pastilla de ARN en el fondo del tubo para microcentrífuga. Se realizó una tercera centrifugación a 12,000 rpm a 4 °C por 5 minutos. El etanol 75% utilizado para lavar el pellet de ARN fue decantado suavemente, el remanente fue eliminado dejando evaporar el etanol por 3 minutos, evitando que la pastilla se secase completamente. Finalmente el ARN fue re-suspendido en 25 µL de agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) y almacenado a -80 °C, hasta su uso posterior.

Para determinar la calidad del ARN, éstos se visualizaron en geles de agarosa al 0.8% en electroforesis horizontal empleando solución amortiguadora TBE 1X. 5µL de muestras fueron mezclados con 2µL de jugo azul 2X (Azul de bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y fueron cargadas en el gel de corrimiento. La electroforesis se llevó a cabo a 90V durante 30 min y posteriormente se sumergió el gel en solución de bromuro de etidio a concentración de 5 µg/mL durante 10 min. La fotodocumentación de los geles se realizó empleando un transiluminador de luz UV con análisis computacional empleando el programa Gel Pro Analyzer. La calidad de los ARN's, así como su integridad, fueron evaluadas visualizando las bandas de ARN ribosomal 28S,18S y 5S.

La cuantificación del ARN obtenido se obtuvo preparando diluciones 1:10 a un volumen final de 500 mL para cada muestra. Empleando el espectrofotómetro Smartspec Plus (Biorad, Hercules CA, EUA) se leyeron las absorbancias a longitudes de onda de 260 y 280 nm y la concentración fue estimada mediante la fórmula [ARN en mg/mL] = (A<sub>260</sub> x 0.040 mg/mL x B) donde A<sub>260</sub> corresponde al valor de la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm y B representa el factor de dilución.

#### **6.4 Síntesis de ADN Complementario**

A partir de la concentración de ARN obtenido de cada muestra se prepararon diluciones para ajustar la reacción de transcripción reversa partiendo de 5µg de ARN total. Se empleó la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) y Oligo dT Primer (Invitrogen). Se mezcló el ARN con 1 µL de d<sup>3</sup>NTP's Mix 10 mM (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se llevó a un volumen final de 12 µL con agua libre de nucleasas. A continuación, la mezcla fue calentada a 65°C durante 5 min e inmediatamente enfriada en hielo (4°C aprox). En el siguiente paso de la reacción, se añadieron 4 µL de la solución de reacción (5x First Strand Buffer) mas 2 µL de DTT 0.1 M y se incubó a 42°C durante 2 min. Finalmente, se añadieron 5µL de la enzima transcritptasa en reversa y la reacción fue aforada a 20 µL con agua libre de nucleasas. La mezcla final fue incubada 50 min a 42°C seguido por 15 min a 70°C para inactivar la reacción.

Para la cuantificación del ADNc se utilizó el espectrofotómetro (Smartspec Plus; Biorad, Hercules CA) en el que se leyeron las absorbancias de luz UV a 260 y 280 nm de cada muestra con dilución 1:10 en un volumen final de 500  $\mu$ L. Las concentraciones de ADNc fueron obtenidas en ng/ $\mu$ L.

Con el objetivo de verificar la calidad del ADNc empleado se amplificó un fragmento del gen constitutivo GAPDH. Se mezclaron 1  $\mu$ L de ADNc, 2.5  $\mu$ L de buffer MgCl<sub>2</sub> 10X (Invitrogen), 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen®), 1  $\mu$ L de dNTP's 10 mM (Amersham Biosciences), 1  $\mu$ L del Primer Forward y del Primer Reverse específicos para GAPDH, así como 0.5  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) por reacción. Se agregaron 17  $\mu$ L de agua ultrapura, para un volumen final de 25  $\mu$ L por reacción. El programa de corrida se programó en un termociclador y el primer ciclo se desarrolló a 95°C por 3 minutos, seguido de 3 ciclos repetitivos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos y 72°C por 1:30 minutos (35 veces) y un ciclo final de extensión de 72°C por 10 minutos.

## **6.5 Análisis de la expresión mediante PCR en tiempo real**

La expresión de los co-receptores CCR5, CXCR4 y el receptor DC-SIGN fue evaluada empleando PCR cuantitativo en tiempo real aplicando el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak 2001) y a continuación se describe el procedimiento desarrollado en tres etapas.

### **6.5.1 Diseño del Ensayo TaqMan.**

Los iniciadores y la sonda que conforman el ensayo Taqman de cada receptor fueron diseñados empleando el programa computacional Primer Express v2.0 (Applied Biosystems). Para el co-receptor CCR5 se utilizó la secuencia del receptor de quimiocinas C-C número 5 con número de acceso GenBank (NCBI) NM000579. Para CXCR4 se utilizó la "Variante de Transcripción 2" del RNAm humano, cuyo número de acceso es NM003467. Para el *DC-SIGN* (*mARN*; *CD-209 Homo sapiens*) NCBI *GeneBank* NM021155. Las secuencias de cada sonda se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8. Secuencias de iniciadores y sondas diseñadas con base en las secuencias reportadas en el Banco de Genes para la cuantificación por PCR tiempo real**

<b>Ensayo TaqMan para el co-receptor CCR5</b>	
<b>Iniciador Sentido</b>	5'-TGTAGAAGGAGACAGAGCTGGTT
<b>Iniciador Antisentido</b>	5'-GCCGTCAAGGTTCTTCATGATCTAG
<b>Sonda TaqMan</b>	FAM-5'-CCTCCCCATGTCTTCC
<b>Ensayo TaqMan para el co-receptor CXCR4</b>	
<b>Iniciador Sentido</b>	5'-GTTGTCTGAACCCCATCCTCTATG
<b>Iniciador Antisentido</b>	5'-CGTGCTGGGCAGAGGTTTAA
<b>Sonda TaqMan</b>	FAM-5'-AATTTGGCTCCAAGGAAAG
<b>Ensayo TaqMan para el receptor DC-SIGN</b>	
<b>Iniciador Sentido</b>	5'-GTCCCTCAGTGGAGCAAGTT
<b>Iniciador Antisentido</b>	5'-CCTGCTGGCGTTTCT
<b>Sonda TaqMan</b>	FAM-5'-TTCGTTTCTCCTTCTTCAGGGC

### 6.5.2 Preparación de las reacciones.

Todas las reacciones fueron ajustadas a [10 ng] de ADNc y para los controles negativos se empleó agua inyectable comercial. Se mezclaron 10 µL de la solución de reacción (*TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems/Roche, Foster City, CA*) la cual contiene todos los componentes necesarios para la amplificación más 1 µL del ensayo *TaqMan DC-SIGN, CCR5, CXCR4* o 18S rARN *TaqMan Assay* según fuera el caso; la reacción fue completada a 20 µL añadiendo agua libre de nucleasas. Las condiciones anteriores fueron establecidas para reacciones individuales y para varias reacciones en una misma corrida fue necesario preparar *mastermix* de reactivos.

Las reacciones fueron realizadas por duplicado y empleando el termociclador de tiempo real iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) y el programa de corrida, preestablecido para los ensayos con sondas *TaqMan*, inicia con la desnaturalización general de la muestra a 95°C durante 10 min seguida de 40 repeticiones consecutivas de 95°C por 15 seg para desnaturalización y 60°C durante 1 min para el alineamiento y extensión en donde se efectúa la detección de fluorescencia emitida por la degradación de la sonda. Para determinar la eficiencia del ensayo se realizaron diluciones seriadas (2,000 ng,

1,000 ng, 500 ng y 250 ng) de una de las muestras y se probaron para cada receptor y para el control endógeno. Los resultados fueron analizados en una curva de regresión lineal (curva de calibración) teniendo en cuenta que el valor de regresión ( $R^2$ ) debe presentarse cercano a 1 y la pendiente alrededor de -3.32 (Wong 2005).

### **6.5.3 Interpretación de resultados de PCR cuantitativo en tiempo real.**

Mediante el esquema  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , la expresión relativa de cada receptor en las muestras las paciente infectadas por el VIH (problema) fue obtenida normalizando con un gen endógeno de referencia (18S rRNA housekeeping gene, TaqMan Assay) y pacientes sanos como control de normalización (15 mujeres no infectadas). Así,  $\Delta\Delta C_T$  se definió como la diferencia entre el  $\Delta C_{T(\text{problema})}$  y el  $\Delta C_{T(\text{controles sanas})}$ , mientras que  $\Delta C_T$  fue definido como la diferencia en los valores de  $C_T$  obtenidos de cada receptor (CCR5, CXCR4 o DC-SIGN) y el  $C_T$  del control endógeno (rRNA 18S 20x; Pre-Developed TaqMan Assay Reagents; Applied Biosystems, Foster City CA) (Brink *et al* 2000).

### **6.6 Análisis estadístico de la Expresión de CXCR4, CCR5 y DC-SIGN**

Los resultados principales se describen mediante medianas y rangos. Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de las variables. Para evaluar las diferencias en la expresión de los receptores se aplicó la prueba de los signos de Wilcoxon y el análisis de varianza de Friedman (ANOVA). Para comparar la expresión de los receptores de acuerdo al tratamiento antirretroviral de los pacientes se empleó la prueba U de Mann-Whitney y el análisis ANOVA de Kruskal-Wallis. El análisis de Spearman's se empleó para evaluar la correlación de la expresión de correceptores y la carga viral o la cuenta de linfocitos T CD4. Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados empleando el programa SPSS v15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Obtención y Clasificación de Muestras de Pacientes VIH-1+

Las muestras de biopsias cervical para este estudio se obtuvieron de 26 pacientes infectadas con el VIH-1 por vía heterosexual; todas ellas de entre 22 a 69 años de edad y asintomáticas. Al momento de la toma de muestras 14 pacientes estaban bajo tratamiento antirretroviral (TARAA), 9 tenían historial de tratamiento previo y 3 eran vírgenes para TARAA. El esquema general de las pacientes bajo tratamiento era un inhibidor de la proteasa reforzado con Ritonavir más dos inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos. Los datos clínicos se resumen en la Tabla 9.

**Tabla 9. Historial Clínico y Epidemiológico de las Pacientes Infectadas por el VIH-1**

Paciente No.	Edad	Tiempo de Infección <sup>a</sup>	Parejas Sexuales <sup>b</sup>	Cuenta de células CD4+ <sup>c</sup>	Carga Viral <sup>d</sup>	Tratamiento	Uso de anticonceptivos
1	69	6	1	560	<50	Actual	Abstinencia
2	67	3	1	260	<50	previo	Ninguno
3	41	4	1	200	1870	Actual	Dispositivo intrauterino
4	32	3	1	357	5600	Virgen	Abstinencia
5	36	11	1	421	<50	previo	Hormonal oral
6	47	2	1	350	<50	Virgen	Ninguno
7	38	13	1	1200	<400	Actual	Preservativo
8	34	1	1	201	<50	previo	Hormonal oral
9	38	8	1	258	<50	previo	Abstinencia
10	26	10	1	445	<50	Actual	Abstinencia
11	40	2	2	360	<50	Actual	Oclusión tubaria bilateral
12	48	9	1	560	<50	Actual	Ninguno
13	39	1	2	450	<50	previo	Abstinencia
14	48	1	1	800	<50	Actual	Abstinencia
15	51	2	1	430	<50	previo	Preservativo
16	48	6	1	208	1800	previo	Abstinencia
17	51	3	1	798	<50	Actual	Ninguno
18	41	2	1	546	<50	previo	Ninguno
19	46	1	1	452	<400	Actual	Hormonal oral
20	35	4	1	246	<50	Actual	Ninguno
21	27	1	1	450	<50	previo	Ninguno
22	22	6	2	310	400	Actual	Preservativo
23	46	1	1	969	400	previo	Abstinencia
24	29	3	1	300	1200	Virgen	Abstinencia
25	38	9	1	609	<50	Actual	Abstinencia
26	62	3	1	550	<400	Actual	Hormonal oral

<sup>a</sup> Fecha del diagnóstico de infección por VIH-1 expresada en años.

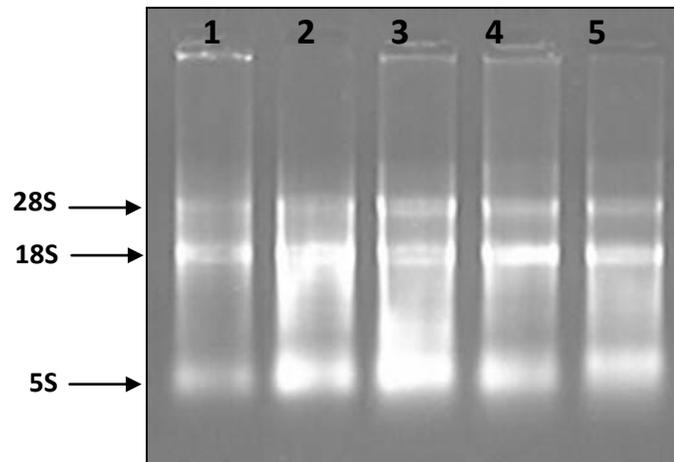
<sup>b</sup> Información personal obtenida a través de preguntas directas

<sup>c</sup> Cuenta de células CD4<sup>+</sup> /mm<sup>3</sup> de sangre

<sup>d</sup> Número de copias/mL de ARN en plasma usando el COBAS Amplicor HIV-1 (Roche Diagnostics, Branchburg NJ, USA)

## 7.2 Extracción, Calidad y Cuantificación de la Concentración del ARN Obtenido

La calidad del ARN obtenido de cada muestra fue evaluada a través de geles desnaturalizantes de agarosa observándose las bandas correspondientes al *ARNr* de 28S, 18S y 5S, en todas las muestras además de la zona de *ARNm* (Figura 9).



**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa para verificar la calidad de todos los ARN,** empleando sales MOPS. Se observaron las tres subunidades del ARN ribosomal. Solo se muestran corrimientos de algunos pacientes: el carril 1 corresponde al Paciente No. 9; carril 2 al paciente No. 12, carril 3 al paciente No. 22, carril 4 al paciente No. 23 y el carril 5 al paciente No. 24.

### 7.3 Concentración de ARN obtenido

Se prepararon diluciones 1:100 de las muestras de ARN obtenido y se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro para obtener la concentración en ng/ $\mu$ L (Tabla 10).

