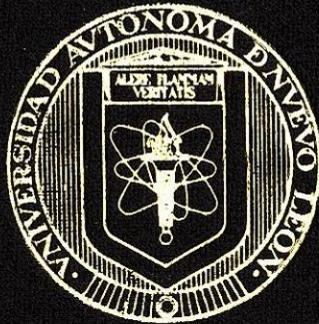


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“Detección y Análisis de la Expresión del Receptor de
Células Dendríticas DC-SIGN en Pacientes de
Progresión Típica y Rápida al SIDA”

Presentado por:

JOSE MANUEL VAZQUEZ GUILLEN

Como requisito para obtener el título profesional de
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

Ciudad Universitaria

Agosto de 2006

TL
RC607
.A26
V39
2006
c.1



1080091475

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



*"Detección y Análisis de la Expresión del Receptor de
Células Dendríticas DC-SIGN en Pacientes de
Progresión Típica y Rápida al SIDA"*

Presentado por:

JOSE MANUEL VAZQUEZ GUILLEN

Como requisito para obtener el título profesional de
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

Ciudad Universitaria

Agosto de 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



COMISIÓN DE TESIS

“Detección y Análisis de la Expresión del Receptor de Células Dendríticas

DC-SIGN en Pacientes de Progresión Típica y Rápida al SIDA”

Dra. Lynn Susana Rivera Morales
Secretaria

Dra. Laura M. Trejo Avila
Secretaria

Presentado por

JOSÉ MANUEL VÁZQUEZ GUILLÉN

Como requisito para obtener el título profesional de

QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

Dr. Paulo López Guillén
Asesor Externo

Ciudad Universitaria

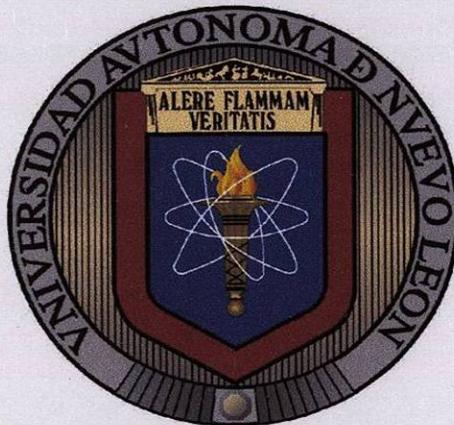
Agosto de 2006

Agosto de 2006

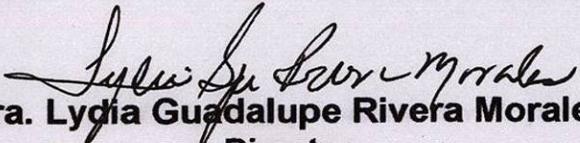


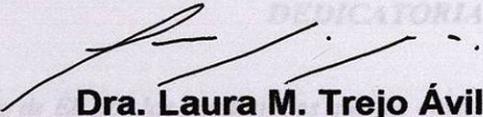
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

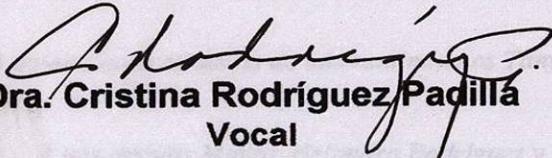
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

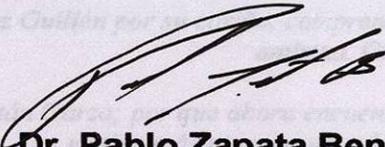


COMISIÓN DE TESIS


Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Director


Dra. Laura M. Trejo Ávila
Secretario


Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal


Dr. Pablo Zapata Benavides
Suplente

Dr. Paulo López Guillén
Asesor Externo

Ciudad Universitaria

Agosto de 2006

DEDICATORIA

A Dios por la oportunidad de vivir, por saberme hijo de Él, por las bendiciones que me envía.

A mis padres José Manuel Vázquez J. y Esperanza Guillén. Gracias por su incansable amor, por creer en mi, por que se que siempre están conmigo. Por darme una familia.

A mis hermanas Jessica Esperanza y Pamela Ivette Vázquez Guillén por su cariño, comprensión y amistad. Gracias

A quien ahora es dueña de mis sentimientos Tanya Paola Tristán Garza; por que ahora encuentro un motivo más para seguir adelante.

A mis amigos Mayra Alejandra Rodríguez y Carlos Orozco; gracias por no dejarme nunca sentir solo.

A mis amigos de siempre Juan Manuel, Elio, Fernanda, Regina, Sarahí, Mayra, Tanya, Vianey; también a Paola, Nayelly, Marichu. y Lalo. Gracias por los momentos inolvidables de convivencia.

A la Dra. Lydia G. Rivera; mis más sinceros agradecimientos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales por el apoyo incondicional para lograr éste trabajo de tesis; por que a pesar de todas las adversidades presentadas siempre me demostró confianza plena en que podría salir adelante.

A Paola Janeth García Jacobo (*Pavito*) por las enormes contribuciones para lograr éste trabajo, por los grandiosos momentos que pasamos esmerándonos en obtener resultados, por que somos el mejor equipo.

Al M.C. Marco Iván Ordáz Sánchez por el tiempo y dedicación que ha invertido a mi proyecto, por que siempre me he sentido apoyado por él.

A todos mis compañeros de la Unidad de Infectología Molecular: Evelyn Carelis, Antonio Ramírez, Paty Amaya, Jorge Covarrubias, Karina Astorga, Ricardo, Claribel, Yessica M. en quienes he encontrado una verdadera amistad.

Al M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez por su poyo invaluable, atinados consejos y las oportunidades de desarrollo que ha dirigido a mí persona.

Al M.C. Gerardo Ramos Alfano por la amistad que me brinda, por que se que siempre ha estado dispuesto a ayudarme.

A la M.C. Janeth Edith Salinas Hernández (*Jeannie*) por su confianza, amistad y enseñanzas a lo largo de todo éste tiempo.

A la Q.B.P. Belén O. Ávila de *Applied Biosystems México*, la M.C. Karina Trujillo M. del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L y al Q.B.P. Santiago Saavedra por su colaboración y asesoría en el trabajo experimental.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y a todo el personal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por todas las facilidades proporcionadas para la realización de este proyecto de investigación.

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 Coinfección por Mycobacterium tuberculosis* (SEP-2004-C01-46101) a cargo de la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales.
- Por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León titulado *Identificación y Análisis del Receptor de Células Dendríticas DC-SIGN en Pacientes con Típica, Lenta y Rápida Progresión a SIDA (Clave CN1102-05)*.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación fue realizado en la Unidad de Infectología Molecular del Laboratorio de Inmunología y Virología en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección general de la Dra. Lydia G. Rivera Morales y la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| SECCIÓN | PÁGINA |
|---|--------|
| I. Abreviaturas y Simbología Empleadas | 1 |
| II. Índice de Tablas y Figuras | 3 |
| III. Introducción | 5 |
| IV. Justificación | 6 |
| V. Hipótesis | 7 |
| VI. Objetivo General | 8 |
| VII. Objetivos Específicos | 8 |
| VIII. Antecedentes | 9 |
| 1. Marco Histórico | 9 |
| 2. Situación Actual del <i>VIH/SIDA</i> | 9 |
| 2.1 Situación Mundial del <i>VIH/SIDA</i> | 9 |
| 2.2 Situación del <i>VIH/SIDA</i> en México | 10 |
| 3. Virus de Inmunodeficiencia Humana (<i>VIH</i>) | 12 |
| 3.1 Clasificación, Estructura y Genoma | 12 |
| 3.2 Subtipos del Virus de Inmunodeficiencia Humana | 14 |
| 4. Inmunopatogénesis | 15 |
| 4.1 Tropismo e Infección a Órganos Linfáticos | 16 |
| 5. Células Dendríticas: Células Presentadoras de Antígenos | 16 |
| 5.1 Subpoblaciones de Células Dendríticas | 17 |
| 6. Papel de las Células Dendríticas en la Infección por el <i>VIH-1</i> | 18 |
| 7. Interacción Célula Dendrítica- <i>VIH-1</i> : <i>DC-SIGN</i> | 19 |
| IX. Estrategia General | 22 |
| X. Materiales y Métodos | 23 |
| 1. Obtención de Muestras de Individuos Infectados con <i>VIH-1</i> | 23 |
| 2. Separación de Células Mononucleares a partir de Sangre Periférica | 23 |
| 3. Aislamiento de Células Dendríticas a partir de Mononucleares | 23 |
| 3.1 Marcaje y Depleción Magnética de Células No Dendríticas | 24 |
| 3.2 Marcaje Magnético y Selección de Células Dendríticas | 24 |
| 4. Extracción de <i>ARN</i> a partir de Células Dendríticas | 25 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5. | Cuantificación y Calidad del <i>ARN</i> Obtenido | 25 |
| 6. | Síntesis del <i>ADN</i> Complementario | 26 |
| 7. | Detección de la Expresión del <i>DC-SIGN</i> mediante <i>PCR</i> convencional | 26 |
| 8. | Cuantificación del <i>ADNc</i> Sintetizado | 27 |
| 9. | Cuantificación de la Expresión del <i>DC-SIGN</i> | 28 |
| XI. | Esquemas de Procedimientos | 29 |
| 1. | Obtención de Células Dendríticas a partir de <i>CMSP</i> | 29 |
| XII. | Resultados | 31 |
| 1. | Obtención y Clasificación de Muestras de Pacientes <i>VIH-1+</i> | 31 |
| 2. | Extracción, Calidad y Cuantificación de Concentración y del <i>ARN</i> obtenido | 31 |
| 3. | Concentración del <i>ADNc</i> Sintetizado | 33 |
| 4. | Detección de la Expresión mediante <i>PCR</i> convencional | 33 |
| 5. | Cuantificación de la Expresión del Receptor <i>DC-SIGN</i> mediante <i>PCR</i> Cuantitativo en Tiempo Real | 34 |
| 5.1 | Diseño del Ensayo con Sondas <i>TaqMan</i> [®] | 34 |
| 5.2 | Cuantificación de la expresión de <i>GAPDH</i> y <i>DC-SIGN</i> mediante <i>PCR</i> Cuantitativo en Tiempo Real. | 37 |
| 5.2.1 | Detección de la Fluorescencia emitida | 37 |
| 5.2.2 | Cuantificación de la Expresión del <i>DC-SIGN</i> mediante el método $\Delta\Delta Ct$ | 38 |
| 6. | Validación del experimento de <i>PCR</i> Cuantitativo en Tiempo Real | 40 |
| XIII. | Discusión | 44 |
| XIV. | Conclusión | 47 |
| XV. | Perspectivas | 48 |
| XVI. | Referencias | 49 |

I. ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA EMPLEADAS

| | |
|--------------------------|--|
| A (a) | Adenina |
| Abs (A) | Absorbancia |
| ADN | Ácido Desoxi-Ribonucleico |
| ADNc | Ácido Desoxi-Ribonucleico Complementario |
| ARN | Ácido Ribo-Nucleico |
| ARNm | Ácido Ribo-Nucleico Mensajero |
| ARNr | Ácido Ribo-Nucleico Ribosomal |
| ARV | Virus Asociado al SIDA |
| BCS | Suero Fetal Bovino (<i>Bovine Calf Serum</i>) |
| BDCA | Antígeno de Células Dendríticas en Sangre (<i>Blood Dendritic Cell Antigen</i>) |
| BSA | Albúmina de Suero Bovino |
| C | Citocina |
| CD | Célula Dendrítica |
| CD14 ⁺ | Marcador de Monocitos de Union a LPS |
| CD19 ⁺ | Marcador de Células B |
| CD4 ⁺ | Marcador de superficie de Células T |
| CDC | Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (<i>Centers for Disease Control and Prevention, E. U. A.</i>) |
| CMSP | Células Mononucleares de Sangre Periférica |
| CMV | Citomegalovirus |
| CPA | Células Presentadoras de Antígenos |
| Ct | Punto de Corte (<i>Threshold Cycle</i>) |
| DC-SIGN | <i>Dendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Non-Integrin</i> |
| DEPC | Di-Etilpirocarbonato |
| dNTP's | Dinucleótidos trifosfatados |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Etilen diamino-tetra-acético |
| ELISA | Ensayo Inmunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| Fc | Fragmento Cristalizable |
| G | Guanina |
| g | Gramo |
| GAPDH | Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa |
| GM-CSF | Factor Estimulador de Colonia de Granulocitos y Monocitos |
| gp | Glicoproteína |
| gp120 | Glicoproteína 120 |
| HAART | Tratamiento Antirretroviral Altamente Eficaz |
| H ₂ O Milli-Q | Agua Ultrapura |
| HSH | Hombres que Tienen Sexo con Hombres |
| HTLV-III | Virus Linfotrópico de Células T Humanas tipo III |
| ICAM-2 | Moléculas de Adhesión Intercelular-2 |
| ICAM-3 | Moléculas de Adhesión Intercelular-3 |
| IFN-γ | Interferón Gamma |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IL-13 | Interleucina 13 |

| | |
|--------------------|---|
| IL-3 | Interleucina 3 |
| Kb | Kilobase |
| LAV | Virus Asociado a Linfadenopatía |
| LD | Columna de Separación Magnética tipo LD |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| MDC | Células Dendríticas de tipo Mieloide/Monocitoide (<i>Myeloid/Monocytoid Dendritic Cells</i>) |
| MDC-1 | Células Dendríticas Mieloides tipo 1 |
| MDC-2 | Células Dendríticas Mieloides tipo 2 |
| mg/mL | Miligramo por Mililitro |
| µg/ml | Microgramo por Mililitro |
| MgCl ₂ | Cloruro de Magnesio |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Mili-Molar |
| MS | Columna de Separación Magnética tipo MS |
| NaCl ₂ | Cloruro de Sodio |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information; E.U.A.</i> |
| ng | Nanogramo |
| ng/µL | Nanogramo por Microlitro |
| NK | Células Asesinas Naturales (<i>Natural Killer</i>) |
| nm | Nanómetros |
| ONUSIDA | Programa conjunto de las naciones unidas para el SIDA |
| pb | Pares de Bases |
| PBS | Buffer Fosfato-Salino |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) |
| PDC | Células Dendríticas tipo Plasmacitoides (<i>Plasmacytoid Dendritic Cells</i>) |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| rpm | Revoluciones por Minuto |
| RT | Retro-Transcripción |
| s | Segundo |
| SIDA | Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida |
| SSA | Secretaría de Salubridad y Asistencia |
| T | Timina |
| T CD4 ⁺ | Células T de población Cooperadoras |
| Tm | Temperatura de alineamiento (<i>Melting Temperature</i>) |
| TNF-α | Factor de Necrosis Tumoral Alfa |
| UDI | Usuarios de Drogas Intravenosas |
| UV | Ultra Violeta |
| V | Voltaje |
| VHC | Virus de Hepatitis C |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |
| VIH-1 | Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 |
| VIH-2 | Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 2 |
| vol | Volumen |
| °C | Grado Celsius/Centígrado |
| µg | Microgramo |
| µg/µL | Microgramo por Microlitro |
| µL | Microlitro |

II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| TABLA | PÁGINA |
|--|---------------|
| 1. Índice de casos acumulados equivalente a cada categoría de transmisión del <i>VIH/SIDA</i> en México | 11 |
| 2. Algunos genes encontrados en el genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana y sus funciones más importantes. | 13 |
| 3. Diferentes Subpoblaciones de Células Dendríticas encontradas en sangre periférica y sus respectivos marcadores de superficie. | 18 |
| 4. Historial Clínico y Epidemiológico de los Pacientes Infectados por el <i>VIH</i> Incluidos en el Estudio. | 31 |
| 5. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro de cada muestra de <i>ARN</i> . | 32 |
| 6. Concentración del <i>ADNc</i> . | 33 |
| 7. Características de cada uno de los componentes del Ensayo <i>TaqMan</i> [®] para el receptor <i>DC-SIGN</i> . | 35 |
| 8. Secuencia Nucleotídica del Receptor de Células Dendríticas <i>DC-SIGN</i> y diseño del Ensayo <i>TaqMan</i> [®] . | 36 |
| 9. Niveles de la intensidad de fluorescencia registrada al punto de corte (<i>Ct</i>) en el PCR en Tiempo Real del receptor de Células Dendríticas <i>DC-SIGN</i> y el gen constitutivo <i>GAPDH</i> . | 37 |
| 10. Cuantificación de la Expresión del <i>DC-SIGN</i> mediante el método $\Delta\Delta Ct$ | 38 |

| FIGURA | PÁGINA |
|--|---------------|
| 1. Clasificación por sexo del total de infectados hasta el 2005 en México. | 11 |
| 2. Estructura básica del Virus de Inmunodeficiencia Humana | 14 |
| 3. Infección productiva por el <i>VIH-1</i> a los linfocitos T cooperadores empleando al DC-SIGN de las Células Dendríticas como acarreador. | 21 |
| 4. Marcaje Magnético de Células No-Dendríticas | 29 |
| 5. Separación Magnética: Depleción de Células No-Dendríticas | 29 |
| 6. Marcaje Magnético de Células Dendríticas | 30 |
| 7. Separación Magnética: Recuperación de Células Dendríticas | 30 |
| 8. Calidad de las muestras de <i>ARN</i> a través de geles desnaturalizantes de agarosa. | 32 |
| 9. Amplificación de <i>GAPDH</i> mediante <i>PCR</i> Convencional. | 34 |
| 10. Análisis de la expresión del receptor <i>DC-SIGN</i> en pacientes Típicos y Rápidos Progresores comparada con donadores no infectados. | 39 |
| 11. Curva de Regresión lineal del Ensayo para <i>DC-SIGN</i> en donde se muestra una pendiente de -3.049 y $R^2=0.982924$ | 40 |
| 12. Curva de Regresión lineal del Ensayo para <i>GAPDH</i> en donde se muestra una pendiente de -3.335486 y $R^2=0.989390$ | 41 |
| 13. Gráfica obtenida del <i>PCR</i> en Tiempo Real del receptor <i>DC-SIGN</i> de pacientes <i>VIH-1+</i> . En color verde se muestra el umbral de detección <i>Ct</i> (<i>Threshold Cycle</i>). | 42 |
| 14. Gráfica obtenida del <i>PCR</i> en tiempo real del gen constitutivo <i>GAPDH</i> de pacientes <i>VIH-1+</i> . En color verde se muestra el umbral de detección <i>Ct</i> (<i>Threshold Cycle</i>). | 43 |

III. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (*SIDA*) es una enfermedad infecciosa y transmisible con una elevada tasa de mortalidad que se caracteriza por ser una alteración adquirida y severa, con pérdida progresiva de la función inmune que predispone al paciente a infecciones graves por microorganismos oportunistas y al desarrollo de neoplasias.

Existen dos virus de Inmunodeficiencia humana: el *VIH* tipo 1 (*VIH-1*) y el *VIH* tipo 2 (*VIH-2*), el primero es el responsable de la pandemia en todo el mundo, mientras que el tipo 2 es endémico del continente Africano. La forma más frecuente de transmisión del *VIH* es por contacto sexual; de ésta forma, alcanza al sistema inmunológico a través de las superficies mucosas. Dichas superficies incluyen recto y mucosa genital, las cuales son ricas en Células Dendríticas (*CD*) que atrapan antígenos y partículas virales para posteriormente ser presentadas a los linfocitos *CD4⁺*.

Se ha identificado una lectina tipo *C* exclusiva y altamente expresada en Células Dendríticas, que se une con alta afinidad a la glicoproteína de envoltura *gp120* del *VIH-1*, la cual ha sido denominada *DC-SIGN*. Las células que expresan este receptor de membrana pueden capturar al virus y transportarlo a los ganglios linfáticos empleando las funciones presentadoras de estas células, originando de esta forma una infección ampliamente diseminada. Lo anterior sugiere que el *DC-SIGN* tiene un papel clave en la infección y diseminación primaria del *VIH-1*.

IV. JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes indican que las Células Dendríticas son la primera línea de defensa en interactuar con el *VIH-1* durante la transmisión sexual, interacción que es mediada por el receptor de membrana *DC-SIGN*. Por otra parte, se desconoce con certeza cual es el mecanismo que esta involucrado en la progresión al *SIDA* aunque sabemos de antemano que en este proceso influyen parámetros inmunológicos y virológicos. ➤

Por lo tanto, identificar y analizar la expresión del receptor *DC-SIGN* en pacientes que desarrollan una típica o rápida progresión a *SIDA*, es de gran utilidad para establecer si la expresión del receptor esta relacionada con la evolución de la enfermedad.

V. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión del receptor de Células Dendríticas *DC-SIGN* pueden estar relacionados en la progresión Típica y Rápida al *SIDA*.

CO

VI. OBJETIVO GENERAL

Identificar y analizar la expresión del receptor de células dendríticas *DC-SIGN* en pacientes de progresión típica y rápida al *SIDA*.

ESTOS
NO SON
OBJETIVOS

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtención de muestras de pacientes de típica y rápida progresión al *SIDA* y su respectivo historial clínicos y epidemiológicos.
2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica en pacientes de típica y rápida progresión al *SIDA*.
3. Aislamiento de células dendríticas a partir de mononucleares de pacientes con típica y rápida progresión al *SIDA*.
4. Extracción de *ARNm* de Células Dendríticas de pacientes típicos y rápidos progresores.
5. Producción de *ADNc* a partir de *ARNm* obtenido de Células Dendríticas de pacientes con típica y rápida progresión al *SIDA*.
6. Detectar y Cuantificar la expresión del receptor *DC-SIGN* en células dendríticas de pacientes típicos y rápidos progresores al *SIDA* mediante la tecnología del *PCR Cuantitativo en Tiempo Real*.
7. Analizar la expresión del receptor de Células Dendríticas *DC-SIGN* en pacientes típicos y rápidos progresores a *SIDA*.

lista de actividades
para que objetivos

VIII. ANTECEDENTES

1. Marco Histórico

En 1981 se publicaron los primeros casos de un nuevo síndrome que se presentaba de forma frecuente entre hombres homosexuales y/o bisexuales que se caracterizaba por el desarrollo de infecciones oportunistas y ciertos tipos de neoplasias como el Sarcoma de Kaposi todo esto debido a una inmunodeficiencia grave e irreversible que afectaba principalmente a la inmunidad de tipo celular¹. Para 1982, este síndrome fue denominado por el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (*SIDA*)^{1, 23}.