**Tabla 10. Concentración del ARN obtenido**

<b>Paciente</b>	<b>Concentración ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>Paciente</b>	<b>Concentración ng/<math>\mu</math>L</b>
<b>1</b>	16.050	<b>14</b>	14.934
<b>2</b>	21.531	<b>15</b>	15.393
<b>3</b>	15.925	<b>16</b>	16.753
<b>4</b>	12.017	<b>17</b>	18.392
<b>5</b>	12.042	<b>18</b>	14.066
<b>6</b>	17.443	<b>19</b>	13.721
<b>7</b>	11.704	<b>20</b>	12.482
<b>8</b>	10.416	<b>21</b>	12.770
<b>9</b>	18.347	<b>22</b>	12.165
<b>10</b>	18.765	<b>23</b>	12.709
<b>11</b>	20.140	<b>24</b>	11.980
<b>12</b>	17.167	<b>25</b>	13.029
<b>13</b>	16.628	<b>26</b>	12.411

### 7.4 Concentración de ADNc Sintetizado

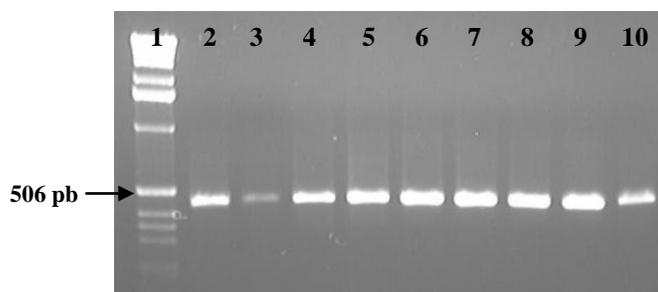
Con el fin de evaluar la concentración del ADNc sintetizado, fue necesario preparar diluciones 1:100 de cada muestra de ADNc y se midieron al espectrofotómetro las absorbancias a 260 y 280 nm para obtener la concentración en ng/ $\mu$ L (Tabla 11).

**Tabla 11. Concentración del ADNc sintetizado**

Paciente	Concentración ng/ $\mu$ L	Paciente	Concentración ng/ $\mu$ L
P-01	12.4847	P-14	17.8527
P-02	8.1332	P-15	18.2285
P-03	10.7548	P-16	17.4776
P-04	9.0949	P-17	18.7813
P-05	14.5849	P-18	12.3588
P-06	8.3233	P-19	9.7189
P-07	15.1345	P-20	7.937
P-08	11.5154	P-21	14.4833
P-09	14.0337	P-22	14.0942
P-10	6.1082	P-23	16.2089
P-11	7.3655	P-24	12.274
P-12	7.418	P-25	13.7695
P-13	7.5795	P-26	20.7924

### 7.5 Amplificación de GAPDH mediante PCR convencional

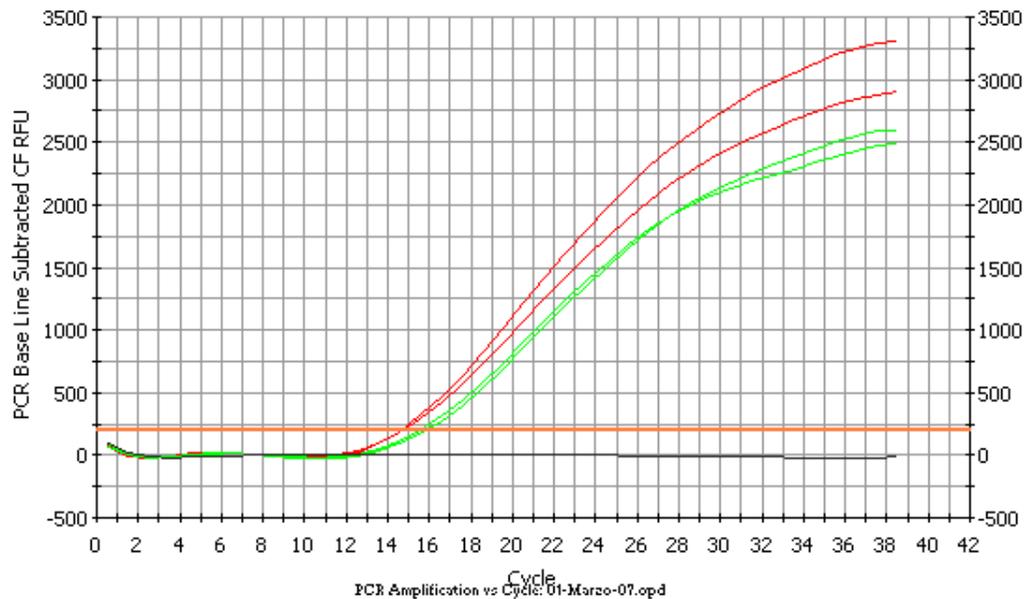
Para evaluar la viabilidad del ADNc sintetizado, se amplificó un fragmento del gen que codifican para GAPDH por PCR convencional obteniéndose un amplicón de 452 pb en las 26 muestras analizadas, se observa un grado de amplificación uniforme entre las pacientes (Figura 10). En ninguna de las muestras analizadas se observaron bandas adicionales al producto esperado.



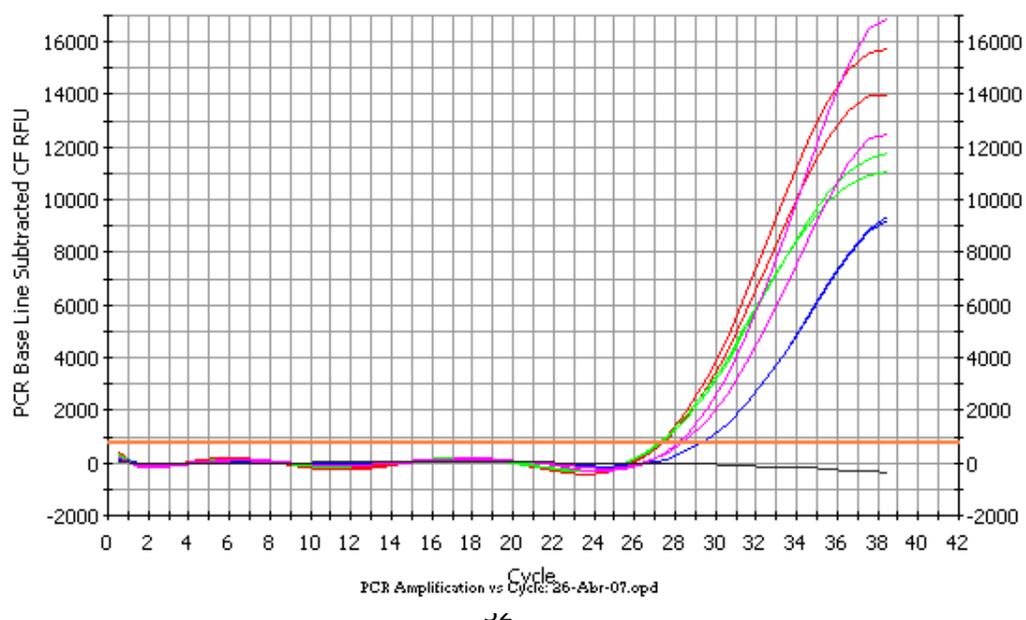
**Figura 10. Amplificación de GAPDH mediante PCR convencional.** Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb, carriles 2-10: P-4, 6, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 28. Producto amplificado 452 pb.

## 7.6 Amplificación por PCR tiempo real

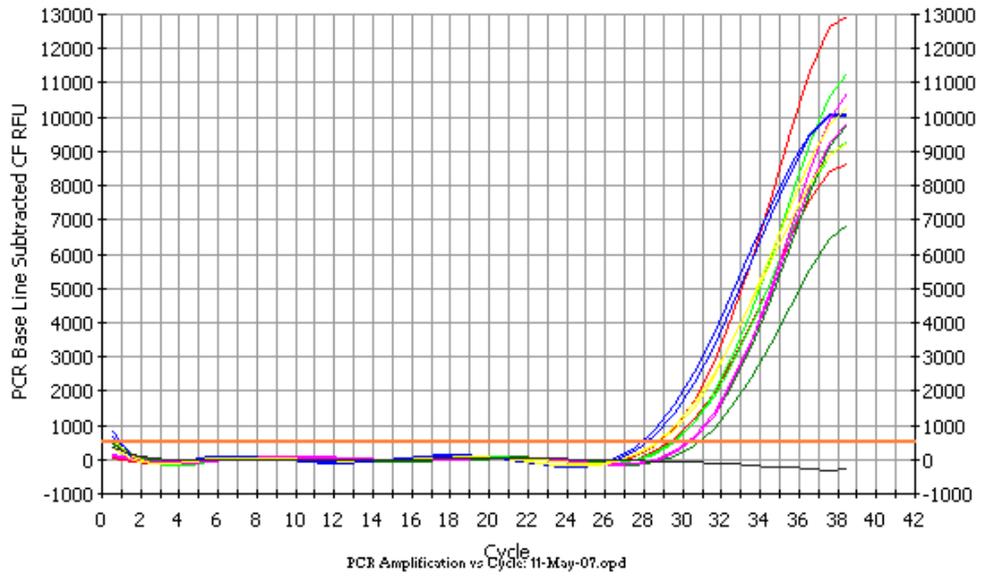
Se detectaron las fluorescencias emitidas por los ensayos Taqman de cada uno de los receptores evaluados. En las Figuras 11, 12, 13 y 14 se muestran ejemplos de gráficas obtenidas mediante el análisis con el programa computacional del equipo de tiempo real iCycler Real-Time PCR Systems (Bio-Rad Software Versión 3.1).



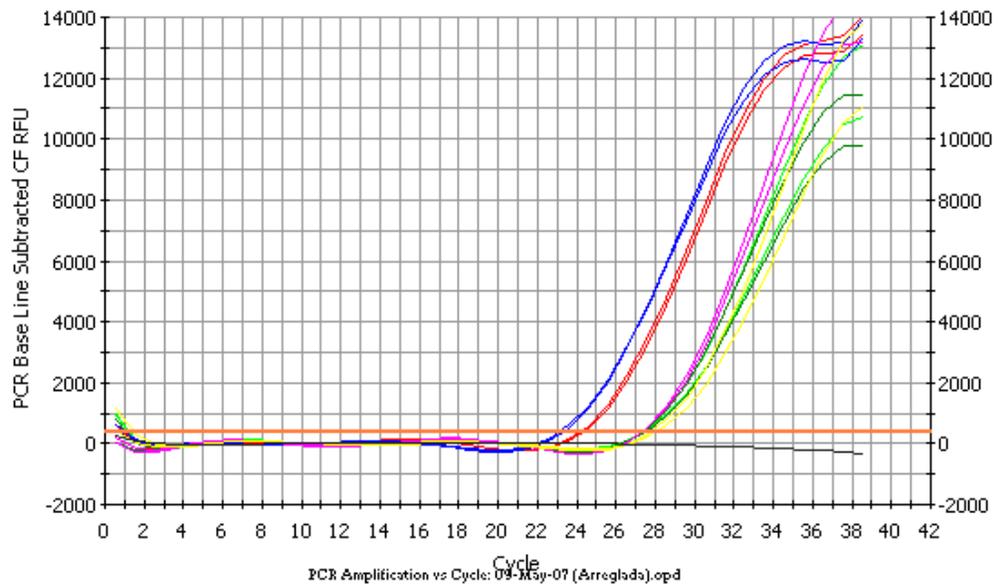
**Figura 11. Amplificación por PCR en tiempo real del control endógeno rARN 18S.** Amplificación y replicas correspondiente a las pacientes P-01 (●), P-02(●), Control negativo (●).



**Figura 12. Amplificación por PCR en tiempo real del receptor DC-SIGN.** Amplificación y réplicas correspondiente a las pacientes P-16 (●), P-18 (●), P-19 (●), P-20 (●), Control negativo (●).



**Figura 13. Amplificación por PCR en tiempo real del co-receptor CCR5.** Amplificación y réplicas correspondiente a las pacientes P-15 (●), P-16 (●), P-17 (●), P-18 (●), P-19 (●), P-20 (●), Control negativo (●).



**Figura 14. Amplificación por PCR en tiempo real del co-receptor CXCR4.** Amplificación y réplicas correspondiente a las pacientes P-15 (●), P-16 (●), P-17 (●), P-18 (●), P-19 (●), P-20 (●), Control negativo (●).

## 7.7 Cuantificación de la expresión de los receptores mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  fueron analizados los resultados obtenidos por PCR tiempo real. Todos los datos fueron analizados en hojas de cálculo de Microsoft Excel 14.0 (Microsoft Office 2010). En las páginas siguientes se muestran (Tablas 12, 13 y 14) los datos de la forma en que fueron analizados.

Tabla 12. Análisis de la expresión del receptor DC-SIGN mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Paciente		Rep 1	Rep 2	Promedio CT	SD	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
Pacientes VIH+	P-01	DC-SIGN	31.8	30.8	31.3	0.707106781	15.65	7.094	0.00732
		rRNA 18s	15.8	15.5	15.65	0.212132034			
	P-02	DC-SIGN	32	32.2	32.1	0.141421356	13.1	4.544	0.04287
		rRNA 18s	19.8	18.2	19	1.13137085			
	P-03	DC-SIGN	27	26	26.5	0.707106781	12.25	3.694	0.07728
		rRNA 18s	14.3	14.2	14.25	0.070710678			
	P-04	DC-SIGN	29.9	29.1	29.5	0.565685425	4.95	-3.606	12.1784
		rRNA 18s	24.6	24.5	24.55	0.070710678			
	P-05	DC-SIGN	27.7	26.8	27.25	0.636396103	-0.500	-9.056	532.357
		rRNA 18s	28.2	27.3	27.750	0.636396103			
	P-06	DC-SIGN	29.1	28.7	28.9	0.282842712	13.6	5.044	0.03032
		rRNA 18s	15	15.6	15.3	0.424264069			
	P-07	DC-SIGN	29.3	29.3	29.3	0	8.75	0.194	0.87433
		rRNA 18s	20.8	20.3	20.55	0.353553391			
	P-08	DC-SIGN	35.3	34.7	35	0.424264069	2.550	-6.006	64.2779
		rRNA 18s	32.4	32.5	32.450	0.070710678			
	P-09	DC-SIGN	33.2	33.6	33.4	0.282842712	15.9	7.344	0.00616
		rRNA 18s	17.6	17.4	17.5	0.141421356			
	P-10	DC-SIGN	28.0	27.8	27.9	0.141421356	0.4	-8.156	285.283
		rRNA 18s	27.8	27.2	27.5	0.424264069			
	P-11	DC-SIGN	36.0	36.0	36	0	4.4	-4.156	17.8302
		rRNA 18s	32.0	31.2	31.6	0.565685425			
	P-12	DC-SIGN	28.8	29.0	28.9	0.141421356	15.15	6.594	0.01035
		rRNA 18s	13.3	14.2	13.75	0.636396103			
	P-13	DC-SIGN	31.1	30.8	30.95	0.212132034	10.95	2.394	0.19029
		rRNA 18s	20.5	19.5	20	0.707106781			
P-14	DC-SIGN	36.3	36.2	36.25	0.070710678	11.400	2.844	0.1393	
	rRNA 18s	24.7	25.0	24.850	0.212132034				
P-15	DC-SIGN	28.6	27.9	28.25	0.494974747	15.65	7.094	0.00732	
	rRNA 18s	13.1	12.1	12.6	0.707106781				
P-16	DC-SIGN	28.7	28.3	28.5	0.282842712	10.05	1.494	0.35509	
	rRNA 18s	18.7	18.2	18.45	0.353553391				
P-17	DC-SIGN	26.7	26.9	26.8	0.141421356	9	0.444	0.73522	
	rRNA 18s	17.5	18.1	17.8	0.424264069				
P-18	DC-SIGN	25.8	25.4	25.6	0.282842712	4.000	-4.556	23.5271	
	rRNA 18s	21.4	21.8	21.600	0.282842712				
P-19	DC-SIGN	28.2	27.9	28.05	0.212132034	11.650	3.094	0.11714	
	rRNA 18s	16.2	16.6	16.400	0.282842712				
P-20	DC-SIGN	30.3	30.0	30.15	0.212132034	10.2	1.644	0.32002	
	rRNA 18s	20.0	19.9	19.95	0.070710678				
P-21	DC-SIGN	29.9	29.1	29.5	0.565685425	-0.2	-8.756	432.408	
	rRNA 18s	29.3	30.1	29.7	0.565685425				
P-22	DC-SIGN	32.1	31.1	31.6	0.707106781	15.75	7.194	0.00683	
	rRNA 18s	15.7	16.0	15.85	0.212132034				
P-23	DC-SIGN	28.8	28.5	28.65	0.212132034	14.05	5.494	0.02219	
	rRNA 18s	14.7	14.5	14.6	0.141421356				
P-24	DC-SIGN	29.7	29.5	29.6	0.141421356	5.45	-3.106	8.61141	
	rRNA 18s	24.4	23.9	24.15	0.353553391				
P-25	DC-SIGN	28.0	27.6	27.8	0.282842712	5.4	-3.156	8.91509	
	rRNA 18s	22.4	22.4	22.4	0				
P-26	DC-SIGN	33.1	33.4	33.25	0.212132034	0.2	-8.356	327.704	
	rRNA 18s	33.2	32.9	33.05	0.212132034				
Voluntarias Sanas	V-01	DC-SIGN	18.2	18.6	18.4	0.282842712	3.700	-4.856	28.9652
		rRNA 18s	14.6	14.8	14.700	0.141421356			
	V-02	DC-SIGN	27.7	27.2	27.45	0.353553391	4.95	-3.606	12.1784
		rRNA 18s	22.9	22.1	22.5	0.565685425			
	V-03	DC-SIGN	26	25	25.5	0.707106781	3.6	-4.956	31.0442
		rRNA 18s	21.9	21.9	21.9	0			
	V-04	DC-SIGN	29.7	28.6	29.15	0.777817459	12.85	4.294	0.05099
		rRNA 18s	16.6	16	16.3	0.424264069			
	V-05	DC-SIGN	26.8	27.1	26.95	0.212132034	11.65	3.094	0.11714
		rRNA 18s	15.2	15.4	15.3	0.141421356			
	V-06	DC-SIGN	27.4	27.6	27.5	0.141421356	6.35	-2.206	4.61474
		rRNA 18s	21.5	20.8	21.15	0.494974747			
	V-07	DC-SIGN	30.2	30.3	30.25	0.070710678	8.400	-0.156	1.11439
		rRNA 18s	21.8	21.9	21.850	0.070710678			
	V-08	DC-SIGN	35.2	35.5	35.35	0.212132034	16.95	8.394	0.00297
		rRNA 18s	18.2	18.6	18.4	0.282842712			

Tabla 13. Análisis de la expresión del co-receptor CCR5 mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Paciente	Rep 1	Rep 2	Promedio CT	SD	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
Pacientes VIH+	P-01	CCR5 31.6	30.6	31.1	0.707106781	15.45	4.88125	0.03393
		rRNA 18s 15.8	15.5	15.65	0.212132034			
	P-02	CCR5 32.7	32.5	32.6	0.141421356	13.6	3.03125	0.12232
		rRNA 18s 19.8	18.2	19	1.13137085			
	P-03	CCR5 27.5	27.4	27.45	0.070710678	13.2	2.63125	0.1614
		rRNA 18s 14.3	14.2	14.25	0.070710678			
	P-04	CCR5 28.8	28.2	28.5	0.424264069	3.95	-6.619	98.2748
		rRNA 18s 24.6	24.5	24.55	0.070710678			
	P-05	CCR5 29.2	28.7	28.95	0.353553391	1.200	-9.369	661.112
		rRNA 18s 28.2	27.3	27.750	0.636396103			
	P-06	CCR5 30.8	30.3	30.55	0.353553391	15.25	4.681	0.03898
		rRNA 18s 15	15.6	15.3	0.424264069			
	P-07	CCR5 30.1	30.3	30.2	0.141421356	9.65	-0.919	1.89048
		rRNA 18s 20.8	20.3	20.55	0.353553391			
	P-08	CCR5 31.5	31.5	31.5	0	-0.950	-11.519	2934.2
		rRNA 18s 32.4	32.5	32.450	0.070710678			
	P-09	CCR5 36.4	36.5	36.45	0.070710678	18.95	8.381	0.003
		rRNA 18s 17.6	17.4	17.5	0.141421356			
	P-10	CCR5 29.3	29.1	29.2	0.141421356	1.7	-8.869	467.476
		rRNA 18s 27.8	27.2	27.5	0.424264069			
	P-11	CCR5 36.7	35.7	36.2	0.707106781	4.6	-5.969	62.6286
		rRNA 18s 32.0	31.2	31.6	0.565685425			
	P-12	CCR5 29.8	29.6	29.7	0.141421356	15.95	5.381	0.02399
		rRNA 18s 13.3	14.2	13.75	0.636396103			
	P-13	CCR5 32.7	31.8	32.25	0.636396103	12.25	1.681	0.31181
		rRNA 18s 20.5	19.5	20	0.707106781			
P-14	CCR5 36.9	36.0	36.45	0.636396103	11.600	1.031	0.48929	
	rRNA 18s 24.7	25.0	24.850	0.212132034				
P-15	CCR5 29.1	28.7	28.9	0.282842712	16.3	5.731	0.01882	
	rRNA 18s 13.1	12.1	12.6	0.707106781				
P-16	CCR5 27.9	27.6	27.75	0.212132034	9.3	-1.269	2.40953	
	rRNA 18s 18.7	18.2	18.45	0.353553391				
P-17	CCR5 27.5	27.6	27.55	0.070710678	9.75	-0.819	1.76388	
	rRNA 18s 17.5	18.1	17.8	0.424264069				
P-18	CCR5 26.5	26.2	26.35	0.212132034	4.750	-5.819	56.4441	
	rRNA 18s 21.4	21.8	21.600	0.282842712				
P-19	CCR5 27.6	27.7	27.65	0.070710678	11.250	0.681	0.62362	
	rRNA 18s 16.2	16.6	16.400	0.282842712				
P-20	CCR5 29.0	29.6	29.3	0.424264069	9.35	-1.219	2.32745	
	rRNA 18s 20.0	19.9	19.95	0.070710678				
P-21	CCR5 29.5	29.0	29.25	0.353553391	-0.45	-11.019	2074.79	
	rRNA 18s 29.3	30.1	29.7	0.565685425				
P-22	CCR5 31.4	31.7	31.55	0.212132034	15.7	5.131	0.02853	
	rRNA 18s 15.7	16.0	15.85	0.212132034				
P-23	CCR5 29.6	28.9	29.25	0.494974747	14.65	4.081	0.05908	
	rRNA 18s 14.7	14.5	14.6	0.141421356				
P-24	CCR5 29.9	29.6	29.75	0.212132034	5.6	-4.969	31.3143	
	rRNA 18s 24.4	23.9	24.15	0.353553391				
P-25	CCR5 30.2	30.4	30.3	0.141421356	7.9	-2.669	6.35878	
	rRNA 18s 22.4	22.4	22.4	0				
P-26	CCR5 34.1	34.0	34.05	0.070710678	1	-9.569	759.418	
	rRNA 18s 33.2	32.9	33.05	0.212132034				
Voluntarias Sanas	V-01	CCR5 29.9	28.9	29.4	0.707106781	14.700	4.131	0.05707
		rRNA 18s 14.6	14.8	14.700	0.141421356			
	V-02	CCR5 28.7	27.8	28.25	0.636396103	5.75	-4.819	28.222
		rRNA 18s 22.9	22.1	22.5	0.565685425			
	V-03	CCR5 29.4	29.1	29.25	0.212132034	7.35	-3.219	9.3098
		rRNA 18s 21.9	21.9	21.9	0			
	V-04	CCR5 29	28.6	28.8	0.282842712	12.5	1.931	0.2622
		rRNA 18s 16.6	16	16.3	0.424264069			
	V-05	CCR5 30.1	30.8	30.45	0.494974747	15.15	4.581	0.04177
		rRNA 18s 15.2	15.4	15.3	0.141421356			
	V-06	CCR5 30.3	30.5	30.4	0.141421356	9.25	-1.319	2.4945
		rRNA 18s 21.5	20.8	21.15	0.494974747			
	V-07	CCR5 31.1	30.7	30.9	0.282842712	9.050	-1.519	2.86543
		rRNA 18s 21.8	21.9	21.850	0.070710678			
	V-08	CCR5 28.3	30.1	29.2	1.272792206	10.8	0.231	0.8519
		rRNA 18s 18.2	18.6	18.4	0.282842712			

Tabla 14. Análisis de la expresión del co-receptor CXCR4 mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

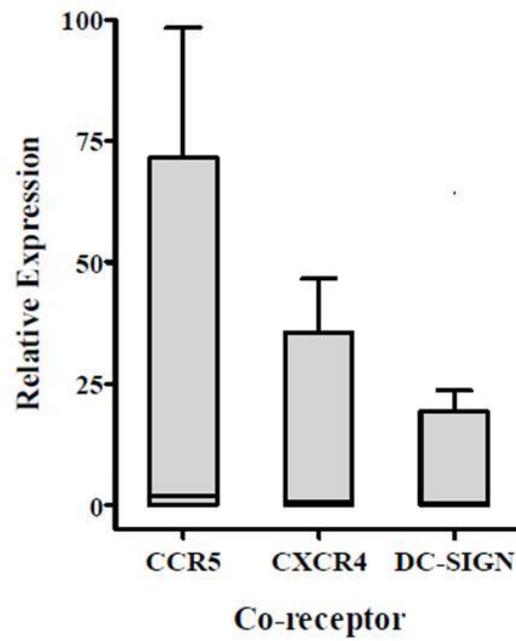
Paciente	Rep 1	Rep 2	Promedio CT	SD	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
Pacientes VIH+	P-01	CXCR4	27.8	27.7	27.75	0.070710678	12.1	3.906	0.0667
		rRNA 18s	15.8	15.5	15.65	0.212132034			
	P-02	CXCR4	33.3	32	32.65	0.919238816	13.65	5.456	0.02278
		rRNA 18s	19.8	18.2	19	1.13137085			
	P-03	CXCR4	25.7	24.8	25.25	0.636396103	11	2.806	0.14297
		rRNA 18s	14.3	14.2	14.25	0.070710678			
	P-04	CXCR4	25.6	25.5	25.55	0.070710678	1	-7.194	146.398
		rRNA 18s	24.6	24.5	24.55	0.070710678			
	P-05	CXCR4	24.2	24.3	24.25	0.070710678	-3.500	-11.694	3312.6
		rRNA 18s	28.2	27.3	27.750	0.636396103			
	P-06	CXCR4	27.6	27.4	27.5	0.141421356	12.2	4.006	0.06223
		rRNA 18s	15	15.6	15.3	0.424264069			
	P-07	CXCR4	27.4	27.3	27.35	0.070710678	6.8	-1.394	2.62761
		rRNA 18s	20.8	20.3	20.55	0.353553391			
	P-08	CXCR4	30.9	30.0	30.45	0.636396103	-2.000	-10.194	1171.18
		rRNA 18s	32.4	32.5	32.450	0.070710678			
	P-09	CXCR4	32.0	32.3	32.15	0.212132034	14.65	6.456	0.01139
		rRNA 18s	17.6	17.4	17.5	0.141421356			
	P-10	CXCR4	30.2	31.2	30.7	0.707106781	3.2	-4.994	31.8617
		rRNA 18s	27.8	27.2	27.5	0.424264069			
	P-11	CXCR4	37.2	36.2	36.7	0.707106781	5.1	-3.094	8.53712
		rRNA 18s	32.0	31.2	31.6	0.565685425			
	P-12	CXCR4	27.1	26.9	27	0.141421356	13.25	5.056	0.03006
		rRNA 18s	13.3	14.2	13.75	0.636396103			
	P-13	CXCR4	31.9	31.6	31.75	0.212132034	11.75	3.556	0.08501
		rRNA 18s	20.5	19.5	20	0.707106781			
P-14	CXCR4	33.1	33.7	33.4	0.424264069	8.550	0.356	0.78119	
	rRNA 18s	24.7	25.0	24.850	0.212132034				
P-15	CXCR4	27.9	27.8	27.85	0.070710678	15.25	7.056	0.00751	
	rRNA 18s	13.1	12.1	12.6	0.707106781				
P-16	CXCR4	28.0	27.5	27.75	0.353553391	9.3	1.106	0.4645	
	rRNA 18s	18.7	18.2	18.45	0.353553391				
P-17	CXCR4	26.6	25.8	26.2	0.565685425	8.4	0.206	0.86679	
	rRNA 18s	17.5	18.1	17.8	0.424264069				
P-18	CXCR4	24.0	24.5	24.25	0.353553391	2.650	-5.544	46.6482	
	rRNA 18s	21.4	21.8	21.600	0.282842712				
P-19	CXCR4	25.8	25.6	25.7	0.141421356	9.300	1.106	0.4645	
	rRNA 18s	16.2	16.6	16.400	0.282842712				
P-20	CXCR4	28.5	28.4	28.45	0.070710678	8.5	0.306	0.80874	
	rRNA 18s	20.0	19.9	19.95	0.070710678				
P-21	CXCR4	27.2	27.0	27.1	0.141421356	-2.6	-10.794	1775.18	
	rRNA 18s	29.3	30.1	29.7	0.565685425				
P-22	CXCR4	31.6	31.2	31.4	0.282842712	15.55	7.356	0.0061	
	rRNA 18s	15.7	16.0	15.85	0.212132034				
P-23	CXCR4	28.6	28.3	28.45	0.212132034	13.85	5.656	0.01983	
	rRNA 18s	14.7	14.5	14.6	0.141421356				
P-24	CXCR4	29.6	29.6	29.6	0	5.45	-2.744	6.69809	
	rRNA 18s	24.4	23.9	24.15	0.353553391				
P-25	CXCR4	29.0	29.7	29.35	0.494974747	6.95	-1.244	2.36813	
	rRNA 18s	22.4	22.4	22.4	0				
P-26	CXCR4	32.0	31.6	31.8	0.282842712	-1.25	-9.444	696.389	
	rRNA 18s	33.2	32.9	33.05	0.212132034				
Voluntarias Sanas	V-01	CXCR4	26.8	26.7	26.75	0.070710678	12.050	3.856	0.06905
		rRNA 18s	14.6	14.8	14.700	0.141421356			
	V-02	CXCR4	23.8	23.9	23.85	0.070710678	1.35	-6.844	114.861
		rRNA 18s	22.9	22.1	22.5	0.565685425			
	V-03	CXCR4	23.1	22	22.55	0.777817459	0.65	-7.544	186.593
		rRNA 18s	21.9	21.9	21.9	0			
	V-04	CXCR4	25.3	25.7	25.5	0.282842712	9.2	1.006	0.49784
		rRNA 18s	16.6	16	16.3	0.424264069			
	V-05	CXCR4	24.1	24	24.05	0.070710678	8.75	0.556	0.68007
		rRNA 18s	15.2	15.4	15.3	0.141421356			
	V-06	CXCR4	28.9	28.2	28.55	0.494974747	7.4	-0.794	1.73357
		rRNA 18s	21.5	20.8	21.15	0.494974747			
	V-07	CXCR4	29.4	30.6	30	0.848528137	8.150	-0.044	1.03079
		rRNA 18s	21.8	21.9	21.850	0.070710678			
	V-09	CXCR4	36.4	36.4	36.4	0	18	9.806	0.00112
		rRNA 18s	18.2	18.6	18.4	0.282842712			

## 7.8 Análisis estadístico

Diferentes niveles de expresión se encontraron para los tres co-receptores de mARNs evaluados en las biopsias de cuello uterino ( $p < 0.0001$ ). La expresión de CCR5 (Ratio  $_{\text{[test/calibrator]}}$  media de 1.82; rango 0.003-2934) fue más alta que la observada para CXCR4 (0.79; 0.0061-3312) ( $p = 0.025$ ) y la expresión de la primera fue a su vez mayor para el receptor DC-SIGN (0.33; 0.006-532) ( $p = 0.046$ ) (Figura 15). Se observó una correlación positiva alta entre los niveles de expresión de los tres receptores - mARNs evaluados ( $r_s$  rangos desde 0.52 a 0.85,  $p < 0.01$ ). No se encontró correlación entre los niveles de expresión de los tres co-receptores evaluados con los recuentos de células CD4 + en la sangre ( $r_s$  rangos desde -0.104 a -0.155,  $p = \text{NS}$ ), pero se encontró una correlación moderada de los niveles de carga viral en plasma con la expresión de CCR5 ( $r_s = 0.41$ ,  $p = 0.04$ ) y DC-SIGN ( $r_s = 0.40$ ,  $p = 0.04$ ).