Posteriormente, en 1983 el grupo de Luc Montaigner del Instituto Pasteur en París aisló un retrovirus a partir de linfocitos *T* de sangre periférica de un paciente afectado de linfadenopatía generalizada; este virus poseía linfotropismo para las células *T* y fue denominado como Virus Asociado a Linfadenopatía (*LAV*)². En 1984 fueron aislados dos virus similares, Virus Linfotrópico de Células T Humanas tipo III (*HTLV-III*) y Virus Asociado al SIDA (*ARV*) obtenidos por el grupo de Robert Gallo en el Instituto Nacional de Salud de E.U. y Jay Levy de la Universidad de California respectivamente. Estudios del genoma de los tres aislados determinaron que, si bien presentaban ciertas diferencias, se trataba de variantes de un mismo virus cuya asociación al SIDA quedó demostrada por seroepidemiología³.

A mediados de 1986 el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus acordó denominar Virus de Inmunodeficiencia Humana (*VIH*) al agente etiológico del *SIDA* 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*)¹.

2. Situación Actual del VIH/SIDA

2.1 Situación Mundial del VIH/SIDA

Para diciembre del 2005 la epidemia de *VIH/SIDA* cobró la vida de más de tres millones de personas y se estima que 5 millones fueron infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (*VIH*), con lo que la cifra de personas que vivían con el

virus en todo el mundo se elevó a 40.3 millones. Siendo la región más afectada la de África Subsahariana con 25.8 millones, el resto del mundo también ha sido afectado con gran fuerza por esta epidemia, lo que en números se refleja de la siguiente manera. A finales del 2005 se calculaba que había 510, 000 africanos en norte y oriente medio viviendo con el *VIH*; en América Latina viven cerca de 1.8 millones; en América del Norte 1.2 millones; en Europa Occidental y central hay aproximadamente 720, 000 personas portadoras del virus.

2.2 Situación del *VIH/SIDA* en México

En México la infección por *VIH-1* se ha convertido en un serio problema de salud pública, con múltiples consecuencias sociales, económicas y políticas⁵, se puede decir que el comportamiento de la epidemia es idéntico al de los países industrializados de occidente³².

Desde el inicio de la epidemia hasta el 31 de diciembre del año 2005 se han registrado de manera acumulada 102, 575 casos de *SIDA* en México³³ y se calcula que existen hasta 180, 000 personas viviendo infectadas por este virus.

La transmisión sexual ha sido la causante del 92.1% de los casos acumulados de *SIDA* en México; el 5.3% se originaron por vía sanguínea de los cuales, se incluyen el 3.5% por transfusión sanguínea, 4% le corresponde a hemofílicos, el 0.6% a donadores, 0.7% usuarios de drogas intravenosas y menos del 0.1% por exposición ocupacional/laboral; la transmisión perinatal representa el 2.3% del total de casos y la categoría combinada de hombres que tienen sexo con otros hombres y usuarios de drogas intravenosas (*HSH/UDI*) el 0.3% (Tabla 1)³³.

México se ha considerado un país cuya epidemia se concentra fundamentalmente en el grupo de hombres que tienen sexo con otros hombres (*HSH*), con un peso equivalente al 47.3% aunque la categoría de transmisión heterosexual a llegado a ocupar el 44.8% en el total de los casos acumulados vía sexual³³.

Respecto a la clasificación por sexo, se ha establecido que el 83.2% equivalente a 85, 307 corresponde a hombres mientras que el 16.8% lo representan 17, 268 mujeres del total de los infectados hasta el 2005 (Figura 1). También es importante destacar que un total de 79, 984 personas, las cuales ocupan el 78.8% de los casos acumulados, se encuentran en edades laboralmente productivas que incluyen desde los 15 hasta 44 años de edad³³.

Tabla 1. Índice de casos acumulados equivalente a cada categoría de transmisión del VIH/SIDA en México para el cierre del 2005.

| CATEGORIAS | PORCENTAJE |
|----------------------|--------------|
| Heterosexual | 44.8% |
| Homosexual | 47.3% |
| Sexual | 92.1% |
| Transfusión | 3.5% |
| Hemofílico | 0.4% |
| Donadores | 0.6% |
| Drogas I. V. | 0.7% |
| Ocupacional | 0.1% |
| Vía Sanguínea | 5.3% |
| Perinatal | 2.3% |
| HSH/UDI | 0.3% |

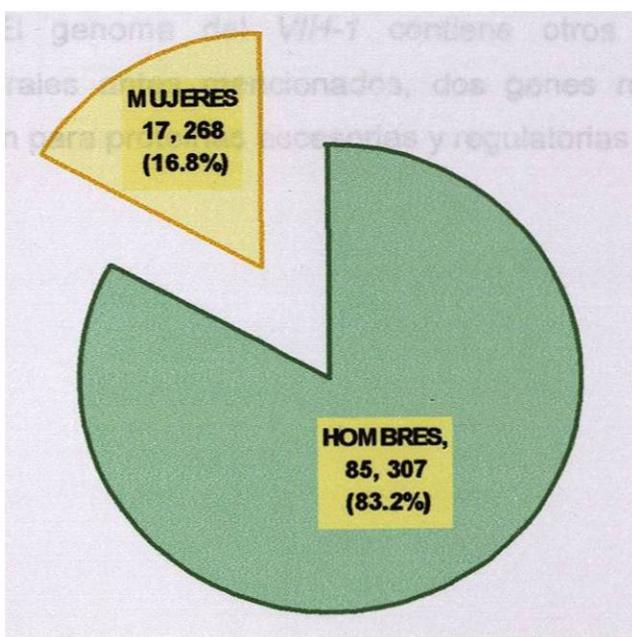


Figura 1. Clasificación por sexo del total de infectados hasta el 2005 en México.

3. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

3.1 Clasificación, Estructura y Genoma

Es un virus de *ARN* perteneciente 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 tiempo¹.

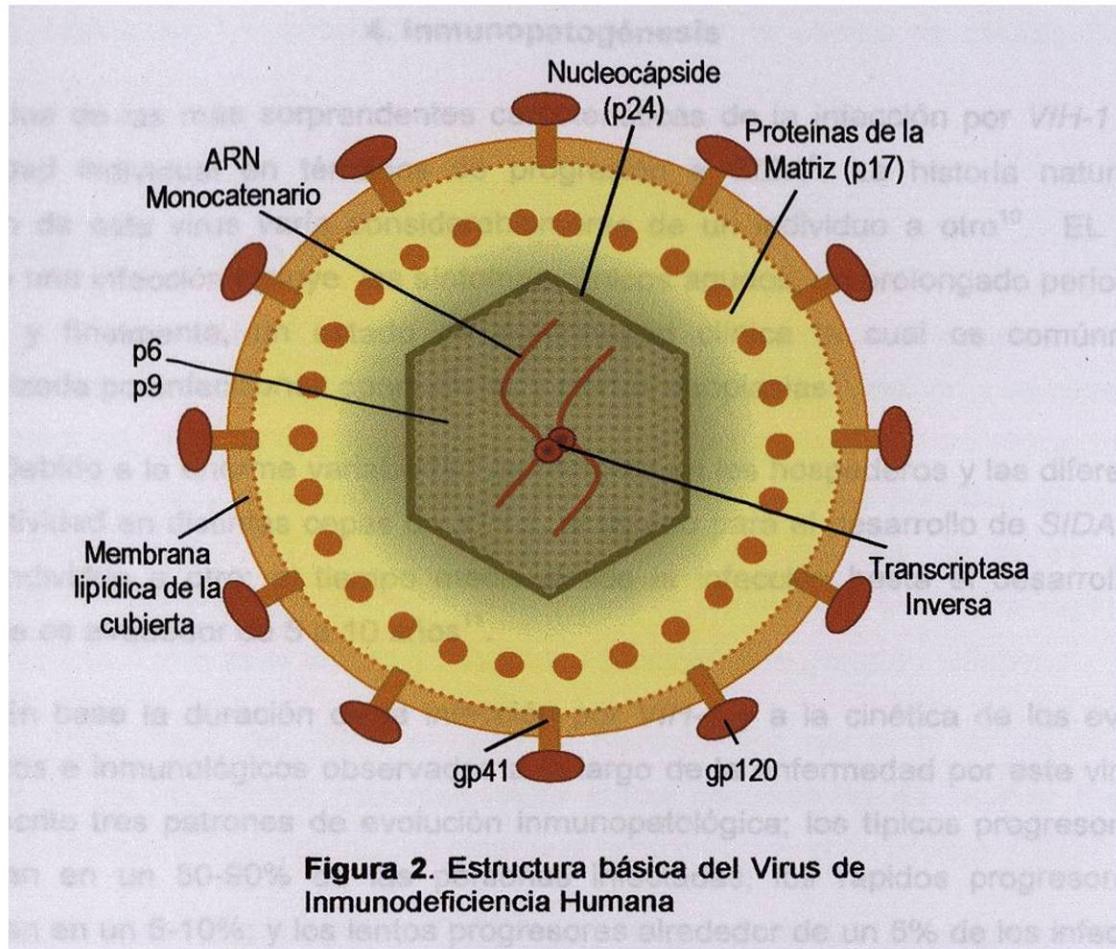
Estructuralmente, la partícula vírica cuyo tamaño oscila entre 80-110 nm incluye dos copias de genoma de *ARN* de aproximadamente 9.5 Kb de largo, monocatenario de polaridad positiva. La organización genómica del *VIH-1* es similar a la de otros retrovirus, incluyendo los genes que codifican para su estructura y proteínas enzimáticas *gag*, *pol* y *env* (Figura 2)¹.

El genoma vírico se encuentra recubierto de una cápside proteica de simetría icosaédrica constituidas por las denominadas proteínas del *core* codificadas por el gen *gag*. El conjunto de ácido nucleico y cápside, nucleocápsida o *core*, se halla a su vez recubierto por una bicapa lipídica de origen celular, sobre la que se hallan las glicoproteínas de envoltura del virus codificadas por el gen *env*. También posee una enzima codificada por el gen *pol* denominada transcriptasa reversa (*RT*) que es característica de los retrovirus y que da nombre a esta familia (Figura 2)⁷.

El genoma del *VIH-1* contiene otros genes (Tabla 2) además de los estructurales antes mencionados, dos genes reguladores, *tat* y *rev*, y genes que codifican para proteínas accesorias y regulatorias, *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *vpx* y *tev*¹.

Tabla 2. Algunos genes encontrados en el genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana y sus funciones más importantes.

| GEN | PROTEÍNA | FUNCIÓN |
|-----|-----------------------|---|
| env | gp160 | Precursor |
| | gp120 | Proteína de la envoltura |
| | gp41 | Interacción con receptores y correceptores y fusión de membranas |
| gag | p55 | Precursor |
| | p24 | Proteína de la nucleocápside |
| | p17 | Proteína de la matriz |
| | p9 | Ribonucleoproteínas asociadas al ARN viral |
| | p6 | |
| pol | Transcriptasa Inversa | Retrotranscripción del genoma viral con actividad RNAasa |
| | Integrasa | Integración del genoma viral retrotranscrito |
| | Proteasa | Prosesamiento de las proteínas virales que forman la estructura del virión. |
| | | |
| tat | Tat | Transactivación |
| rev | Rev | Regulación del transporte y procesamiento del ARN |
| nef | Nef | Retrotranscripción; infectividad |
| vif | Vif | Infectividad viral |
| vpr | Vpr | Transactivador |
| vpu | Vpu | Liberación de viriones |
| tev | Tev | Activador de tat y rev |



3.2 Subtipos del Virus de Inmunodeficiencia Humana

El *SIDA* es causado por dos virus estrechamente relacionados, el *VIH-1* y *VIH-2*. Los análisis epidemiológicos indican que el tipo 1 se ha expandido ampliamente en el mundo, siendo el responsable de la pandemia global mientras que el tipo 2 se encuentra restringido a ciertas regiones de África.

Así mismo, el *VIH-1* exhibe extensas variaciones genéticas y ha sido categorizado en tres grupos; M (*Major*), O (*Outlier*) y N (*New; non-M-non-O*)³², el grupo M ha sido subdividido a su vez en subtipos genéticos nombrándose por letras de la A a la K⁸ las cuales reflejan el orden en que éstos fueron identificados; además, cada subtipo se presenta en distribuciones geográficas particulares de modo que, en México, la prevalencia del subtipo B proveniente del grupo M del VIH-1 ha sido demostrada en diversos estudios epidemiológicos³².

4. Inmunopatogénesis

Una de las más sorprendentes características de la infección por *VIH-1* es la variabilidad individual en términos de progresión a *SIDA*⁹. La historia natural de infección de este virus varía considerablemente de un individuo a otro¹⁰. 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 neoplasias¹¹.

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 años¹¹.

En base 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*⁹.

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⁺ 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.

De especial interés son los pacientes que, en ausencia de terapia antiretroviral logran mantenerse en el período de latencia de la infección durante mas de 10 años sin presentar síntoma alguno del estado de *SIDA*; en estos individuos, la carga viral se

mantiene baja incluso indetectable y por consiguiente, la cuenta de células CD4 se presentan de forma normal.

4.1 Tropicismo 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⁺* (*T cooperadores*), principales efectores de la inmunidad específica^{1, 9}. Una vez que el *VIH-1* penetra en el organismo, inicia una replicación activa e invade numerosos tejidos y órganos, especialmente ganglios linfáticos¹.

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⁺*¹².

La disminución de células *T CD4⁺* en sangre periférica es el primer defecto inmunológico presentado en pacientes con *SIDA*¹³. Estudios recientes dejan claro que los órganos linfáticos son el principal sitio anatómico de infección por *VIH-1*, tanto en etapas tempranas como en 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 nodos linfáticos que en sangre periférica¹³.

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 inmunitaria¹⁵. Las células integrantes de esta categoría se denominan con diversos nombres según su localización en el cuerpo desde donde, 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 nodos linfáticos donde incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras, de adhesión y secretando quimocinas¹⁴.

La captura de antígenos por células dendríticas inmaduras es efectuada de diferentes maneras, pueden tomar partículas y microorganismos mediante fagocitosis²⁹; pueden formar vesículas pinocíticas en las cuales son incluidos fluidos extracelulares y solutos en un proceso llamado macropinocitosis¹⁴ y por último, la expresión de una gran variedad receptores de superficie los cuales median procesos de endocitosis.

Además, se ha reportado la interacción de las Células Dendríticas y Linfocitos B potenciando la expansión de estas últimas y la secreción de inmunoglobulinas²⁷ así como la inducción directa de Células Asesinas Naturales (NK; *Natural Killer*) aumentando su actividad citolítica y la producción de Interferón-gamma (IFN- γ)²⁶.

5.1 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 fenotípicas³⁵. En primer lugar se encuentran las Células Dendríticas CD123⁺ CD11c⁻ de morfología Plasmacitoide (*PDC; Plasmacytoid Dendritic Cells*) las cuales dependen de la IL-3 para su diferenciación a Células Dendríticas maduras^{35, 36}; 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*) (TABLA 3).

También han sido identificados diferentes marcadores antigénicos en la superficie de las células dendríticas los cuales son específicos de cada subpoblación³⁵ 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 3).

Tabla 3. Diferentes Subpoblaciones de Células Dendríticas encontradas en sangre periférica y sus respectivos marcadores de superficie.

| SUBPOBLACIÓN | MARCADOR DE SUPERFICIE | MARCADOR ANTIGÉNICO |
|----------------|--|--|
| Plasmacitoides | CD123 ⁺ CD11c ⁻ | BDCA-2* / BDCA-4 (Neuropilina-1) |
| Mieloides | | |
| Tipo 1 | CD123 ^{ALTA} CD11c ^{BAJA} | BDCA-1 (CD1c) |
| Tipo 2 | CD1c ⁻ CD11c ^{BAJA} CD123 ⁻ | BDCA-3 |

*En referencia No 36.

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*.

6. 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 sexual²³ a través del contacto de superficies mucosas¹⁶; durante la transmisión sexual, el virus tiene que cruzar el epitelio mucoso y eventualmente alcanzar tejidos linfáticos donde establece una infección permanente¹⁷ con una replicación viral extensiva en células T-CD4⁺.¹²

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la transmisión del *VIH* después de la exposición al virus en mucosas aun 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^{12, 18, 19, 31}.

Las Células Dendríticas son células migratorias que viajan desde la médula ósea hasta los tejidos y de ahí, a los órganos linfoides secundarios²⁶; 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^{16, 18, 20}. 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^{12, 17, 18, 20, 21, 22, 24}.

7. Interacción Célula Dendrítica-*VIH-1*: *DC SIGN*

El *DC-SIGN* es expresado solo por células dendríticas¹² 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 periférica²⁰; es una lectina tipo C, calcio dependiente²⁵ 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 media la interacción entre las células dendríticas y el resto de las células *T*, por unión a *ICAM-3* (Moléculas de Adhesión Intercelular-3)²¹.

Si bien es cierto que, tanto las Células Dendríticas de tipo Mieloide (CD11c⁺) como las Células Dendríticas de tipo Plasmacitoide (CD11c⁻) y Células Dendríticas *in viro* derivadas de monocitos expresan *CD4* y *CCR5* y por consiguiente llegan a ser infectadas de forma productiva, a 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 Dendríticas³¹.

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 humana²⁴. *In vitro*, su expresión puede ser inducida en macrófagos derivados de monocitos mediante tratamiento con Interleucina 13 (*IL-13*)^{24, 26}. 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 otros¹⁸; estudios recientes demuestran que además sirve como anclaje de microorganismos como *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* y los parásitos *Leishmania pifanoi* y *Schistosoma mansoni*²⁵.

Las primeras secuencias revelan que la proteína está organizada en cuatro dominios distintos³⁴, un dominio citoplasmático *N-terminal*, un dominio transmembranal hidrofóbico, una región *alfa helicoidal* y un carbohidrato carboxilo terminal como dominio de reconocimiento²⁰.

Además de la alta afinidad por los ligandos celulares endógenos ICAM-2 e ICAM-3²⁵, se ha demostrado que el *DC-SIGN* se une fuertemente a la glicoproteína *gp120* de la envoltura del *VIH-1*^{12, 15}. Cuando el virus es transmitido sexualmente, las células dendríticas *DC-SIGN*⁺ 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^{12, 17, 21,22}.

Diversos estudios han demostrado que viriones unidos al *DC-SIGN* pueden mantener su infectividad por períodos prolongados de tiempo, esto a pesar de las evidencias que el *DC-SIGN* funciona como un receptor de antígenos^{12, 20}.

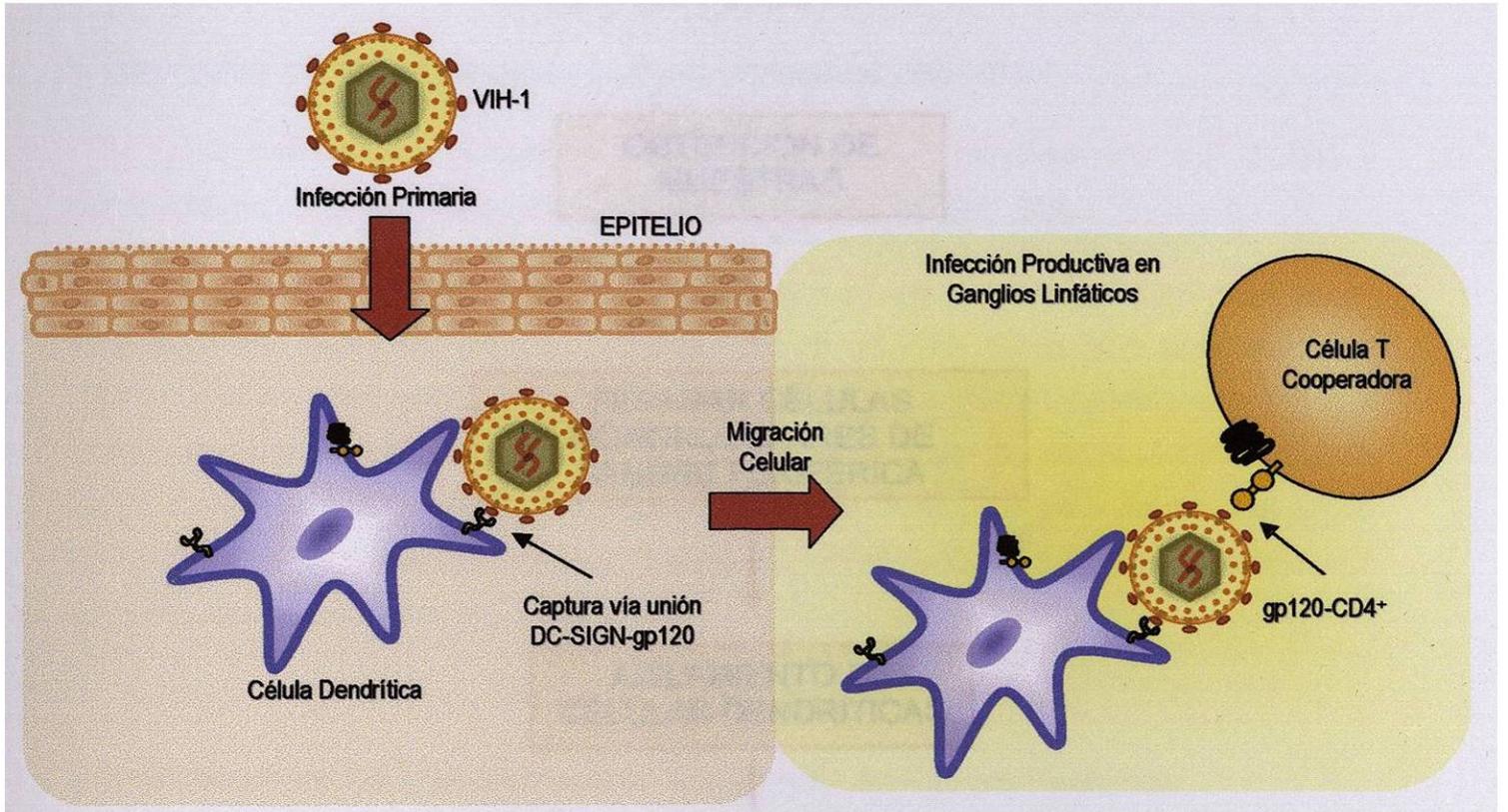


FIGURA 3. Infección productiva por el *VIH-1* a los linfocitos T cooperadores empleando al DC-SIGN de las Células Dendríticas como acarreador.