Por otra parte, no se encontró ninguna diferencia cuando los niveles de expresión de los tres co-receptores mARNs evaluados fueron comparados de acuerdo a la condición TARAA. Por lo tanto, la mediana y los rangos de los niveles de CCR5 fueron 1.76 [0.02-759.42], 1.36 [0.00-2934.20] y 31.31 [0.04-98.27] para los pacientes que reciben TARAA, anteriormente en TARAA y vírgenes, respectivamente.

Los niveles de expresión de CXCR4 fueron 0.81 [0.01-696.39], 0.27 [0.01-3312.30] y 6.69 [0.06-146.40] para los mismos grupos de pacientes ( $p = 0.87$ ), mientras que los niveles de DC-SIGN fueron 0.32 [0.01-327.50], 0.27 [0.01-532.36] y 8.61 [0.03-12.18] ( $p = 0.94$ ). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los tres receptores cuando se compararon los pacientes pre-y post-menopáusicas infectadas con VIH, sin embargo, en pacientes pre-menopáusicas todos ellos fueron más altos. Por lo tanto, la mediana y los rangos de niveles de CCR5 fueron 4.34 [0.00-2934.20] y 0.30 [0.02-759.42] en las mujeres con pre y post menopausia, respectivamente ( $p = 0.16$ ). Los niveles de expresión de CXCR4 fueron 2.49 [0.01-3312.60] y 0.26 [0.01-693.39] para los mismos grupos de mujeres ( $p = 0.17$ ) y para DC-SIGN 4.74 [0.01-532.36], y 0.09 [0.01-327.70] ( $p = 0.19$ ).



**Figura 15.** Expresión relativa de los co-receptores CCR5, CXCR4 y del receptor DC-SIGN en biopsias cervicales de 26 pacientes infectadas por VIH-1

## 8. DISCUSIÓN

La propagación mundial de la infección por VIH-1 se ha logrado mediante la transmisión sexual a través del tracto genital y las mujeres parecen tener un riesgo mayor que los hombres (Hladik F, 2009). La infección de células con VIH-1 en los sitios de contacto sexual requiere un receptor de quimiocinas adicionales y se ha sugerido que el CCR5 es el primer receptor utilizado, seguido por el CXCR4 durante las etapas avanzadas de la enfermedad. Algunos estudios han sugerido que la mayor expresión de CCR5 puede ser la explicación principal para la transmisión preferencial de tropismo CCR5 (R5) aislados en el tracto genital, sin embargo, esta preocupación sigue siendo controvertida (Zhang *et al.* 1998). En este estudio fueron evaluados los niveles de expresión del ARNm de los receptores DC-SIGN y co-receptores CCR5, CXCR4 en biopsias cervicales de mujeres mexicanas infectadas con VIH-1.

En el presente estudio, la expresión de ARNm de CCR5 fue mayor que la observada para CXCR4 o DC-SIGN. Patterson y cols (1998), también encontraron que los niveles de expresión del ARNm de CCR5 fueron significativamente mayores que los niveles de CXCR4 en biopsias cervicales obtenidas de cinco pacientes infectados por VIH. Sin embargo Mc Clure y cols. (2005) evaluaron muestras cervicales obtenidas de una cohorte de mujeres sanas e informó de que la expresión de CCR5 fue menor que las de CXCR4. Esta inconsistencia podría ser debido a diferencias en los pacientes evaluados y en el muestreo de tejido. Nuestros resultados también difieren de los reportados por Zhang y cols. (1998) que por tinción Inmunohistoquímica, encontraron una alta expresión de CXCR4 en las muestras vaginales y cervicales procedentes de mujeres y de macacos.

Aunque en el presente estudio no se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica, se utilizaron técnicas como la utilizada por Zhang y colaboradores, se utilizó un método más sensible y bien aceptado para evaluar cuantitativamente los niveles de ARNm de estos receptores y co-receptores (Baeten 2007, Antony *et al.* 2005).

Todos los pacientes incluidos en el presente estudio presentaron infección por VIH adquirida por vía sexual, la forma más común de transmisión. Sheffield *et al.*(2007), mostró aumento del número de células CD4 + que expresan CCR5 en las biopsias obtenidas a partir de las úlceras genitales y es bien conocido que este tipo de lesiones visibles en la mucosa cervical aumenta el riesgo de transmisión del VIH en las mujeres (Sheffield *et al.*2007, Myer *et al.*2006). Podemos excluir tales lesiones como una explicación de los niveles observados de expresión de los receptores evaluados porque los pacientes con úlceras genitales fueron excluidos de nuestro estudio, sin embargo, no se evaluó los niveles de expresión de ARNm de estos receptores en las células CD4 + por sí solos, sino en todas las células del endocervix.

Un número de estudios han demostrado que el ciclo menstrual no afecta significativamente el estado inmune del tracto genital (Ma Z *et al.* 2001, Poppe *et al.* 1998, Prakash *et al.*, 2002), sin embargo, Howell y colaboradores, encontraron que las expresiones de receptores y co-receptores en el tracto genital puede variar como una función de las etapas del ciclo menstrual (Howell *et al.*2005). Por lo tanto, se excluyeron los pacientes que menstrúan y los que tienen relaciones sexuales vaginales recientes para reducir la posibilidad de cambios en la mucosa relacionados con estos eventos. Prakash *et al.* (2004) demostraron que el uso de anticonceptivos orales se asocia con un incremento en la expresión de CCR5 en linfocitos T CD4 + endocervicales, que puede aumentar la susceptibilidad de estas células a la infección por VIH-1 (Baeten *et al.* 2007).

Aunque el microambiente del tracto genital femenino pueden ser alterados por el uso de anticonceptivos orales, es muy poco probable que nuestros resultados fueron secundarios a su uso debido a un bajo porcentaje de los pacientes que los usan. Además, no se encontraron diferencias significativas entre la expresión del ARNm de los receptores y co-receptores, pero vimos una tendencia a ser mayor en mujeres premenopáusicas en comparación con los de mujeres post-menopáusicas. Esto sugiere que

las mujeres pre-menopáusicas tienen un riesgo más elevado de re-infección por relaciones sexuales con VIH-1 en personas infectadas, pero se necesitan más estudios para dilucidar el papel del estado en la modificación de las hormonas sexuales receptores de VIH y en la expresión de co-receptores y el cambio de la susceptibilidad de las células diana para la infección del VIH-1.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ARNm de los tres receptores ensayados de acuerdo con el estado de tratamiento antirretroviral. Estudios previos han demostrado una regulación positiva de la expresión de CCR5 en varias células inmunes que ocurren temprano en la infección por el VIH que parece proporcionar una ventaja selectiva para el virus pero que está regulado por disminución hacia una expresión normal de la terapia antirretroviral (Kumar *et al.* 2000, Nicholson *et al.* 2001). La falta de diferencias que encontramos podría atribuirse a la gran variabilidad en los niveles de expresión observados que a su vez podría ser debido al pequeño número de pacientes evaluados.

Numerosos estudios han demostrado que células DC-SIGN + se unen y son capaces de transferir el VIH-1 a células T permisivas independientemente de los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 (Hirbod *et al.* 2009). Nosotros observamos una baja expresión de DC-SIGN en comparación con otros receptores evaluados en el tracto genital de mujeres mexicanas infectadas por VIH-1 que adquirieron la infección en forma heterosexual. Aproximadamente 1-5% de las células presentes en la mucosa rectal expresan el receptor DC-SIGN [31], el cuál puede estar relacionado con los bajos niveles de expresión de este receptor que se encuentra en el cuello uterino. Jameson *et al.* (2002) detectaron células que expresan receptores DC-SIGN en la lámina propia subepitelial de la vagina y del cérvix, una pequeña proporción de estas células co-expresaron CCR5 en la vagina, pero no en el cérvix. Este resultado parece ser diferente de nuestros resultados. Además, Gurney *et al.* (2005) demostraron que diferencias en los niveles de expresión del receptor DC-SIGN, y de los co-receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 puede ser relevante en la transferencia del virus de la periferia a los

órganos linfoides secundarios o en el apoyo a la infección local y la replicación viral. Sin embargo, dado que los mecanismos implicados en la mucosa infección por el VIH siguen sin resolverse, nuevos conocimientos sobre la dinámica de estos eventos son necesarios.

Los factores que contribuyen a la aparición de variantes X4 en etapas posteriores de la infección por el VIH son desconocidos. Montfort *et al.* (2008) informaron que las células dendríticas en las mucosas no son fáciles de transferir los virus llamados R5. Las células dendríticas preferentemente transferir los virus X4 a los linfocitos T CD4 + en trans, un efecto observado en células que expresan altos niveles de receptores de DC-SIGN (Montfort *et al.* (2008). En este estudio, los niveles bajos de expresión de DC-SIGN en biopsias cervicales de mujeres heterosexuales infectados por el VIH se ha encontrado, que podría estar relacionada con la transmisión preferencial de variantes R5 tras el contacto sexual.

En conclusión, nuestros resultados muestran que los niveles de expresión en cérvix de los receptores de quimiocinas evaluados difieren de un receptor a otro y varían de mujer a mujer. En las biopsias de cuello uterino obtenidos de mujeres mexicanas infectadas por VIH-1 y que adquirieron la infección por vía heterosexual, la expresión de la co-receptor CCR5 fue mayor que la de la CXCR4 y que la del DC-SIGN. Este resultado parece apoyar la idea de que la expresión del receptor de quimiocinas puede influir en la transmisión de las cepas R5. Sin embargo, estudios adicionales que evalúen las muestras cervicales obtenidos de series más amplias de pacientes y, sobre todo, las cohortes de recién VIH-1 las mujeres infectadas seguidas durante períodos más largos son necesarios antes de obtener conclusiones definitivas acerca del papel real de estos co-receptores.

## 9. CONCLUSIONES

- Logramos identificar a los receptores de membrana DC-SIGN y los co-receptores CCR5 Y CXCR4 en células de mucosa endocervical de mujeres no infectadas e infectadas con VIH tratadas con terapia antirretroviral por PCR en Tiempo Real.
- Los niveles de expresión del receptor DC-SIGN y de los co-receptores CCR5 y CXCR4, se encuentran en cantidades variables entre las mujeres no infectadas e infectadas con VIH tratadas bajo terapia antirretroviral.
- La aplicación de los diferentes tipos de terapias antirretrovirales de manera individual así como en grupo, no contribuyen significativamente en las diferencias de expresión del receptor DC-SIGN y de los co-receptores CCR5 y CXCR4.
- Debido al número limitado de pacientes incluidos en este estudio, no es posible concluir de manera definitiva la ausencia o existencia de una relación entre la aplicación de la terapia antirretroviral y las variaciones encontradas en los niveles de expresión del receptor DC-SIGN y de los co-receptores CCR5 y CXCR4.
- Al incrementar el número de pacientes, se podrían observar con mayor claridad tendencias que quizá no observamos en el presente trabajo.

## **PERSPECTIVAS**

- Determinar la expresión del receptor DC-SIGN y de los co-receptores CCR5 y CXCR4 por citometría de flujo en pacientes VIH+ con y sin tratamiento antirretroviral.
- Analizar los niveles de expresión del receptor DC-SIGN y de los co-receptores CCR5 y CXCR4, así como de sus quimiocinas en mucosa endocervical y correlacionar el impacto de la aplicación de TARAA en la infección por VIH/SIDA.

## LITERATURA CITADA

**Agáta Gibejová.** Chemokine Receptors. Medical Faculty of Palacký Universit. 2000..Volume 143.

**Agrawal L. et. al.** Role for CCR5 $\Delta$ 32 Protein in Resistance to R5, R5X4, and X4 human Immunodeficiency Virus Type 1 in Primary CD4+ Cells. 2004. J Virol; 78:2277-2287.

**Antony J,** Goldstein DR, Oberli A, et al. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and proper normalization. Lab Invest 2005; 85: 1040-50.

**Baeten JM,** Lavreys L, Overbaugh J. The influence of hormonal contraceptive use on HIV-1 transmission and disease progression. Clin Infect Dis 2007; 45: 360-9.

**Banchereau J,** Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of Dendritic Cells. Annu. Rev. Immunol. 2000, 18: 767-811.

**Banchereau J,** Steinman RM. Dendritic Cells and the Control of Immunity. Nature. 1998; 392:245-252

**Baribaud, F.,** Pöhlmann, S., Leslie, G., Mortari, F. and Doms, R. Quantitative Expression and Virus Transmission Analysis of DC-SIGN on Monocyte-Derived Dendritic Cells. Journal of Virology, 2002; Vol 76, No 18. 9135-9142.

**Barré-Sinoussi F.,** Chermann J.C., Rey F., Chamaret N.S, Gruest J., Dauguet C. y Axler-Blin. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science.1983. Vol 220:868-871.

**Bassol-Mayagoitia S.** La edad de la menopausia en México.Revista de Endocrinología y Nutricion 2006; 14: 133-6.

**Brink N,** Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. Comparative quantification of IL-1., IL-10, IL-10r, TNF.. and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. Inflamm Res 2000; 49: 290-6.