IX. ESTRATEGIA GENERAL



X. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de Muestras de Individuos Infeccionados con VIH-1

Los individuos infectados con el VIH-1 fueron seropositivos por *ELISA* y confirmados con la técnica de Inmunolectroforesis o *Western Blot*.

Después de que se firmó un consentimiento para la realización del estudio, se colectaron muestras de sangre periférica (20-25 mL) en tubos con anticoagulante (*EDTA*) y se les pidió a los participantes que respondieran un corto cuestionario, el cual incluía preguntas acerca de su edad, sexo, lugar de nacimiento, residencia y finalmente se les cuestionó sobre cualquier comportamiento de sospecha para contraer el *SIDA*. Se recopiló los datos clínicos, las cuentas de linfocitos *CD4⁺* así como la carga viral de cada uno de los pacientes.

2. Separación de Células Mononucleares a partir de Sangre Periférica

La sangre diluida 1:1 con solución salina (0.85%) se depositó suavemente sobre 6-8 mL de *Ficoll-Paque Plus* (*Amersham Biosciences*) para formar un gradiente de densidad. Posteriormente, siguiendo el protocolo del fabricante, se centrifugó a 1, 200 rpm durante 30 min a temperatura ambiente (*Centrífuga Beckman GRP*), al final de este procedimiento se formó un anillo de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) en la interfase, el cual se aisló con la ayuda de una micropipeta estéril desechable. Las CMSP se lavaron utilizando NaCl al 0.85% a 1, 200 rpm por 10 min a temperatura ambiente y fueron resuspendidas en 300 µL de solución de fosfatos enriquecida al 5% con suero fetal bovino (PBS 1x - BCS/BSA 5%).

3. Aislamiento de Células Dendríticas a partir de Mononucleares

Para el procedimiento de separación de Células Dendríticas se empleó el método de separación magnética *Blood Dendritic Cell Isolation Kit II Human; Macs Miltenyi Biotec* (Cat. No. 130-091-379); siguiendo las instrucciones que indica la compañía.

3.1 Marcaje y Depleción Magnética de Células No Dendríticas

El primer paso fue el bloqueo de los receptores *Fc* empleando 100 μ L del Reactivo de Bloqueo (*FcR Blocking Reagent; MACS, Miltenyi Biotec*) mas 100 μ L del Reactivo para la Eliminación de Células No Dendríticas (*Non-DC Depletion Cocktail; MACS, Miltenyi Biotec*) con el fin de marcar magnéticamente los monocitos (CD14⁺) y las células B (CD19⁺) presentes, además del reconocimiento con un anticuerpo conjugado con biotina dirigido contra Células Dendríticas Mieloides tipo 1 (MDC1) CD1c (BDCA-1)⁺.

Después de incubar durante 15 min a 4° C, se lavó la muestra empleando solución amortiguadora enriquecida al 5% con suero fetal bovino y se hicieron pasar a través de la columna LD (*LD Column; MACS, Miltenyi Biotec*) situada en el campo magnético con el adaptador *MidiMacs* (*MACS; Miltenyi, Biotec*) sobre el soporte de separación (*MultiStand MACS, Miltenyi Biotec*). El efluente de la columna, el cual contenía la fracción de células dendríticas pre-enriquecidas, fue colectado en su totalidad y lavado con la solución de fosfatos.

3.2 Marcaje Magnético y Selección de Células Dendríticas

La segunda etapa del proceso de separación se inicio añadiendo a la muestra colectada 100 μ L de la solución de enriquecimiento de células dendríticas (*DC Enrichment Cocktail; MACS, Miltenyi Biotec*) la cual contenía anticuerpos conjugados con microperlas (*Ab-Microbeads^{MR} MACS, Miltenyi Biotec*) para marcar magnéticamente las células dendríticas mieloides tipo 2 BDCA-3⁺ (MDC2) y las células dendríticas plasmacitoides BDCA-4⁺ además de marcar las células mieloides tipo 1 BDCA1⁺ (MDC1) previamente biotinizadas.

Se adaptó la columna tipo *MS* (*MS Column; MACS, Miltenyi Biotec*) sobre el magneto *MiniMacs* (*MACS, Miltenyi Biotec*) en el soporte y, después de incubar 15 min a 4° C se filtró el concentrado celular; el efluente de la columna, que en esta ocasión llevaba las células no marcadas fue colectado en su totalidad dentro de un tubo para micro centrifuga, al terminar de drenar todo el contenido la columna fue retirada del campo magnético y se le aplico presión al interior del contenedor empleando el émbolo incluido con la columna para liberar las tres poblaciones de células dendríticas atrapadas con las microperlas magnéticas. El total colectado fue centrifugado a 1, 500 rpm durante 10 min y se elimino todo el sobrenadante.

4. Extracción de ARN a partir de Células Dendríticas

La extracción del ARN se realizó de acuerdo al método *TRizol* (*TRizol* Reagents Invitrogen U.S.A.*).

A las células dendríticas o CMSP obtenidas se les resuspendió en 1 mL de *TRizol* (*TRizol Reagents Invitrogen*), seguido de una vigorosa homogenización. Después de incubarlos durante 5 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 10 min a 4° C.

Posteriormente, se agregaron 200 μ L de cloroformo agitándose suavemente por inversión; en seguida se llevó a centrifugar a 12, 000 rpm por 10 min a 4° C para formar un gradiente de densidad de los componentes celulares y extraer el ARN en una fase acuosa (fase superior del gradiente).

El ARN se precipitó centrifugando a 14, 000 rpm con 500 μ L de isopropanol a 4° C durante 10 min y fue lavado con 500 μ L etanol al 75% realizando el mismo proceso de centrifugación. Finalmente la pastilla de ARN obtenida al fondo del tubo para microcentrífuga fue resuspendida en 20 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y fue almacenada a -70° C durante todo el tiempo que fue necesario hasta su próxima manipulación.

5. Cuantificación y Calidad del ARN Obtenido

Para medir la concentración del ARN obtenido y evaluar la proporción de pureza que presenta, se prepararon 500 μ L de una dilución 1:100 de cada muestra utilizando agua tratada con dietilpirocarbonato (*DEPC*) y se empleó el espectrofotómetro *GeneQuant Pro RNA/DNA Calculator* (*Amersham Pharmacia Biotech*) en el cual se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 260 y 280 nm para obtener la concentración en μ g/ μ L del material genético y la razón 260nm/280nm para estimar el grado de pureza en relación a las proteínas presentes.

Para calcular la concentración de ARN se aplicó la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{L}] = (A_{260} \times 0.040 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times B)$$

Donde: A_{260} = Absorbancia dada por el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

B = Factor de dilución.

6. Síntesis del ADN Complementario:

Para la síntesis de ADN de cadena sencilla se empleó la enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Moloney Murine Leukemia Virus)* (Invitrogen, U.S.A.) y Oligo dT (*Oligo dT Primer, Invitrogen*).

Las reacciones de transcriptasa en reversa fueron ajustadas a [5 µg] de ARN total; se mezclaron con 1 µL *dNTP's mix* 10 mM (*Amersham Biosciences*) más 1 µL de Oligo dT (*Oligo dT Primer, Invitrogen*) y se completó el volumen a 12 µL con *H₂O Milli-Q* estéril. A continuación, la mezcla fue llevada a 65° C durante 5 min para después ser enfriada rápidamente en hielo.

La segunda etapa de la reacción continúa añadiendo 4 µL de la solución de reacción al 5x (*5x First Strand Buffer, Invitrogen*) y 2 µL de DTT 0.1 M y posteriormente permaneció a 42° C durante 2 min.

Finalmente, fueron añadidos 0.5 µL de la enzima RT (*SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen*) y la reacción fue completada a 20 µL de volumen final con *H₂O Milli-Q* estéril. Se incubó durante 50 min a 42 ° C seguida de un período de 15 min a 70° C para inactivar la reacción. Para conservar el ADNc obtenido, este se almacena a 4° C.

7. Detección de la Expresión del DC-SIGN mediante PCR convencional

La expresión del DC-SING fue detectada amplificando el gen que codifica para tal receptor mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR, Polymerase Chain Reaction*) de tipo convencional.

Siguiendo las instrucciones para la reacción con la enzima *Taq* DNA polimerasa recombinante (*Taq DNA Polymerase, Recombinant, Invitrogen*) se mezclaron 5 μ L de la solución de reacción al 5x sin Mg^{+2} (*10x PCR Buffer minus Mg^{+2} , Invitrogen*), 1.5 μ L de $MgCl_2$ al 50mM y 0.25 μ L de *Taq* DNA polimerasa 50 U/ μ L (*Invitrogen*) mas 1 μ L de *dNTP's mix* al 10mM (*Amersham Biosciences*), 1 μ L del Oligo 5' (*Forward Primer*) y 1 μ L del Oligo 3' (*Reverse Primer*); finalmente se adicionaron 2 μ L del ADNc templado y la reacción fue completada a un volumen final de 25 μ L con H_2O *Milli-Q* estéril.

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador (*MJ Research PTC-200*) y el programa de amplificación inicia con la desnaturalización a 94° C durante 3 min seguida de 35 ciclos consecutivos de 94° C durante 45 seg, 65° C por 30 seg y 72° C durante 1 min y 30 seg; para concluir, se elevó a 72° C durante 10 min para una extensión final de las hebras.

Las condiciones fueron establecidas para reacciones únicas y para múltiples reacciones fue necesario preparar *mastermix* de reactivos. Los oligos empleados para flanquear un fragmento del gen que codifica el receptor DC-SIGN fueron *MIOS-DC-SIGN 5'* y *MIOS-DC-SIGN 3'* (Ordaz Sánchez, 2005) y para validar se amplificó el gen constitutivo Gliceraldehido 3 Fosfato Deshidrogenasa (*Human GAPDH Primer, Invitrogen*).

El análisis de los productos de amplificación de la reacción de *PCR* se realizó mediante electroforesis en gel de Agarosa al 1% empleando jugo azul para la precipitación de las muestras y marcador de peso molecular de 1 kb (*1kb Ladder, Invitrogen*) para comparar. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo por tinción con bromuro de etidio (1 mg/mL).

8. Cuantificación del ADNc Sintetizado

Para medir la concentración del ADNc producido se prepararon 500 μ L de una dilución 1:100 de cada muestra utilizando agua *Milli-Q* estéril y nuevamente se empleó el espectrofotómetro *GeneQuant Pro RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech)* para medir las absorbancias a longitudes de onda de 260 y 280 nm con el fin de obtener la concentración en ng/ μ L del material genético sintetizado.

9. Cuantificación de la Expresión del *DC-SIGN*

La cuantificación del receptor *DC-SIGN* se logró empleando la tecnología de *PCR* Cuantitativa o de Tiempo Real aplicando el esquema de Cuantificación Relativa ($\Delta\Delta C_t$) para lo cual, *GAPDH* fue establecido como control endógeno y donadores no infectados como calibradores de comparación.

Se diseñó el ensayo con sondas *TaqMan*[®] (*TaqMan*[®] *Gene Expression Assay*; *Applied Biosystems*) dentro de la región que codifica para el receptor *DC-SIGN* empleando el programa computacional *Primer Express 2.0*[®] (*Applied Biosystems*) para determinar la temperatura adecuada para el alineamiento (*T_m*, *Melting Temperature*) del par de oligonucleótidos en conjunto con la sonda. Para el control endógeno, se eligió un ensayo del gen constitutivo *GAPDH* (*Human GAPDH 20x*; *Pre-Developed TaqMan*[®] *Assay Reagents*; *Applied Biosystems*).

Todas las reacciones fueron ajustadas a [700 ng] de ADNc y para los controles negativos se empleo agua inyectable comercial. Se mezclaron 10 μ L de la solución de reacción (*TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix*, *Applied Biosystems/Roche*) la cual contiene todos los componentes necesarios para la amplificación mas 1 μ L del ensayo *TaqMan*[®] *DC-SIGN* o *TaqMan*[®] *GAPDH* (Gliceraldehído-3-Fosfato-Deshidrogenasa) según fuera el caso; la reacción fue completada a 20 μ L añadiendo agua inyectable. Las condiciones anteriores fueron establecidas para reacciones individuales y para varias reacciones en una misma corrida fue necesario preparar *mastermix* de reactivos.

La reacción fue realizada empleando el termociclador de tiempo real *7500 Real Time PCR Systems* (*Applied Biosystems*) y el programa de corrida, preestablecido para los ensayos de 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.

XI. ESQUEMAS DE PROCEDIMIENTOS

1. Obtención de Células Dendríticas a partir de CMSP

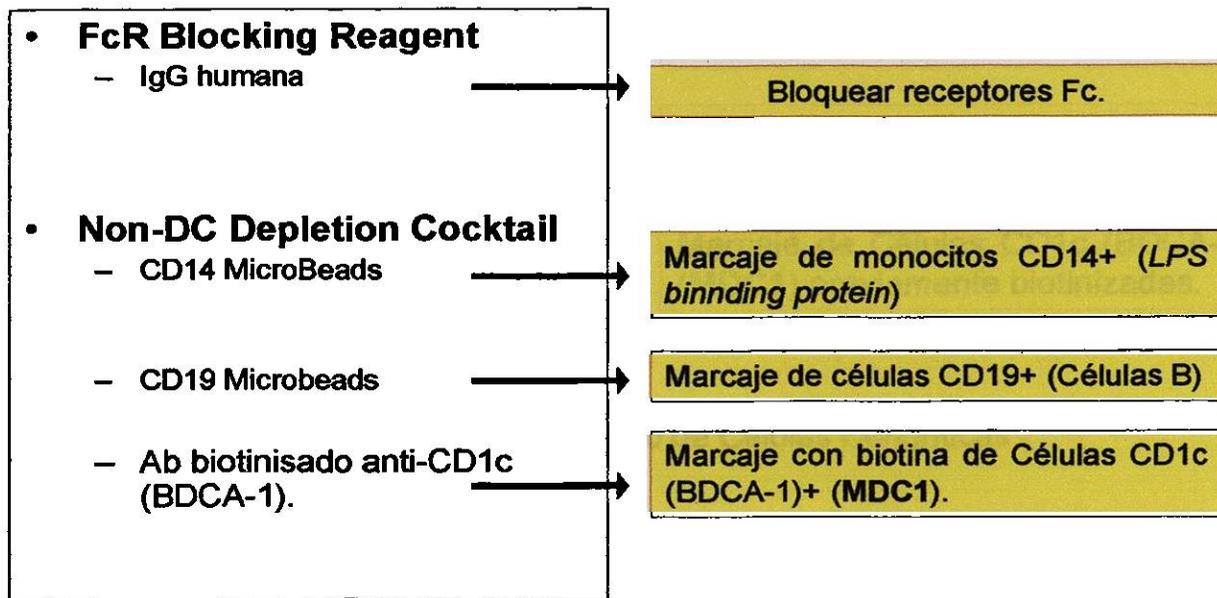


Figura 4. Marcaje Magnético de Células No-Dendríticas

• Separación Magnética con la columna **LD** en el Magneto **MidiMacs**.

Los Monocitos y las Células B marcados son retenidos en la columna.



Figura 5. Separación Magnética: Depleción de Células No-Dendríticas

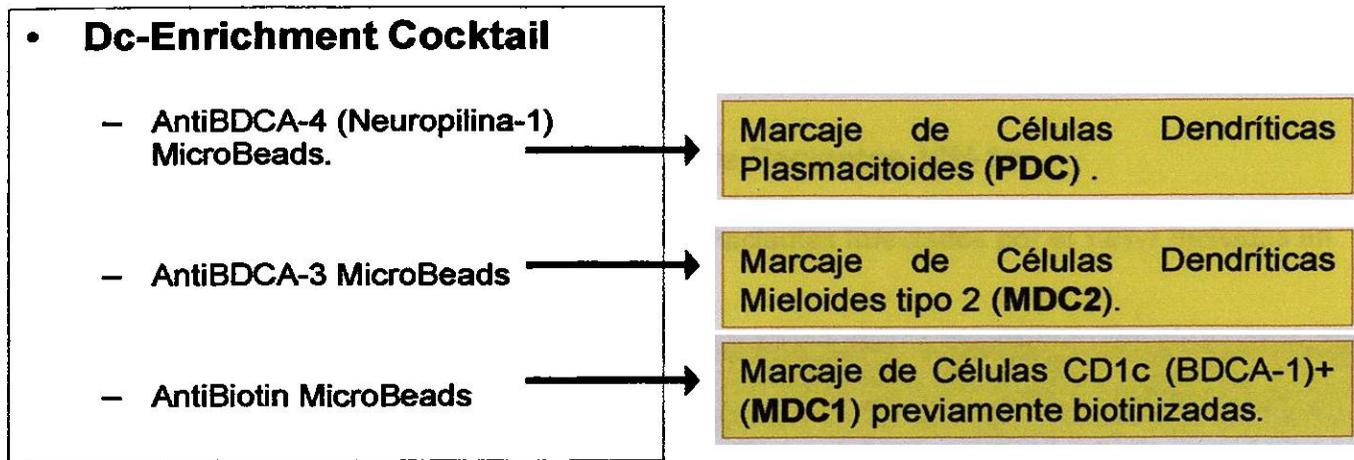


Figura 6. Marcaje Magnético de Células Dendríticas

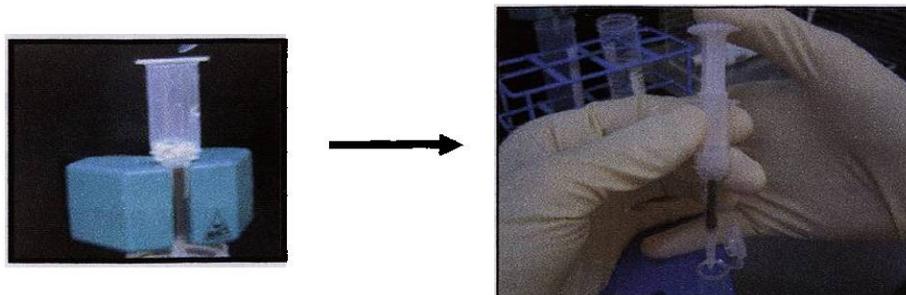


Figura 7. Separación Magnética: Recuperación de Células Dendríticas

XII. RESULTADOS

1. Obtención y Clasificación de Muestras de Pacientes VIH-1+

Tabla 4. Historial Clínico y Epidemiológico de los Pacientes Infeccionados por el VIH-1 Incluidos en el Estudio.

| Clave Id | Procedencia | Fecha Toma | Edad | Año Diagnóstico | Edad al Diagnosticar | Tipo de Transmisión | Carga Viral | Cuenta CD4+ | Tiempo de Infección |
|----------|-------------|------------|------|-----------------|----------------------|---------------------|-------------|-------------|---------------------|
| P-01 | Jalisco | 23-Feb-06 | 43 | 2002 | 39 | heterosexual | 13000 | 56 | 4 |
| P-02 | Jalisco | 23-Feb-06 | 29 | 2004 | 27 | heterosexual | 81 | 464 | 2 |
| P-03 | Jalisco | 23-Feb-06 | 37 | 2004 | 35 | heterosexual | <50 | 350 | 2 |
| P-04 | Jalisco | 23-Feb-06 | 35 | 2001 | 30 | heterosexual | 2500 | 514 | 5 |
| P-05 | Jalisco | 23-Feb-06 | 26 | 2004 | 24 | heterosexual | 3800 | 230 | 2 |
| P-06 | Jalisco | 23-Feb-06 | 31 | 2003 | 28 | bisexual | 35000 | 415 | 3 |
| P-07 | Jalisco | 23-Feb-06 | 31 | 2003 | 28 | bisexual | 245000 | 315 | 3 |
| P-08 | Jalisco | 23-Feb-06 | 54 | 2002 | 50 | heterosexual | 18000 | 375 | 4 |
| P-09 | Jalisco | 23-Feb-06 | 55 | 2000 | 49 | heterosexual | 1200 | 275 | 6 |
| P-10 | Jalisco | 19-Ene-06 | 40 | 1999 | 30 | homosexual | 186500 | 97 | 10 |
| P-11 | Jalisco | 19-Ene-06 | 33 | 1999 | 26 | homosexual | <50 | 342 | 7 |



Típicos Progresores



Rápidos Progresores

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 desnaturizantes de agarosa observándose las bandas correspondientes al ARNr de 18s, 16s y 5s, en todas las muestras además de la zona de ARNm (Figura 8).

P-01 D-25



Figura 8. Se verificó la calidad de todas las muestras de *ARN* a través de geles desnaturizantes de agarosa, observándose las tres subunidades del *ARN* ribosomal. Paciente 1 (P-01), Donador 1 (D-01).

Se prepararon diluciones 1:100 de cada muestra de *ARN* obtenida de pacientes *VIH+* y se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm para determinar la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla 5).

Tabla 5. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro del *ARN*.

| Clave Id | Abs 260nm | Abs 280nm | Concentración de <i>ARN</i> [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] | Ratio 260/280 |
|----------|-----------|-----------|---|---------------|
| P-01 | 0.114A | 0.082A | 0.5 | 1.390 |
| P-02 | 0.099A | 0.078A | 0.4 | 1.269 |
| P-03 | 0.210A | 0.167A | 0.8 | 1.257 |
| P-04 | 0.134A | 0.111A | 0.5 | 1.207 |
| P-05 | 0.277A | 0.228A | 1.1 | 1.215 |
| P-06 | 0.076A | 0.066A | 0.3 | 1.152 |
| P-07 | 0.207A | 0.179A | 0.8 | 1.156 |
| P-08 | 0.449A | 0.390A | 1.8 | 1.151 |
| P-09 | 0.109A | 0.065A | 0.4 | 1.677 |
| P-10 | 0.949A | 0.646A | 3.8 | 1.469 |
| P-11 | 0.400A | 0.290A | 1.6 | 1.379 |

Dilución 1:100 de cada muestra de *ARN*. En azul los pacientes rápidos progresores.