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York and California. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1998. Vol 30: 305–8

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *Morb Mortal Wkly Rep* 1992 / 41(RR-17)

**Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 1994 Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR Recomm Rep* 1994; 43(RR-12):1-10.

**Centro Nacional para la Prevención y el Control del SIDA (CENSIDA).** Secretaría de Salud. Cifras al 31 de Marzo 2012. México. Disponible en línea.: <http://www.censida.salud.gob.mx/interior/panorama.html> (revisado el 16 de Julio 2012)

**Chabot *et. al.*** Mutagenesis of CXCR4 Identifies portant Domains for Human Immunodeficiency Virus Type 1 X4 Isolate Envelope-Mediated Membrane Fusion and Virus Entry and Reveals Cryptic Coreceptor Activity for R5 Isolates, *J. Virol*; 73:6598-6609.

**Cilliers T. *et. al.*** The CCR5 and CXCR4 correceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. 2003. *J. Virol*; 77:4449-4456.

**Clavel F.** y Hance A.J. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004, 350:1023-1035.

**Coombs RW.** Reichelderfer PS, Landay AL. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. 2003..*AIDS.* Vol. 17 No. 4, 455-480.

**Costa J.R.,** Damiano, A., Rubio, R. . La Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana; patogenia, diagnóstico y tratamiento. Ministerio de Sanidad y consumo, Impreso en Madrid, 1991. ISBN 84-404-9992-2, pp 39.

**De Leys R**, Vanderborght B, Vanden Haesevelde M, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of West-Central African origin. *J Virol* .1990;64:1207-16.

**Engering, A.**, Van Vliet, S., Geijtenbeek, T. and Van Kooyk, Y. Subset of DC-SIGN<sup>+</sup> Dendritic Cells in Human Blood Transmits HIV-1 to T Lymphocytes. *Blood*, 2002; Vol. 100, No. 5, 1780-1786

**Gallo RC**, Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med*.2003. Vol 349:2283-2285

**Geijtenbeek TB**, Torensma R, van Vliet SJ, et al. Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell*. 2000; 100: 575-585

**Geijtenbeek, T.**, Kwon, D. et al. DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-infection of T Cells. *Cell* 2000, Vol. 100, 587-597,.

**Gonzalez, E. et. al..** Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1 $\alpha$ : Impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. 2001. *PNAS*; 98,9:5199-5204.

**Gurney KB**, Elliott J, Nassanian H, et al. Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DC-SIGN<sup>+</sup> cells in human rectal mucosa. *J Virol* 2005; 79: 5762-73.

**Helweg-Larsen J.** Pneumocystis jiroveci. *Dan Med Bull*. 2004. Vol. 51:251-73.

**Hirbod T**, Kaldensjö T, Lopalco L, et al. Abundant and superficial expression of C-Type lectin receptors in ectocervix of women at risk of HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 51: 239- 47.

**Hladik F**, Hope TJ. HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr HIV/AIDS Rep* 2009; 6: 20-8.

**Howell AL**, Asin SN, Yeaman GR, Wira CR. HIV-1 Infection of the Female Reproductive Tract. *Curr HIV/AIDS Rep* 2005; 2: 35-38.

**Jameson B**, Baribaud F, Pöhlmann S, et al. Expression of DCSIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* 2002; 76: 1866-75.

**Kuiken, C et. al.** 2011. HIV Sequence Compendium

**Kumar SP**, Smith KY, Pulvirenti JJ, Fouts SB, Kessler HA, Landay AL. Effects of Antiretroviral Therapy (ART) on CCR5 and CXCR4 Receptor Expression. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* 2000 Sep 17-20; 40: 288. Chicago, IL.

**Lane.** Pathogenesis of HIV Infection: Total CD4+ T Cell, Poll, Immune Activation and Inflammation. *Top HIV Med.* 2010;18(1):2-6

**Lara-Villegas H.**, Ixtepan-Turrent L., Rodríguez-Padilla C. El tropismo del VIH y su fenotipificación, *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 2004. U.A.N.L., Vol. 5 No. 4.

**Levin et. al.** Increase in Endocervical CD4 Lymphocytes among Women with Nonulcerative Sexually Transmitted Diseases. 1998. *JID* 1998;177:167-74

**Littman D.R.** Chemokine Receptors: Keys in HIV pathogenesis?. 1998 *Cell*, 93, 677-680.

**Livak KJ**, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

**Loussert-Ajaka I**, Ly TD, Chaix ML, et al. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet.* 1994;343:1393-4.

**Ma Z**, Lu FX, Torten M, Miller CJ. The number and distribution of immune cells in the cervicovaginal mucosa remain constant throughout the menstrual cycle of rhesus macaques. *Clin Immunol* 2001; 100: 240-9.

**Marina B.** Zaitzeva, et. al. CXCR4 and CCR5 on Human Thymocytes: Biological Function and Role in HIV-1 Infection. 1998. *J. Immunol.* 161:3103-3113.

**Markovitz, D.M.** Infection with the Human Immunodeficiency Virus Type 2. *Annals of Internal Medicine.* 1993. 118(3): 211-218

**Massimo Galli.** HIV-1 Long-Term Non-progression: More Open Questions than Answers. *AIDS Rev* 1999; 1:74-79

**McClure CP,** Tighe PJ, Robins RA, et al. HIV coreceptor and chemokine ligand gene expression in the male urethra and female cervix. *AIDS* 2005; 19: 1257-65.

**Merson MH,** Dayton JM, O'Reilly K. Effectiveness of HIV prevention interventions in developing countries. *AIDS* 2000; 24 (Suppl 2): s68–84

**Mestecky J.,** Fultz PN.. Mucosal Immune System of the Human Genital Tract. 1999J. *Infect Dis*; 179(Suppl 3):S470-4.

**Michael Kilby, J. M.D.** et. al. Novel Therapies Based on Mechanisms of HIV-1 Cell Entry. 2003.. *N ENGL J MED* 348;2228-38.

**Morison L.** The global epidemiology of HIV/AIDS. *Br Med Bull.* 2001.Vol 58:7–18

**Mulanga Kabeya C,** Esu-Williams E, Eni E, Peeters M, Saman E, Delaporte E. Evidence for HIV-1 group O infection in Nigeria {Letter}. *Lancet* .995;346:308.

**Myer L,** Wright TC Jr, Denny L, Kuhn L. Nested case-control study of cervical mucosal lesions, ectopy, and incident HIV infection among women in Cape Town, South Africa. *Sex Transm Dis* 2006; 33: 683-7.

**Nicholson JKA,** Browning SW, Hengel RL, et al. CCR5 and CXCR4 expression on memory and naive t cells in HIV-1 infection and response to highly active antiretroviral therapy. *J AIDS* 2001; 27: 105-15.

**Nitin K.** Saksena, Bin Wang, Wayne B. Dyer. Biological and Molecular Mechanisms in Progression and non-Progression of HIV Disease. *Aids Rev* 2001; 3: 133-144.

**Ostrowski MA,** Justement SJ, et. al. Expression of chemokine Receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-Infected and Uninfected Individuals. 1998. *J Immunol*; 161:3195-3201.

**Pantaleo G,** Graziosi C, Fauci A. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine* 1993; 328:327-335.

**Patterson BK**, Landay A, Andersson J, et al. Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract. *Am J Pathol* 1998; 153: 481-90.

**Peeters M** and Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 2000; 14 Suppl 3:S129-40.

**Peeters M**, Gaye A, Mboup S, et al. Presence of HIV-1 group O infection in West Africa {Letter}. *AIDS* .1996;10:343-4.

**Philpott S. et. al.** Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomic RNA Sequences in the Female Genital Tract and Blood: Compartmentalization and Intrapatient Recombination. 2005. *J. Virol*; 79:353-363.

**Piguet, V.** and Blauvelt, A. Essential Roles for Dendritic Cells in the Pathogenesis and Potential Treatment of HIV Disease. *The Journal of Investigative Dermatology*.

**Poppe WA**, Drijkoningen M, Ide PS, Lauweryns JM, Van Assche FA. Lymphocytes and dendritic cells in the normal uterine cervix. An immunohistochemical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 81: 277-82

**Prakash M**, Kapembwa MS, Gotch F, Patterson S. Oral contraceptive use induces upregulation of the CCR5 chemokine receptor on CD4(+) T cells in the cervical epithelium of healthy women. *J Reprod Immunol* 2002; 54: 117-31.

**Prakash M**, Patterson S, Gotch F, Kapembwa MS. Ex vivo analysis of HIV-1 co-receptors at the endocervical mucosa of women using oral contraceptives. *BJOG* 2004; 1111: 1468-70.

**Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y Organización Mundial de la Salud (OMS).** Situación de la Epidemia de SIDA Noviembre de 2010. Disponible en línea:

<http://www.unaids.org/es/dataanalysis/epidemiology/epidemiologyslides/>  
(revisado el 16 de Julio 2012)

**Rivera-Morales, L G.**, Novitsky, V., Trujillo, J R., Lavallo-Montalvo, C., Cano-Dominguez, C. Ramos-Jimenez, J., Jimenez-Rios, E. , Flores-Flores, L, Lopez-Guillen, P., Gilbert, P., Vannberg, F., Tamez-Guerra, R, Rodriguez-Padilla, C. and

Essex, M. The Molecular Epidemiology of HIV type 1 of Men in Mexico. *AIDS Res Human Retroviruses* 2001, 17, pp. 87–92

**Rivera-Morales, L.G.,** Luna-Cruz, I E., Ramos-Alfano, G., Rosas Taraco, A G., Ramos-Jiménez, J., Palacios, G C ., Vázquez-Guillén, J.M., Franco-Molina, M A., Tamez-Guerra, R. y Rodríguez-Padilla, C. Infección por VIH-1 subtipo C. Primer caso reportado. *Gaceta Médica de México*. 2011, 47:424-8

**Robert. W. Doms, et. al..** Co-receptor Use by Primate Lentiviruses. 1998

**Robertson DL,** Anderson JP, Bradac JA, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000; 288:55–6.

**Schols D. et. al.** T-Cell-Line-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 That Is Made Resistant to Stromal Cell-Derived Factor 1 $\alpha$  Contains Mutations in the Envelope gp120 but Does Not Show a Switch in Coreceptor Use. 1998. *J. Virol*; 72:4032-4037.

**Shafer R.W.** Kantor R. y Gonzalez M.J. The genetic basis of HIV-1 resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors. *AIDS Rev* 2000, 2:211-228.

**Shanmugam V.,** W.M. Switzer, J.N. Nkengasong, G. Garcia-Lerma, T.A. Green, E. Ekpini, M. Sassan-Morokro, F. Antunes, K. Manshino, V. Soriano, S.Z. Wiktor, W. Heneine. Lower HIV-2 plasma viral loads may explain differences between the natural histories of HIV-1 and HIV-2 infections. *J. Acquir Immune Defic Syndr.* 2000. 24 (3). 257 – 263

**Sheffield JS,** Wendel GD Jr, McIntire DD, Norgard MV. Effect of genital ulcer disease on HIV-1 coreceptor expression in the female genital Tract. *J Infect Dis* 2007; 196: 1509-16.

**Smith PD,** Li L. Meng C. Mucosal events in the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. 1999;179(Suppl 3):S436-40.

**Steinman, R. M.** DC-SIGN: A Guide to Some Mysteries of Dendritic cells. *Cell* 2000;100, 491-494.

**Su, S.,** Hong, P., Baik, S., Negrete, O., Gurney, K., Lee, B. DC-SIGN Binds to HIV-1 Glycoprotein 120 in a Distinct but Overlapping Fashion Compared with

ICAM-2 and ICAM-3\*. The Journal of Biological Chemistry, 2004; Vol. 279, No. 18, 19122-19132.

**Tenius B. H.** Geijtenbeek, Douglas S. Kwon et al. DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-infection of T Cells. Cell 2000, Vol. 100, 587-597,.

**Thurnher, M.,** Zelle-Rieser, C., Ramoner,R., Bartsch, G. and Hörtl, L. The disabled Dendritic Cell. The FASEB Journal, 2001; Vol. 15, 1054-1061.

**Turville, S.,** Arthos, J., Mac Donald, K., Lynch, G., Naif, H., Clark, G., Hart, D. and Cunningham, A. HIV gp120 Receptors on Human Dendritic Cells. The American Society of Hematology. Blood, 2001; Vol. 98, No. 8 2482-2488.

**Van Kooyk** and Teunis B. H. Geijtenbeek. DC-SIGN: Escape Mechanism for Pathogens. Nature reviews, Immunology, 2003; Vol 3: 697-709.

**Van Montfort T,** Thomas AA, Pollakis G, Paxton WA. Dendritic cells preferentially transfer CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 variants to CD4+ T lymphocytes in trans. J Virol 2008; 82: 7886-96.

**Vidal-Lampurdanés C,** Pumarola-Suñé T. The virus of human immunodeficiency: virological characteristics, natural history and physiopathology of the nervous system infection. Rev Neurol 1996, 24:1563-1568.

**Vincent T,** DeVita Jr, Hellman S, Rosenberg S. AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. 4 Ed. 1997. Lippincott-Raven. pp 29-39.

**Wong ML,** Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantification. Biotechniques 2005; 39: 75-85.

**Yi Y. et. al..** Role of CXCR4 in Cell-Cell Fusion and Infection of Monocyte-Derived Macrophages by Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Strains: Two Distinct Mechanisms of HIV-1 Dual Tropism. 1999. J. Virol; 73:7117-7125.

**Zhang L,** He T, Talal A, Wang G, Frankel SS, Ho DD. In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3 and CCR5. J Virol 1998; 72: 5035-45.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Paulo López Guillén**

**Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología**

**Tesis:** Análisis de la Expresión de Receptores y Co-receptores  
en Células de Mucosa Endocervical de Mujeres Infechadas  
por el Virus de Inmunodeficiencia Humana  
bajo Tratamiento Anti-retroviral

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

### **Datos Personales:**

Nacido en Guadalajara, Jalisco, 12 de Julio 1963, hijo de José López  
García y Ma. De Jesús Guillén Pérez.

Casado, Esposa: Gloria Rocío Sánchez Amaya

Hijas: Gloria Paola y Andrea Yazmín López Sánchez

### **Educación:**

- Licenciatura: Médico Cirujano Partero 1982-1988 Universidad de Guadalajara
- Especialidad en Infectología 1989-1991 Hospital Civil de Guadalajara
- Maestría en Ciencias Médicas: Orientación en Medicina, Universidad de Guadalajara, Centro Universitario en Ciencias de la Salud 1994-1995

### **Experiencia Profesional:**

Médico Adscrito como Infectólogo en la Unidad de Infectología Dr. Juan I  
Menchaca, Ex Hospital General Regional No. 45, IMSS de 1991 al 2008

Diplomado en Alta Gerencia en Servicios de Salud, 2003

Jefe de la Unidad de Infectología Dr. Juan I Menchaca, Ex Hospital General  
Regional No. 45, IMSS 2008 a la fecha.