3. 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración del *ADNc* sintetizado.

| Clave Id | Abs 260nm | Abs 280nm | Concentración de <i>ADNc</i> [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] |
|----------|-----------|-----------|--|
| P-01 | 0.306A | 0.205A | 1.5 |
| P-02 | 0.323A | 0.215A | 1.6 |
| P-03 | 0.335A | 0.219A | 1.7 |
| P-04 | 0.315A | 0.202A | 1.6 |
| P-05 | 0.282A | 0.187A | 1.4 |
| P-06 | 0.322A | 0.210A | 1.6 |
| P-07 | 0.317A | 0.211A | 1.6 |
| P-08 | 0.335A | 0.214A | 1.7 |
| P-09 | 0.392A | 0.241A | 2.0 |
| P-10 | 0.436A | 0.284A | 2.2 |
| P-11 | 0.076A | 0.077A | 0.4 |

Dilución 1:100. En azul los pacientes rápidos progresores

4. Detección de la Expresión mediante PCR convencional

Empleando el *ADNc* sintetizado se montaron reacciones de *PCR* Convencional para amplificar un fragmento del gen que codifica para el receptor *DC-SIGN* empleando los oligonucleótidos *MIOS DC-SIGN5'* y *MIOS DC-SIGN3'* (Ordáz Sánchez; Dic. 2005) así como para el gen constitutivo *GAPDH*; todas las reacciones fueron preparadas dentro de una campana de flujo exclusiva para *PCR* y bajo minuciosas condiciones de esterilidad.

Se logró amplificar el control endógeno *GAPDH* solo de los pacientes infectados 04, 05, 07, así como del donador no infectado D-25 (Figura 9) mientras que no fue posible demostrar la detección del receptor *DC-SIGN*.

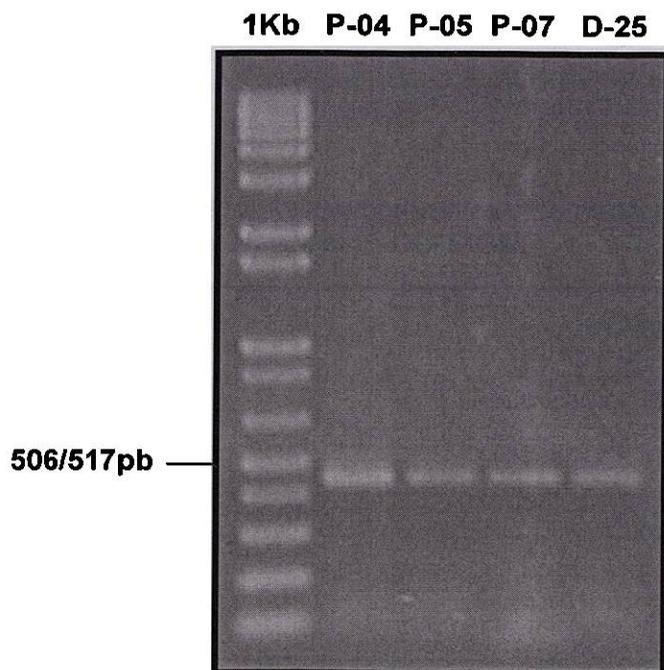


Figura 9. Amplificación de *GAPDH* mediante *PCR* Convencional. Agarosa al 1%

5. Cuantificación de la Expresión del Receptor *DC-SIGN* mediante *PCR* Cuantitativo en Tiempo Real

5.1 Diseño del Ensayo con Sondas *TaqMan*[®]

A partir de la secuencia nucleotídica de *ARNm* del *DC-SIGN* (*mRNA*; *CD-209 Homo sapiens*, *NCBI GeneBank* NM 021155) se diseñaron el par de oligonucleótidos y la Sonda *TaqMan* marcada con *FAM*[™] empleando el programa *Primer Express 2.0* de *Applied Biosystems*.

Con el análisis previo de identidades empleando el programa *NCBI BLAST* (*National Center for Biotechnology Information; E.U.A.*) fue posible discriminar dos regiones de alta homología con el receptor *L-SIGN* (Tabla 8).

Las características del Ensayo se muestran en la tabla 7.

TABLA 7. Características de cada uno de los componentes del Ensayo *TaqMan*[®] para el receptor DC-SIGN.

| | | | |
|--|----------|----------------------|-------------|
| Oligo 5' (Forward) | | | |
| Secuencia: <u>gtccctcagtagagcaagtt</u> | | | |
| Tm: | %G-C: | Sitio: 3 689 - 3 708 | Tamaño: 20b |
| Oligo 3' (Reverse) | | | |
| Secuencia: <u>ttcgtttctccttcttcaggac</u> | | | |
| Tm: | %G-C: | Sitio: 3 724 – 3 745 | Tamaño: 22b |
| Sonda <i>TaqMan</i>[®] | | | |
| Secuencia: <u>cctgctggcgtttct</u> | | | |
| Tm: 73.5° | %G-C: 60 | Sitio: 3 709 – 3 723 | Tamaño: 15b |

Tabla 8. Secuencia nucleotídica del receptor de Células Dendríticas DC-SIGN.

tggggtgacatgagtgactccaaggaaccaagactgcagcagctgggctcctggaggaggaacagctgagaggccttgga
 tccgacagactcgaggatacaagagcttagcaggggtgcttggccatgggccctgggtgctgcaactcctccttcacg
 ctcttggctgggctccttgtccaagtgtccaaggtcccagctccataagtcaggaacaatccaggcaagacgcatctac
 cagaacctgaccagcttaagctgcagtgggtgagctctcagagaaatccaagctgcaggagatctaccaggagctgacc
 cagctgaaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagctgcaggagatctaccaggagctgaccggctgaaggct
 gcagtgggtgagcttccagagaaatctaagctgcaggagatctaccaggagctgacctggctgaaggctgcagtgggtgag
 cttccagagaaatctaagatgcaggagatctaccaggagctgactcggctgaaggctgcagtgggtgagcttccagagaa
 tctaagcagcaggagatctaccaggagctgaccggctgaaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcagcag
 gagatctaccaggagctgaccggctgaaggctgcagtgggtgagcttccagagaaatctaagcagcaggagatctaccag
 gagctgaccagctgaaggctgcagtgggaacgcctgtgccaccctgtccctgggaatggacattcttccaaggaaactgt
 tacttcatgtctaactccagcggaaactggcagactccatcaccgctgcaagaagtgggggcccagctcgtcgtaatc
 aaaagtgtgaggagcagaacttctacagctgcagtcttccagaagtaaccgcttcacctggatgggacttccagatcta
 aatcaggaaggcacgtggcaatgggtggacggctcactctgttggccagcttcaagcagatttggaaacagaggagagccc
 aacaacgttggggaggaagactgcgcggaattagtggaatggctggaacgacgacaaaatgtaatcttgccaaattctgg
 atctgcaaaaagtccgcagcctcctgctccagggatgaagaacagtttcttctccagcccctgccaccccaaacccccct
 cctgcgtagcagaacttcccccttttaagctacagttccttctctccatccttcgaccttcacaaaatctctgggactg
 ttctttgtcagattcttctccttttagaaggctgggtcccattctgtccttcttgtcatgcttccaaatttcccctgggtga
 gagcttgttttctggcccactccttggagctttatgagtgagctgggtgtgggatgccttgggggtggacttgtgttccaa
 gaatccactctctcttcttggagattaggatatttgggttggcatgtgtagctgctatgtcccctggggcgttatctc
 atacatgcaaacctaccatctgttcaacttccaactaccactcctgcacccttggatcggggacttactgggtgcaaga
 gctcattttgcaggctggaagcaccagggaatctaattccccagcttaccaaatggcaccagagagggcaaggaggctcca
 cgcaacccttccaccaccacatcttcttcttatacatggcttccatttggctgttcttaagtgtattcttatttattt
 tattattattactattttctgagatggagttcactcttctgctcagctcaggctggagtggcctggcagatcttggctca
 ctgcaacctctgcctcccgggttcaagtatttctcctgcctcagcctcagcagtagctggaattacaggcaggcgcacca
 ggcccggctaatTTTTTgtatttttagtacagacgggttctcctgcttgggtcaggctggtcttgaactccgacctcag
 atgatctgcccgcctcggcctcccaaaatgctgggattacagggtgtgagccaccgcgctggcctattatttttTgtaag
 aataaaacaggttactgggatttgggactctgaacagttctgtctctactacctgatctcctcctaccacgacttggga
 tctagaggagcttggctcggctgtgacggctcggccgttctcactgcggctgcaccggcccccgctgcggctcactatt
 tcttctctgcttgggtgaattgtgcctctcctggctcttTgacatgtgctagtgagatttcttcttcttcttctcggatc
 cccatttcttTgtaggaatgggtctggactagggttctccttccccgcagcctgtagtatcctcgtgggtggccatcctc
 tctctccccttggagctcttTgcaaaaggaggagacaagcagaggtctctattggatttctcaacacctgaagaaagtTgca
 gtgttttctcttggacattgtTgtatttcaataaaaccacaaatcatcatttccaccgagccactgggcagaattcaca
 ctgaagctgtcgtcctgcgtacataccatcgtccgttaaacagagaaagagctgctTggcattcttcttccgactggTact
 gaacataataactTgcccctcaggtgaggttccaagttgcaactgacctgaaactgaatcactctccccacgttattttt
 aattactatttttttaagatggggcttTgctctgctgcagggctggagtgcagtggcgcgatctaggctcactgcaac
 ttccgcctcccgggttcaagcgattctcctgctcagcctcccagtagctgggactctactaaaagtacaaaatttagct
 ggcgTgaccaccgcgcccagctaatctTgtattttTgtagagacgggttTcaacatgtTgaccaggatggTctcagat
 ctctTgacctcgtgattcgcgcgcgctcctccaaagtgtgggattacaggcctgagccaccgcgcccagctctctccc
 cacgttctTgaaactcgggcagcacatcctcacagaaatctaggaactgtTggtaggttcttctcctcgtgtactccaggct
 TgcttccggagtcatagtcatcctcctgcactgctccttTcaaacactgTaaacatgcttTtaataagaagggtaggact
 ggatgtTgggaaatcatgtgaacatctatctccaaatctgcaagctcctgTttactgtagaagggacaattaactccatc
 ctctccatgactctgaaatccaaggggggttccgggttTgccatgtggcgcatttTcaactcatttTcagcctgat
 ccagcatctTtgacagcttccggTTTTgttctTctgctgttctgTtctcctcctcctcctctctcttctctctgctgtt
 ctcccatgttctTtaacttTcgtctTgttctTgccgttTctagccactcttctcttctcttcttcttcttcttctgaatt
 ctctTgtccttctgctctctcagcaaccactcctcagTaatcttTgctctctcttccccatagcttTctagttgtt
 gTTTTcaataaaagtgtcctcctcttTctgtgagagctcctgagTccctcagTggagcaagTtctcgtggcgttcttTt
 gTtctccttctcagggggccctgtacttTtTgtggcttggTtctctTggaatgtcacttTtccgggcgcagccatct
 TgcccgcaccgccccgcccctcagttgtatectTtataataaaatggTaaacattgtTaaaccgagattcagccaatctg
 gTtcaactTtTgtTaaataaaatggcgagttgtTtTtTcagttgtcgtggacccccaggtTgcaagttacataccctgggcat
 gtccagatgaacgaagcgtgcaaatccacgtggaacctaaTgctcagactgaggaacagggactgagTtaagaagtggac
 accacgtggcatgatcctTgatccaatcagattgagccctggcgtgatccagtcagatcaagcctcctgaaTccccctcatt
 acaagatccaatcataTcatgctcactaccctctgtatataaaatctgcccagcctccaactTggagagacagattTgg
 gccagactcctgtgctcctTgcttggctgctTgcaataaattTtctctctaca

*En amarillo se muestra la homología con el receptor L-SIGN (DC-SIGNR); en negro el par de oligonucleótidos y el color verde indica la zonda de la Sonda TaqMan® marcada con FAM.