Artículos: 9 Nacionales y 12 Internacionales

## Expression of CCR5, CXCR4 and DC-SIGN in Cervix of HIV-1 Heterosexually Infected Mexican Women

Lydia Guadalupe Rivera-Morales<sup>1,1</sup>, Paulo Lopez-Guillen<sup>2</sup>, Jose Manuel Vazquez-Guillen<sup>1</sup>, Gerardo C. Palacios-Saucedo<sup>3</sup>, Adrian G. Rosas-Taraco<sup>4</sup>, Antonio Ramirez-Pineda<sup>1</sup>, Patricia Irene Amaya-Garcia<sup>1</sup> and Cristina Rodriguez-Padilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología y Virología; Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

<sup>2</sup>Unidad de Infectología "Dr. Juan I. Menchaca". Hospital General Regional No. 45. Instituto Mexicano del Seguro Social, Jalisco, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Pediatría, Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 and Centro de Investigación Biomedica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Nuevo León, Mexico

<sup>4</sup>Departamento de Inmunología del Hospital Universitario "Dr. Jose Eleuterio Gonzalez", Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

**Abstract: Background:** A number of studies have demonstrated that receptor and co-receptor expression levels which may affect viral entry, promoting cervical HIV infection. The aim was to evaluate the expression levels of CCR5, CXCR4 and DC-SIGN mRNA in a sample of heterosexually HIV infected Mexican women.

**Methods:** We enrolled twenty-six HIV heterosexual infected women attending a local infectious diseases medical unit. RNA was isolated from the cervix and gene expression analysis was performed using real-time PCR.

**Results:** Expression rates for mRNA of CCR5 (median 1.82; range 0.003–2934) were higher than those observed for CXCR4 (0.79; 0.0061–3312) and DC-SIGN (0.33; 0.006–532) receptors ( $p < 0.05$ ). A high correlation was found between the mRNA expression levels of these three receptors ( $r_1 = 0.52$  to  $0.85$ ,  $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** Levels of expression of the tested chemokine receptors in the cervix are different from each other and also vary from woman to woman, and seem to support the suggestion that chemokine receptor expression in genital tissues may be playing a role in the HIV transmission.

**Keywords:** AIDS, HIV-1, Mucosae, CCR5, CXCR4, DC-SIGN.

### BACKGROUND

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a serious public health problem worldwide with 33.4 million people currently living with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) according to UNAIDS and WHO [1]. In Mexico, the number of persons living with HIV is estimated to be 200,000 [2]. Although HIV infection initially affected homosexual men, the virus is now spreading to a growing number of heterosexual individuals. The male-to-female ratio among HIV-1-infected people in Mexico is estimated to be 4.9:1 [3].

A number of HIV-1 infected patients acquired the virus during heterosexual exposure where the virus binds to the CD4 receptor and other co-receptors present on immune cells of the genital mucosa [4, 5]. HIV infection is mediated

by a complex interaction between HIV envelope proteins and receptors on target cells, particularly CD4 receptors; however, expression of this molecule alone is not enough to establish the infection. It is well known that CCR5 and CXCR4 co-receptors are necessary for the virus entrance [6]. Viral strains that utilize CCR5 are classified as R5-tropic (which replaced the designation M-tropic), whereas those that utilize CXCR4 are termed X4-tropic (replacing the designation T-tropic) [7]. R5 variants have been suggested to be the predominant strains following sexual transmission [7, 8]. Experimental evidence indicates that co-receptor expression levels have impact on the efficiency of viral entry and may affect the pathogenesis of the HIV-1 infection [7]. However, data from previous studies have shown differences in the chemokine receptor expression, which possibly indicate that the transmission of R5 variants may not be directly associated with the levels of CCR5 within the genital tract [9]. Another important factor in viral transmission is the C-type lectin DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin, CD-209), which plays a central role in the mucosal HIV-1 infection from

\*Address correspondence to this author at the Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragan s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo León, C.P. 66451, Mexico; Tel: (52 81) 83294115; Fax: (52 81) 83524212; E-mail: [lydia\\_rivera@hotmail.com](mailto:lydia_rivera@hotmail.com)

Dendritic cells (DCs) to T cells. DC-SIGN binds the glycoprotein 120 (gp120) with a high affinity and independently of the other receptors and then transmits virions to T lymphocytes using the physiological functions of the dendritic cells to gain access to the lymphoid tissues [10-12].

Recently, the interest in HIV tropism has re-emerged due mainly to the generation of new promising antiretroviral drugs that target CCR5, CXCR4, and DC-SIGN. Unfortunately, information regarding the events immediately following the HIV-1 infection in humans is insufficient. Therefore, it is important to identify cellular and molecular factors of the host that may be contributing to HIV-1 transmission, not only to understand the subjacent immunopathogenesis but also to obtain information that can be useful to develop strategies to prevent the infection [13]. The aim of this study was to evaluate the mRNA expression of CCR5 and CXCR4 co-receptors and of the DC-SIGN receptor in cervical biopsies in a case series of HIV-1 heterosexually infected Mexican women.

## METHODS

**Patients and sample collection.** HIV-1 heterosexually infected women undergoing medical care at the "Dr. Juan I. Menchaca Unidad de Infectología" Hospital General Regional No. 45, Instituto Mexicano del Seguro Social in Guadalajara, Western Mexico, were eligible. Written informed consent was obtained from each patient, and the study was approved by the institutional research and ethics review board of the Hospital General Regional No. 45. Superficial cervical biopsies (probably containing transitional epithelium with some few endocervical glands) were taken from each patient and stored in 1 ml of RNA stabilization solution (RNAlater; Ambion, Austin, TX) at room temperature. Menstruating patients, those who engaged in sexual activity within 48 hours prior to sampling, those with symptoms of any known genital tract infection, and those with a history of intravenous drug use or blood transfusion were excluded. Women younger 48 years of age were classified as premenopausal, while those with 48 years old and over were considered postmenopausal [14].

**RNA isolation and cDNA synthesis.** Cervical tissues were homogenized in 1 ml of TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and then processed following the manufacturer's instructions. RNA isolate was eluted in RNase-free water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC). RNA concentration was determined by the absorbance at 260 nm. For synthesis of the single strand cDNA, SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and Oligo dT Primer (Invitrogen) were used. The reactions were adjusted to 5 µg of total RNA concentration, and were mixed with 1 µL of 10 mM dNTP's Mix (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). This was completed at a final volume of 12 µL with sterile Milli-Q water. Next, the mixture was heated at 65°C for 5 min and then immediately chilled in an ice bath. In the second step of the reaction, 4 µL of the reaction solution (5x First Strand Buffer, Invitrogen) and 2 µL of DTT 0.1 M were added. This was maintained at 42°C for 2 min. Finally, 0.5 µL of reverse transcriptase enzyme were added and the reaction was completed at a final volume of 20 µL with

sterile Milli-Q water. The mix was incubated for 50 min at 42°C and then for 15 min at 70°C to inactivate the reaction.

**Real-time PCR.** Receptor mRNA relative expression was measured with real-time PCR using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Livak method [15]. The relative expression of the target (HIV-infected), normalized to an endogenous reference (18S rRNA) and controls (15 non-HIV-infected women), was obtained by  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , whereas  $\Delta\Delta C_T$  was defined as the difference of  $\Delta C_T$  (target) and  $\Delta C_T$  (controls), and the  $\Delta C_T$  was defined as the difference in  $C_T$  (CCR5, CXCR4 or DC-SIGN) and the  $C_T$  (endogenous reference) [16]. Serial dilutions from one of the samples were made to validate the efficiency of the quantitative PCR (qPCR) assay and were tested with the Taqman probes. The results were analyzed in a calibration curve considering that the regression value must be close to 1 and the slope close to -3.32 [17]. All reactions were adjusted to a concentration of 10 ng. Double distilled water was used as a negative control. Ten microliters of the TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems/Roche, Foster City, CA) were mixed with 1 µL of the corresponding TaqMan assay. Reactions were completed at 20 µL total volume by adding double distilled water and were performed using the iCycler thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA) in the required settings for TaqMan assays. Primers and probes were designed based on the mRNA sequence, and the sequences were 5'-TGT AGA AGG AGA CAG AGC TGG TT-3' for the forward primer, 5'-GCC GTC AAG GTT CTT CAT GAT CTA G-3' for the reverse primer and 6FAM-5'- CCT CCC CAT GTC TTC C-3'-TAMRA fluorogenic probe for the CCR5 co-receptor. 5'-GTT GTC TGA ACC CCA TCC TCT ATG-3' forward, 5'-CGT GCT GGG CAG AGG TTT TA-3' reverse and 6FAM-5'-AAT TTG GCT CCA AGG AAA G-3'-TAMRA probe for CXCR4; and for the DC-SIGN, 5'-GTC CCT CAG TGG AGC AAG TT-3' forward, 5'-TTC GTT TCT CCT TCT TCA GGG C-3' reverse and 6FAM-5'-CCT GCT GGC GTT TCT-3'- TAMRA probe. Each qPCR reaction was made in triplicate.

**Statistical Analysis.** Medians and ranges were used to describe the main results. The Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate the normality of variables. The non-parametric Wilcoxon's signed rank test and the Friedman's analysis of variance (ANOVA) for repeated measures were used to compare expression levels between the evaluated co-receptors. To compare expression of these co-receptors according to the HAART status of the patients the Mann-Whitney U test and the Kruskal-Wallis' ANOVA were used. The Spearman's test was used to evaluate the correlation of the co-receptor expression levels with the VL and T CD4+ lymphocytes counts. Analysis was carried out using the SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**Patient sample.** Cervical biopsies from 26 HIV-1 heterosexually infected women, 22 to 69 year old, were examined. All patients were asymptomatic and had been diagnosed with HIV-1 infection 1 to 13 years prior to enrollment. At the time of sampling, fourteen patients were on Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) and nine had a history of antiretroviral treatment. Most of these

Table 1. Clinical Characteristics of 26 HIV-1 Heterosexually Infected Mexican Women Included in the Study

Patient No.	Age	Time of Infection <sup>a</sup>	Sexual Partners <sup>b</sup>	Current CD4+ Cell Count <sup>c</sup>	Current Viral Load <sup>d</sup>	HAART Treatment Status	Contraceptive Use
1	69	6	1	560	<50	Currently	Abstinence
2	67	3	1	260	<50	Previously	None
3	41	4	1	200	1870	Currently	Intrauterine device
4	32	3	1	357	5600	Naïve	Abstinence
5	36	11	1	421	<50	Previously	Hormonal oral
6	47	2	1	350	<50	Naïve	None
7	38	13	1	1200	<400	Currently	Condom
8	34	1	1	201	<50	Previously	Hormonal oral
9	38	8	1	258	<50	Previously	Abstinence
10	26	10	1	445	<50	Currently	Abstinence
11	40	2	2	360	<50	Currently	Bilateral tubal occlusion
12	48	9	1	560	<50	Currently	None
13	39	1	2	450	<50	Previously	Abstinence
14	48	1	1	800	<50	Currently	Abstinence
15	51	2	1	430	<50	Previously	Condom
16	48	6	1	208	1800	Previously	Abstinence
17	51	3	1	798	<50	Currently	None
18	41	2	1	546	<50	Previously	None
19	46	1	1	452	<400	Currently	Hormonal oral
20	35	4	1	246	<50	Currently	None
21	27	1	1	450	<50	Previously	None
22	22	6	2	310	400	Currently	Condom
23	46	1	1	969	400	Previously	Abstinence
24	29	3	1	300	1200	Naïve	Abstinence
25	38	9	1	609	<50	Currently	Abstinence
26	62	3	1	550	<400	Currently	Hormonal oral

<sup>a</sup>From the date of the HIV diagnosis in years.

<sup>b</sup>Personal information obtained through direct questioning.

<sup>c</sup>As the number of cells/mm<sup>3</sup> of blood.

<sup>d</sup>As the number of RNA copies/ml of plasma using the COBAS AmpliCor HIV-1 Monitor (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA).

patients had previously received or were receiving the combination of one protease inhibitor boosted with ritonavir plus two Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI). The other three patients had never received antiretroviral therapy. The viral load (VL) of most of the patients was under the detection level (<50 RNA copies/ml) with the exception of four patients whose VL was between 1200 and 5600 copies/ml. Absolute CD4+ cell counts of all patients were above 200 / $\mu$ l (Table 1).

**Expression of CCR5, CXCR4 and DC-SIGN mRNA.** Different expression levels were found for the three co-receptor mRNAs evaluated in the cervical biopsies ( $p < 0.0001$ ). Expression of CCR5 (Ratio<sub>test/calibrator</sub>) median 1.82; range 0.003–2934) was higher than that observed for CXCR4 (0.79; 0.0061–3312) ( $p = 0.025$ ), and the expression of the former was in turn higher than that of the DC-SIGN receptor (0.33; 0.006–532) ( $p = 0.046$ ) (Fig. 1). A high

positive correlation was observed between the expression levels of the three receptor-mRNAs evaluated ( $r$ , ranging from 0.52 to 0.85,  $p < 0.01$ ). No correlation was found between the expression levels of the three co-receptors evaluated with the CD4+ cell counts in blood ( $r$ , ranging from -0.104 to -0.155,  $p = \text{NS}$ ), but we found a moderate correlation of the levels of plasma viral load with the expression of CCR5 ( $r = 0.41$ ,  $p = 0.04$ ) and DC-SIGN ( $r = 0.40$ ,  $p = 0.04$ ). On the other hand, we did not find any difference when expression levels of the three evaluated co-receptor mRNAs were compared according to the HAART status. Thus, median and ranges of CCR5 levels were 1.76 [0.02–759.42], 1.36 [0.00–2934.20] and 31.31 [0.04–98.27] for patients currently on HAART, previously on HAART and naïve, respectively ( $p = 0.91$ ). The expression levels of CXCR4 were 0.81 [0.01–696.39], 0.27 [0.01–3312.30] and 6.69 [0.06–146.40] for the same groups of patients ( $p = 0.87$ ),

while DC-SIGN levels were 0.32 [0.01–327.50], 0.27 [0.01–532.36] and 8.61 [0.03–12.18] ( $p=0.94$ ). No significant differences were found in the expression of the three receptors when we compared pre- and post-menopausal HIV infected patients; however, in pre-menopausal patients all of them were higher. Thus, median and ranges of CCR5 levels were 4.34 [0.00–2934.20] and 0.30 [0.02–759.42] in pre-menopausal and post-menopausal women, respectively ( $p=0.16$ ). The expression levels of CXCR4 were 2.49 [0.01–5312.60] and 0.26 [0.01–693.39] for the same groups of women ( $p=0.17$ ) and for DC-SIGN 4.74 [0.01–532.36], and 0.09 [0.01–327.70] ( $p=0.19$ ).

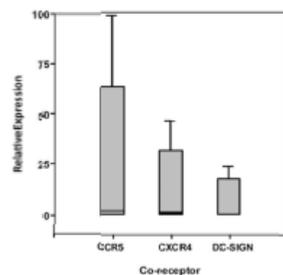


Fig. (1). Box and whisker plot of CCR5, CXCR4 and DC-SIGN receptor expression relative to receptor expression in uninfected women in cervical biopsies of 26 HIV-1 heterosexually infected Mexican women determined by the real-time PCR relative quantification scheme. Extreme values are hidden.

#### DISCUSSION

The global spread of the HIV-1 infection has been achieved by sexual transmission through the genital tract and women seem to be at a higher risk than men are [18]. Infection of cells with HIV-1 in sexual contact sites requires an additional chemokine receptor and it has been suggested that CCR5 is the first receptor utilized, followed by CXCR4 during advanced stages of the disease. Some studies have suggested that the higher expression of CCR5 may be the primary explanation for preferential transmission of CCR5-tropic (R5) isolates within the genital tract; however, this concern is still controversial [9]. In this study, the expression levels of CCR5, CXCR4 and DC-SIGN co-receptor mRNA in cervical biopsies of HIV-1 infected Mexican women were evaluated.

In the present study, the expression of CCR5 mRNA was higher than that observed for CXCR4 or DC-SIGN. Patterson *et al.* [8] also found that the expression levels of CCR5 mRNA were significantly higher than the CXCR4 levels in cervical biopsies obtained from five HIV infected patients. However, McClure *et al.* [9] evaluated cervical scrape samples obtained from a cohort of healthy women and reported that the expression of CCR5 was lower than that of CXCR4. This inconsistency could be due to differences in the evaluated patients and tissue sampling. In contrast to the McClure study, we did not evaluate healthy women. Our findings also differ from those reported by

Zhang *et al.* [19] who, by immunohistochemical staining, found a high expression of CXCR4 in vaginal and cervical samples obtained from both women and macaques. Although in the present study immunohistochemical techniques were not used as Zhang *et al.* did, we used a more sensitive and well-accepted method to quantitatively evaluate mRNA expression levels of these co-receptors [20, 21].

All patients included in the present study acquired HIV infection through sexual intercourse, the most common way of transmission. Sheffield *et al.* [22] showed increased numbers of CD4+ cells expressing CCR5 in biopsies obtained from genital ulcers and it is well known that this type of visible lesions on the cervical mucosa increases the risk of HIV transmission in women [22, 23]. We may exclude such lesions as an explanation for the observed levels of expression of the receptors evaluated because patients with genital ulcers were excluded from our study, however, we did not evaluate the expression levels of mRNA of these receptors on CD4+ cells alone, but on all cells of the endocervix.

A number of studies have shown that the menstrual cycle does not significantly affect the immune status of the genital tract [24–26], nevertheless, Howell *et al.* found that receptor and co-receptor expressions in the genital tract vary as a function of menstrual cycle stages [27]. Therefore, we excluded menstruating patients and those with recent vaginal intercourse to reduce the possibility of mucosal changes related to these events. Prakash *et al.* [28] demonstrated that the use of oral contraceptives is associated with an increased expression of CCR5 on CD4+ T endocervical lymphocytes, which may increase the susceptibility of these cells to HIV-1 infection [29]. Although the microenvironment of the female genital tract may be altered by the use of oral contraceptives, it is highly unlikely that our findings were secondary to their use owing to a low percentage of our patients using them. Moreover, we did not find significant differences between the mRNA expression levels of the three co-receptors, but they tended to be higher in pre-menopausal women when compared with those of post-menopausal women. This suggests that the pre-menopausal women are at a higher risk of re-infection by sexual intercourse with HIV-1 infected partners, but further studies are needed to elucidate the role of the sex hormone status in modifying HIV receptors' and co-receptors' expression and changing the susceptibility of target cells to the HIV infection.

We found no significant differences in the expression levels of mRNA of the three receptors tested according to the antiretroviral treatment status. Previous studies have demonstrated an upregulation of CCR5 expression on several immune cells occurring early in the HIV infection that seems to provide a selective advantage to the virus but that is downregulated toward a normal expression by the antiretroviral therapy [30, 31]. The lack of differences we found might be attributed to the wide variability in the levels of expression observed which in turn might be due to the small number of patients evaluated. In the study by McClure *et al.* [9], a wide range of CXCR4 expression in the female ecto and endocervix was found but not for CCR5.

It has been demonstrated that in addition to the conventional binding of HIV to CD4 and the chemokine coreceptors (CCR5, CXCR4), HIV can interact with

adhesion molecules as DC-SIGN, complement receptors, Fc receptors, and heparan sulfate proteoglycans [32]. We observed a low expression of DC-SIGN in comparison with the other evaluated receptors in the genital tract of HIV-1 heterosexually infected Mexican women. Approximately 1 to 5% of the cells in the rectal mucosa express DC-SIGN [31], which may be related to the low expression levels of this receptor found in the cervix. Jameson *et al.* [13] detected cells expressing DC-SIGN receptors in the subepithelial lamina propria of the vagina and cervix, with a small proportion of these cells co-expressing CCR5 in the vagina but not in the cervix. This finding appears to be different from our results. Additionally, Gurney *et al.* [33] demonstrated that differences in the expression levels of DC-SIGN, CCR5 and CXCR4 chemokine receptors might be relevant in the transfer of the virus from the peripheral to the secondary lymphoid organs or in supporting the local viral infection and replication. However, since the mechanisms involved in the mucosal HIV infection remain unresolved, new insights into the dynamics of these events are needed.

The contributing factors in the emergence of X4 variants in later stages of the HIV infection are unknown. Montfort *et al.* [34] reported that dendritic cells in mucosal sites do not easily transfer R5 viruses. The dendritic cells preferentially transfer X4 viruses to the CD4+ T lymphocytes *in trans*, an effect observed in cells expressing high levels of DC-SIGN receptors [34]. In this study, low levels of DC-SIGN expression in cervical biopsies of HIV heterosexually infected women were found, which might be related to the preferential transmission of R5 variants upon sexual contact.

In conclusion, our findings show that levels of expression in cervix of the evaluated chemokine receptors differ from one receptor to another and vary from woman to woman. In the cervical biopsies obtained from heterosexually HIV-1 infected Mexican women, the expression of the CCR5 co-receptor was higher than that of the CXCR4 and DC-SIGN. This finding seems to support the suggestion that the chemokine receptor expression may influence the transmission of R5 isolates. However, further studies evaluating cervical samples obtained from larger series of patients and, above all, cohorts of recently HIV-1 infected women followed over longer periods are needed before definitive conclusions about the actual role of these co-receptors may be drawn.

#### AUTHORS CONTRIBUTIONS

LGRM and PLG designed the study, carried out experimental and analysis work, and prepared the manuscript. JMVG and GCPS assisted in designing the study, analysis work and drafting the manuscript. AGRT, ARP and PIAG assisted in the interpretation of the data, and in writing and revision of this report. CRP supervised the study and provided substantial intellectual content to the manuscript. All authors critically reviewed and approved the final manuscript.

#### COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by grants SEP CONACYT 2004-CO1-46101 and PAICYT SA-1450-06. We thank Roberto Mercado-Hernandez for his helpful comments regarding the manuscript.

#### REFERENCES

- [1] UNAIDS. 2009 AIDS Epidemic Update. Geneva, Switzerland: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS); 2009. Available at: <http://www.unaids.org/en/> [Accessed: August 29, 2011].
- [2] Secretaría de Salud, México. 2009. Casos de SIDA en México (Cifras al 31 de marzo de 2009). Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH-SIDA (CENSIDA). Available: <http://www.censida.salud.gob.mx/> [Accessed: August 29, 2011].
- [3] Magis C, Hernández M. Epidemiología del SIDA en México. In Córdova JA, Ponce de León S, Valdespino JL (Eds). 25 Años de SIDA en México. Logros, Desaciertos y Retos. México: Secretaría de Salud 2008; pp. 85-103.
- [4] Terrazas-Aranda K, Van Herreweghe Y, Hamza D, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integration: a potential target for microbicides to prevent cell-free or cell-associated HIV-1 infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2544-54.
- [5] Wu L, Kewal Ramani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 859-68.
- [6] Cookley E, Petropoulos CJ, Whitcomb JM. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 9-15.
- [7] Poveda E, Briz V, Quiñones MM, Soriano V. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS* 2006; 20: 1359-67.
- [8] Patterson BK, Landay A, Andersson J, *et al.* Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract. *Am J Pathol* 1998; 153: 481-90.
- [9] McClure CP, Tighe PJ, Robins RA, *et al.* HIV coreceptor and chemokine ligand gene expression in the male urethra and female cervix. *AIDS* 2005; 19: 1257-65.
- [10] Serrano-Gomez D, Sierra-Filardi E, Martinez-Núñez RT, *et al.* Structural requirements for multinization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem* 2008; 283: 3889-903.
- [11] Vazquez-Guillen JM, Garcia-Jacobo PJ, Zapata-Benavides P, *et al.* DC-SIGN expression in peripheral blood dendritic cells of patients with typical, slow and rapid progression to AIDS. *Arch Med Res* 2009; 40: 132-5.
- [12] van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 697-709.
- [13] Jameson B, Baribaud F, Pöhlmann S, *et al.* Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* 2002; 76: 1866-75.
- [14] Bassol-Mayagoitia S. La edad de la menopausia en México. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2006; 14: 133-6.
- [15] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
- [16] Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. Comparative quantification of IL-18, IL-10, IL-10r, TNF $\alpha$  and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin *in vivo*. *Inflamm Res* 2000; 49: 290-6.
- [17] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 2005; 39: 75-85.
- [18] Hladik F, Hope TJ. HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr HIV/AIDS Rep* 2009; 6: 20-8.
- [19] Zhang L, He T, Talal A, Wang G, Frankel SS, Ho DD. *In vivo* distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3 and CCR5. *J Virol* 1998; 72: 5035-45.
- [20] Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601.
- [21] Antony J, Goldstein DR, Oberli A, *et al.* Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and proper normalization. *Lab Invest* 2005; 85: 1040-50.

- [22] Sheffield JS, Wendel GD Jr, McIntire DD, Norgard MV. Effect of genital ulcer disease on HIV-1 coreceptor expression in the female genital tract. *J Infect Dis* 2007; 196: 1509-16.
- [23] Myer L, Wright TC Jr, Denny L, Kuhn L. Nested case-control study of cervical mucosal lesions, ectopy, and incident HIV infection among women in Cape Town, South Africa. *Sex Transm Dis* 2006; 33: 683-7.
- [24] Ma Z, Lu FX, Torten M, Miller CJ. The number and distribution of immune cells in the cervicovaginal mucosa remain constant throughout the menstrual cycle of rhesus macaques. *Clin Immunol* 2001; 100: 240-9.
- [25] Poppe WA, Drijkoningen M, Ide PS, Lauweryns JM, Van Assche FA. Lymphocytes and dendritic cells in the normal uterine cervix. An immunohistochemical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 81: 277-82.
- [26] Prakash M, Kapembwa MS, Gotch F, Patterson S. Oral contraceptive use induces upregulation of the CCR5 chemokine receptor on CD4(+) T cells in the cervical epithelium of healthy women. *J Reprod Immunol* 2002; 54: 117-31.
- [27] Howell AL, Asin SN, Yeaman GR, Wira CR. HIV-1 Infection of the Female Reproductive Tract. *Curr HIV/AIDS Rep* 2005; 2: 35-38.
- [28] Prakash M, Patterson S, Gotch F, Kapembwa MS. Ex vivo analysis of HIV-1 co-receptors at the endocervical mucosa of women using oral contraceptives. *BJOG* 2004; 111: 1468-70.
- [29] Baeten JM, Lavreys L, Overbaugh J. The influence of hormonal contraceptive use on HIV-1 transmission and disease progression. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 360-9.
- [30] Kumar SP, Smith KY, Pulvirenti JJ, Fouts SB, Kessler HA, Landay AL. Effects of Antiretroviral Therapy (ART) on CCR5 and CXCR4 Receptor Expression. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* 2000 Sep 17-20; 40: 288. Chicago, IL.
- [31] Nicholson JKA, Browning SW, Hengel RL, *et al*. CCR5 and CXCR4 expression on memory and naive T cells in HIV-1 infection and response to highly active antiretroviral therapy. *J AIDS* 2001; 27: 105-15.
- [32] Hirbod T, Kaldensjö T, Lopalco L, *et al*. Abundant and superficial expression of C-Type lectin receptors in ectocervix of women at risk of HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 51: 239-47.
- [33] Gurney KB, Elliott J, Nassanian H, *et al*. Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DC-SIGN+ cells in human rectal mucosa. *J Virol* 2005; 79: 5762-73.
- [34] Van Montfort T, Thomas AA, Pollakis G, Paxton WA. Dendritic cells preferentially transfer CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 variants to CD4+ T lymphocytes in trans. *J Virol* 2008; 82: 7886-96.

Received: September 6, 2011

Revised: November 25, 2011

Accepted: April 12, 2012

© Rivera-Morales *et al*; Licensee Bentham Open.This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.



ELSEVIER

Archives of Medical Research 40 (2009) 132–135

---

**Archives  
of Medical  
Research**


---

## BRIEF REPORT

## Expression of DC-SIGN in Peripheral Blood Dendritic Cells of Patients with Typical, Slow, and Rapid Progression to AIDS

José Manuel Vázquez-Guillén,<sup>a</sup> Paola Janeth García-Jacobo,<sup>a</sup> Pablo Zapata-Benavides,<sup>a</sup> Adrian G. Rosas-Taraco,<sup>b</sup> Marco Iván Ordaz-Sánchez,<sup>a</sup> Paulo López-Guillén,<sup>c</sup> Laura Trejo-Ávila,<sup>a</sup> Juan Manuel Alcocer-González,<sup>a</sup> Cristina Rodríguez-Padilla,<sup>a</sup> and Lydia Guadalupe Rivera-Morales<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de Inmunología, Hospital Universitario Dr. José Elesterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

<sup>c</sup>Unidad de Infectología Dr. Juan I. Menchaca, Hospital General Regional No. 45, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalupe, Jalisco, Mexico

Received for publication July 22, 2008; accepted November 14, 2008 (ARCMED-D-08-00326).

The main access route for human immunodeficiency virus (HIV) into the lymph nodes is through the mucosa. Once there, dendritic cells (DCs) are the first cells to interact with the virus. Then, DCs can uptake and transport to the lymph nodes, beginning a disseminated infection. Interaction between the virus and DCs is mediated by the receptor DC-SIGN. This study seeks to determine any relationship between HIV-AIDS immunopathology and DC-SIGN expression levels in DCs from typical, rapid, and slow progressors. A DC separation system was implemented using peripheral blood mononuclear cells from infected subjects. The study included 27 patients classified as typical, rapid, and slow progressors according to their clinical and epidemiological files. Finally, quantification of DC-SIGN was achieved by real-time PCR and by applying the Relative Quantification Scheme ( $\Delta\Delta C_t$ ). We isolated DCs from peripheral blood of 27 HIV-infected patients. Nineteen were considered as typical progressors, five as slow progressors, and three as rapid progressors. No significant differences were observed on the expression levels of DC-SIGN among the three groups of patients. Even if there are differences in expression levels among the analyzed patients, we did not find any significant differences in DC-SIGN expression among the three included groups. We therefore cannot conclude that the expression level of the receptor is related with the progression to AIDS. © 2009 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** AIDS, HIV-1, Dendritic cells, DC-SIGN, Progression.

### Introduction

Cellular and molecular mechanisms involved in human immunodeficiency virus (HIV)-1 transmission after viral exposure to mucosa remain unclear. It is known that immature dendritic cells (DCs) from skin and mucosa surfaces are the first to interact with HIV-1 on primary infection areas (1–4). DCs are strong antigen-presenting cells that initiate the first immune response, controlling the most susceptible areas to pathogen invasion. In peripheral blood they do not represent a homogeneous cellular population. There are at least two

different populations of DCs with morphological differences (5). DC123+ DC11c- of plasmacytoid morphology (PDC) are dependent on IL-3 for their maturation and two subpopulations with a myeloid shape (MDC) and a low or absent expression of CD123 and a high DC11c expression. These are called type 1 myeloid DCs (MDC-1) and type 2 myeloid DCs (MDC-2) (6).

The main characteristic of these cells is their migratory capacity. They migrate from the bone marrow to the tissue and, once there, to the secondary lymphoid organs (7). It has been suggested that HIV reverts the natural function of this cell group and exploits its activity to facilitate access to the replication region of lymphoid organs (8,9). The basis of this hypothesis relies on the identification of DC-SIGN, which mediates the union of DCs with the HIV-1 and the transport to permissive T cells (1,2,9–13). It has

Address reprint requests to: Dra. Lydia G. Rivera Morales, Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66451 México; E-mail: lydia\_rivera\_@hotmail.com

been demonstrated that, because of the high glycosylation of the HIV-1 gp-120, the lectin-type molecules of the cell surface of myeloid and plasmacytoid type DCs are the main route of union to DCs (4). DC-SIGN is an integral surface protein with a carboxyl end that works as a receptor of different viral particles such as Ebola virus, cytomegalovirus, and other microorganisms such as *M. tuberculosis*, *Leishmania pifanoi*, and *Schistosoma mansoni* (2,14). DC-SIGN strongly binds to the HIV-1 envelope gp120 (1,15). When the virus is sexually transmitted, DCs of mucosae capture it and migrate to the lymphoid organs. An efficient infection to T cells through DC-SIGN is then produced and replication takes place (1,10–12).

On the other hand, a characteristic of HIV-1 infection is the personal variability of progression to AIDS due to host factors and viral infectivity differences (16–18). There are three patterns of immunopathological evolution described. Typical progressors represent 80–90% of infected subjects, rapid progressors represent 6–8% and slow progressors represent 2–4% of HIV-1-infected subjects (16).

In this study we have considered that DCs represent a cell population involved in the viral dissemination mechanisms where molecular receptors like DC-SIGN have a vital place in immunological and AIDS progression processes. We intend to establish a relation between HIV/AIDS immunopathogenesis and DC-SIGN level expression in DCs of typical, slow, and rapid AIDS progressor patients.

#### Materials and Methods

We obtained samples from HIV-1-infected subjects. HIV-1-infected subjects were seropositive by ELISA and confirmed by Western blot. After signing informed consent to participate in the study, peripheral blood samples (20–25 mL) were collected in EDTA tubes. Study subjects are affiliated with the “Dr. Juan I. Menchaca” Infectology Unit from the IMSS No. 45 Regional General Hospital in the state of Jalisco, Mexico. Samples were collected during February 2006.

##### *Isolation of DCs from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)*

PBMCs were obtained using Ficol-Paque Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) according to manufacturer instructions. PBMCs obtained were diluted in 300  $\mu$ L of PBS enriched with 0.5% fetal bovine serum. For the isolation of DCs, the magnetic separation method with Blood Dendritic Cell Isolation Kit II Human (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) was done according to manufacturer's instructions.

##### *RNA Isolation and Complementary DNA Synthesis*

DCs were diluted in 1 ml of Trizol (TRIZOL Reagents, Invitrogen, Carlsbad, CA). The procedure was done according

to the manufacturer's instructions. Obtained RNA was resuspended in 20  $\mu$ L of diethyl pyrocarbonate treated water. RNA concentration was determined by measuring absorbance at a wavelength of 260 nm. For the single-strand DNA synthesis, SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and Oligo dT (Oligo dT Primer, Invitrogen) were used. The reactions were adjusted at 5  $\mu$ g of total RNA and mixed with 1  $\mu$ L dNTP mix (10 mM; Amersham Biosciences) plus 1  $\mu$ L de Oligo dT (Oligo dT Primer, Invitrogen). This was completed to a final volume of 12  $\mu$ L with sterile Milli-Q H<sub>2</sub>O. Next, the mixture was heated at 65°C for 5 min and then immediately cooled in ice. During the second stage of the reaction, 4  $\mu$ L of the reaction solution (5x First Strand Buffer, Invitrogen) and 2  $\mu$ L of DTT 0.1 M were added. This remained for 2 min at 42°C. Finally, 0.5  $\mu$ L of the RT enzyme (SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen) was added and the reaction was completed at a final volume of 20  $\mu$ L with sterile Milli-Q H<sub>2</sub>O. Incubation was done for 50 min at 42°C followed by 15 min at 70°C in order to inactivate the reaction.

##### *Quantification of DC-SIGN Expression*

Real-time PCR was applied with Livak's Relative Quantification Scheme. GAPDH was used as change for endogenous control and noninfected donors as comparative calibrators. All reactions were adjusted to a concentration of 10 ng. For negative controls, commercial injectable water was used. Ten  $\mu$ L of the reaction solution (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems/Roche, Foster City, CA) was mixed with 1  $\mu$ L of TaqMan DC-SIGN or TaqMan GAPDH assays, according to the case. The reaction was completed at 20  $\mu$ L by adding injectable water. Primer and probe sequences were designed from DC-SIGN mRNA sequence (mRNA; CD-209 *Homo sapiens*, NCBI GeneBank NM 021155) gtcctcagtgaggcaagtt-3' (forward), 5'-tcgtttctctctcagggc-3' (reverse); 5'-cctctgctgctttct-3' (probe) marked with FAM. The reaction was done with the thermocycler 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) with the required settings.

To validate the quantitative PCR assay and to determine its efficiency, serial dilutions from one of the samples were made. Dilutions were tested for DC-SIGN and for GAPDH. Results were analyzed in a regression curve (calibration curve) considering the regression value must be close to 1 and the slope close to -3.32.

#### Results

##### *Demographic Data of Patients*

We isolated DCs from PBMCs of 27 HIV-infected patients. Nineteen were classified as typical progressors, five as slow progressors, and three as rapid progressors according to

their clinical and epidemiological files and to the recommendations of the infectologist responsible for their treatment (Table 1). To classify the patients, we considered date of infection diagnosis, CD4 counts, and the most recent viral load levels at the time of sample taking.

*Analysis of DC-SIGN Expression*

DC-SIGN expression quantification was made with the Relative Quantification 2<sup>-ΔΔCt</sup> scheme. GADPH was used as an endogenous control and noninfected donors as comparative calibrator. In Figure 1 the relative expression ratio is shown and slight variations of relative expression levels of DC-SIGN are observed, although these do not represent a significant difference in the three groups of patients included in this study.

**Discussion**

Great progress has been made in the understanding of HIV infection since its initial report about 25 years ago. In particular, studies of long-term survivors have provided insights into immune responses that control HIV.

Experimental infections with simian immunodeficiency virus (SIV) in macaques have been used extensively for

modeling of HIV infections due to many similarities in the clinical signs of the immunodeficiency. In two studies performed by Laurén et al. (21,22) with cynomolgus macaques, animals were divided based on the CD4 count, time of death, viral load, and according to the rate of disease progression (progressors, slow progressors and long-term non-progressors). All monkeys developed a neutralizing-antibody response to the inoculum virus, the monkeys infected by the IV route earlier than monkeys infected by intra-rectal route. On the other hand, neutralization-resistant variants emerged in slow progressors and long-term non-progressor monkeys, but they were found earlier in progressor patients. In our study, the great majority of the slow progressor patients considered had IV risk factor. It is possible that our groups may reflect the observations described by Laurén in relation with the progression.

Long-term survivors have certain characteristics reflecting a beneficial anti-HIV immune response: presence of neutralizing antibodies, anti-HIV cytotoxic T cells and innate immune responses, with high levels of interferon-producing cells or plasmacytoid DCs (23). DCs represent an important cell population of the immune system, and the relationship between DCs and mechanism of

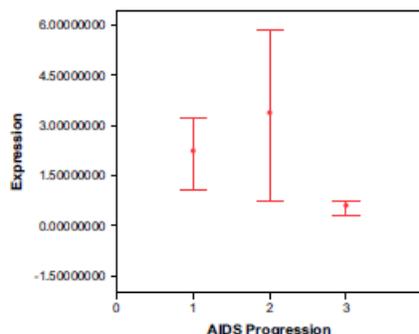
**Table 1.** Clinical history of HIV-1-infected patients included in the study

Patient	Age	Date of diagnosis	Risk factor	CD4 <sup>a</sup>	Viral load <sup>b</sup>	Time of infection <sup>c</sup>	Progression
P-12	70	1991	Transfusion	475	<50	15	Slow
P-35	45	1995	Heterosexual	815	<50	11	Slow
P-44	27	1993	Transfusion	455	<50	13	Slow
P-53	61	1992	Transfusion	425	<50	19	Slow
P-59	37	1992	Drug user	860	420	12	Slow
P-2	41	1992	Heterosexual	245	2,789	14	Typical
P-3	72	1999	Heterosexual	256	<50	7	Typical
P-4	59	1998	Heterosexual	568	<50	8	Typical
P-8	29	2002	Heterosexual	380	<50	4	Typical
P-11	35	2003	Drug user	315	<50	3	Typical
P-13	20	1995	Transfusion	270	5,290	11	Typical
P-34	35	1995	Heterosexual	250	1,800	11	Typical
P-42	44	1996	Heterosexual	140	28,900	10	Typical
P-43	50	1998	Homosexual	370	3,500	7	Typical
P-48	42	1999	Homosexual	290	350	6	Typical
P-50	37	2003	Heterosexual	435	<50	3	Typical
P-61	29	2004	Heterosexual	464	81	2	Typical
P-63	37	2004	Heterosexual	350	<50	2	Typical
P-64	35	2001	Heterosexual	514	2,500	5	Typical
P-66	31	2003	Bisexual	415	35,000	3	Typical
P-68	54	2002	Heterosexual	375	18,000	4	Typical
P-69	55	2000	Heterosexual	275	1,200	6	Typical
P-70	40	1999	Homosexual	97	186,500	10	Typical
P-71	33	1999	Homosexual	342	<50	7	Typical
P-60	43	2002	Heterosexual	56	13,000	4	Rapid
P-65	26	2004	Heterosexual	230	3,800	2	Rapid
P-67	31	2003	Bisexual	315	245,000	3	Rapid

<sup>a</sup>CD4+ cell count/mm<sup>3</sup> of blood.

<sup>b</sup>Viral load/copies/ml of blood.

<sup>c</sup>Expressed in years beginning at the time of diagnosis.



**Figure 1.** Levels of expression of the dendritic cell receptor DC-SIGN by means of the Relative Quantification. A significant difference is not observed of the expression of the DC-SIGN receptor in the three groups of analyzed patients: number 1 corresponds to the group of patients with typical progression, number 2 corresponds to slow progressors and number 3 are the rapid progressors (Kruskal-Wallis in  $\chi^2$  coefficient; bars represent  $\pm 1$  SE).

progression to AIDS after seroconversion has not been well elucidated. Geijtenbeek et al. (12) reported DC-SIGN are involved in HIV entry into the cell through gp120 interaction.

We studied the relationship between DC-SIGN receptor expression on DCs with the different groups of AIDS progressor patients (typical, rapid and slow progressors). Although our results showed that patients with typical and slow progression had slightly higher expression levels of DC-SIGN as compared to rapid progression patients, differences were not significant.

It has been demonstrated by Pöhlmann (19) that HIV transmission can be blocked using anti-DC-SIGN antibodies, suggesting the important role of DC-SIGN levels in viral uptake and its impact on HIV transmission.

In a previous study in our laboratory (20), we found that slow progressor patients showed reduced DC-SIGN expression levels in PBMCs. Although we observed a few variations in DC-SIGN levels among the analyzed patients, we did not find any difference among the three groups of patients.

In summary, we demonstrated that the DC-SIGN levels are not related to AIDS progression. However, results of this study are limited due to the relatively small sample size.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant SEP-CONACYT 2004-CO1-46101) and Universidad Autónoma de Nuevo León (grant PAICYT CN1102-05). We are grateful to Q.B.P. Patricia I. Amaya-García for translating this paper.

#### References

- Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587–597.
- Van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature Rev Immunol* 2003;3:697–709.
- Steinman RM. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000;100:491–494.
- Turville SG, Arthos J, Donald K, et al. HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* 2001;8:2482–2488.
- Drionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165:6037–6046.
- McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol* 2005;1:17–27.
- Thurnher M, Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Hörtl L. The disabled dendritic cell. *FASEB J* 2001;15:1054–1061.
- Jameson B, Baribaud F, Pöhlmann S, et al. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* 2002;4:1866–1875.
- Su SV, Gurney KB, Lee B. Sugar and spice: viral envelope-DC-SIGN interactions in HIV pathogenesis. *Curr HIV Res* 2003;1:87–99.
- Piquet V, Blauvelt A. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J Invest Dermatol* 2002;119:365–369.
- Engering A, Van Vliet SJ, Geijtenbeek TBH, Van Kooyk Y. Subset of DC-SIGN<sup>+</sup> dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 2002;5:1780–1786.
- Geijtenbeek TBH, Torensma R, Van Vliet SJ, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100:575–585.
- Baribaud F, Pöhlmann S, Leslie G, Mortari F, Doms RW. Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells. *J Virol* 2002;18:9135–9142.
- Su SV, Hong P, Baik S, Negrete OA, Gurney KB, Lee B. DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3. *J Biol Chem* 2004;18:19122–19132.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
- Gall M. HIV-1 Long-term non-progression: more open questions than answers. *AIDS Rev* 1999;1:74–79.
- Saksena NK, Wang B, Dyer WB. Biological and molecular mechanisms in progression and non-progression of HIV disease. *AIDS Rev* 2001;3:133–144.
- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *New Engl J Med* 1993;328:327–335.
- Pöhlmann S, Baribaud F, Lee B, et al. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 2001;10:4664–4672.
- Ordaz-Sánchez MI, Vázquez-Guillen JM, Rivera-Morales LG, et al. Expresión del receptor de células dendríticas DC-SIGN en la inmunopatología del VIH/SIDA. *CIENCIA-UANL* 2008;11:177–184.
- Laurén A, Vidrús D, Thorstenson R, Fenó EM. Comparative studies on mucosal and intravenous transmission of simian immunodeficiency virus (SIVsm): evolution of coreceptor use varies with pathogenic outcome. *J Gen Virol* 2006;87:581–594.
- Laurén A, Thorstenson R, Fenó EM. Comparative studies on mucosal and intravenous transmission of simian immunodeficiency virus (SIVsm): the kinetics of evolution to neutralization resistance are related to progression rate of disease. *J Gen Virol* 2006;87:595–606.
- Levy JA. HIV Pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. *Adv Dental Res* 2006;19:10–16.