5.2 Cuantificación de la expresión de *GAPDH* y *DC-SIGN* mediante PCR Cuantitativo en Tiempo Real.

A partir del *ADNc* de cada muestra de pacientes *VIH+*, así como de donadores sin infección fue cuantificada la expresión mediante *PCR* en Tiempo Real utilizando el ensayo *TaqMan*[®] para *DC-SIGN* previamente diseñado y bajo las condiciones descritas previamente; la detección de fluorescencia emitida por los reporteros (*FAM* para el caso de *DC-SIGN* y *VIC* para *GAPDH*) fue detectada durante la fase de anillamiento y extensión. La manipulación de las muestras fue llevada a cabo dentro de una campana de uso exclusivo para *PCR* procurando disminuir los riesgos de contaminación.

5.2.1 Detección de Fluorescencia emitida.

Tabla 9. Niveles de la intensidad de fluorescencia registrada al punto de corte (*Ct*) en el *PCR* en Tiempo Real del *DC-SIGN* y el gen constitutivo *GAPDH*.

| PACIENTE | DC-SIGN | | GAPDH | |
|----------|---------------------|----------|----------------------|----------|
| | Threshold 0.5360005 | | Threshold 0.09725252 | |
| | Ct Rep 1 | Ct Rep 2 | Ct Rep 1 | Ct Rep 2 |
| P-01 | 34.525 | 34.923 | 27.530 | 27.472 |
| P-02 | 34.816 | 34.726 | 30.439 | 30.251 |
| P-03 | 36.287 | 36.216 | 28.289 | 28.298 |
| P-04 | 38.000 | 37.428 | 28.415 | 28.458 |
| P-05 | 36.196 | 35.788 | 32.397 | 32.343 |
| P-06 | 36.542 | 36.526 | 32.353 | 32.351 |
| P-07 | 34.633 | 34.517 | 30.606 | 30.757 |
| P-08 | 35.096 | 35.092 | 31.158 | 31.123 |
| P-09 | 36.171 | 36.238 | 32.283 | 32.190 |
| P-10 | 35.569 | 35.302 | 31.332 | 31.269 |
| P-11 | 35.427 | 35.155 | 29.239 | 29.460 |
| D-25 | 34.380 | 34.498 | 31.149 | 31.095 |
| D-61 | 30.452 | 30.439 | 27.234 | 27.842 |

En letra azul los pacientes considerados rápidos progresores, en negro los típicos progresores y el rojo identifica a los donadores sin infección.

5.2.2 Cuantificación de la Expresión del DC-SIGN mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (Tabla 10)

| Pacientes | GAPDH | DC-SIGN | ΔCt | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Promedio ddCt | SD |
|-------------------|--------|---------|-------------|-------------------|------------------------|---------------|------------|
| D-25 | | | | | | | |
| Replica #1 | 31.149 | 34.38 | 3.231 | 0 | 1 | 1 | - |
| Replica #2 | 31.095 | 34.498 | 3.403 | 0 | 1 | | |
| P-61 | | | | | | | |
| Replica #1 | 27.234 | 30.452 | 3.218 | 0 | 1 | 1 | - |
| Replica #2 | 27.842 | 30.439 | 2.597 | 0 | 1 | | |
| P-01 | | | | | | | |
| Replica #1 | 27.530 | 34.525 | 6.995 | 3.678 | 0.07812889 | 0.067542612 | 0.01497126 |
| Replica #2 | 27.472 | 34.923 | 7.451 | 4.134 | 0.05695633 | | |
| P-02 | | | | | | | |
| Replica #1 | 30.439 | 34.816 | 4.377 | 1.06 | 0.47963206 | 0.463882705 | 0.02227295 |
| Replica #2 | 30.251 | 34.726 | 4.475 | 1.158 | 0.44813335 | | |
| P-03 | | | | | | | |
| Replica #1 | 28.289 | 36.287 | 7.998 | 4.681 | 0.0389833 | 0.040094675 | 0.00157172 |
| Replica #2 | 28.298 | 36.216 | 7.918 | 4.601 | 0.04120605 | | |
| P-04 | | | | | | | |
| Replica #1 | 28.415 | 38.000 | 9.585 | 6.268 | 0.01297609 | 0.016424867 | 0.0048773 |
| Replica #2 | 28.458 | 37.428 | 8.97 | 5.653 | 0.01987364 | | |
| P-05 | | | | | | | |
| Replica #1 | 32.397 | 36.196 | 3.799 | 0.482 | 0.71598437 | 0.815541769 | 0.14079542 |
| Replica #2 | 32.343 | 35.788 | 3.445 | 0.128 | 0.91509917 | | |
| P-06 | | | | | | | |
| Replica #1 | 32.353 | 36.542 | 4.189 | 0.872 | 0.54638887 | 0.54905287 | 0.00376747 |
| Replica #2 | 32.351 | 36.526 | 4.175 | 0.858 | 0.55171687 | | |
| P-07 | | | | | | | |
| Replica #1 | 30.606 | 34.633 | 4.027 | 0.71 | 0.61132014 | 0.673461756 | 0.08788152 |
| Replica #2 | 30.757 | 34.517 | 3.76 | 0.443 | 0.73560337 | | |
| P-08 | | | | | | | |
| Replica #1 | 31.158 | 35.096 | 3.938 | 0.621 | 0.65022007 | 0.64330877 | 0.00977406 |
| Replica #2 | 31.123 | 35.092 | 3.969 | 0.652 | 0.63639747 | | |
| P-09 | | | | | | | |
| Replica #1 | 32.283 | 36.171 | 3.888 | 0.571 | 0.67315003 | 0.637818096 | 0.04996691 |
| Replica #2 | 32.190 | 36.238 | 4.048 | 0.731 | 0.60248616 | | |
| P-10 | | | | | | | |
| Replica #1 | 31.332 | 35.569 | 4.237 | 0.92 | 0.52850902 | 0.568646015 | 0.05676228 |
| Replica #2 | 31.269 | 35.302 | 4.033 | 0.716 | 0.60878301 | | |
| P-11 | | | | | | | |
| Replica #1 | 29.239 | 35.427 | 6.188 | 2.871 | 0.13669193 | 0.164533917 | 0.03937451 |
| Replica #2 | 29.460 | 35.155 | 5.695 | 2.378 | 0.1923759 | | |

En letra azul los pacientes considerados rápidos progresores, en negro los típicos progresores y el rojo identifica a los donadores sin infección.

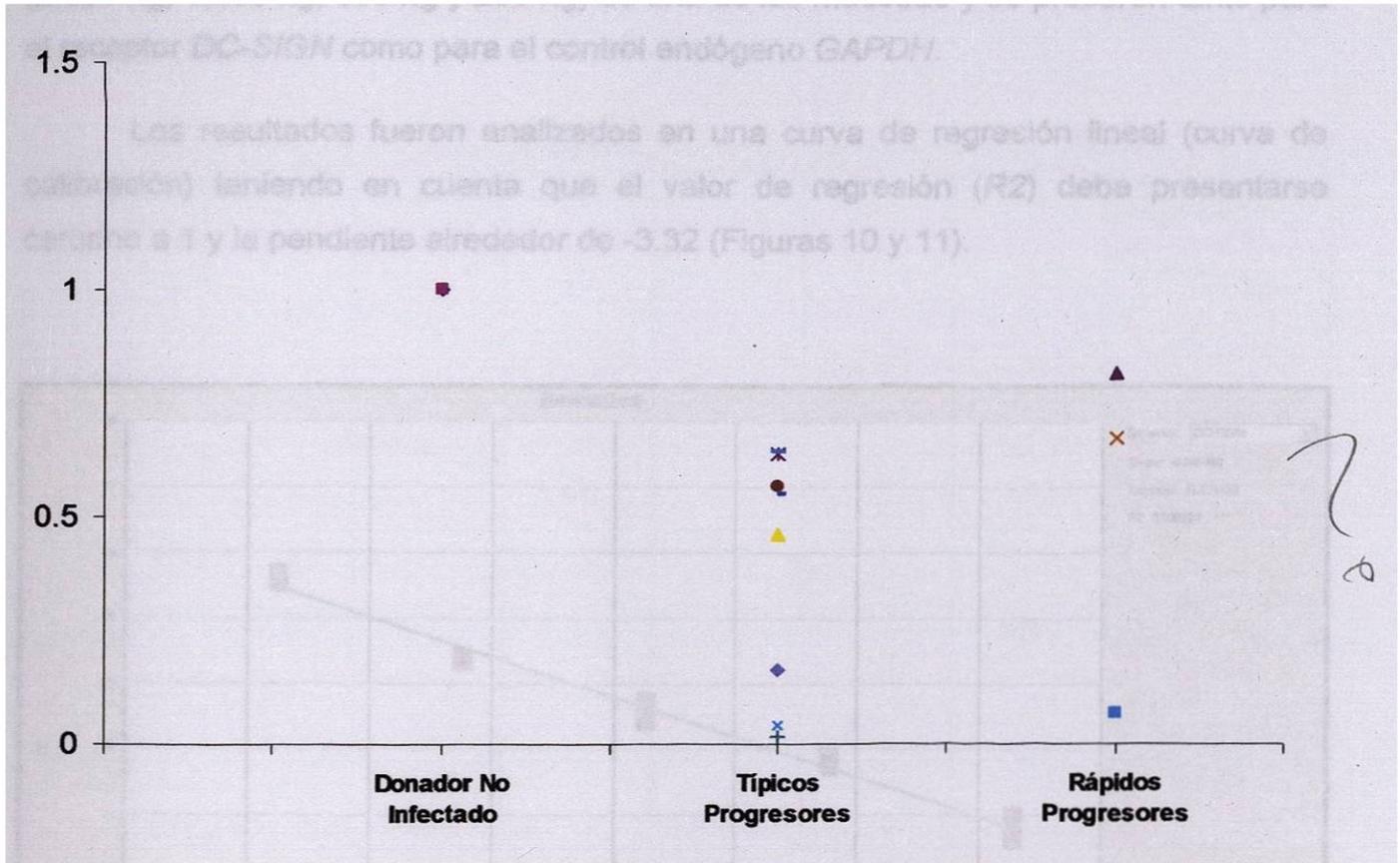


Figura 10. Análisis de la expresión del receptor *DC-SIGN* en pacientes Típicos y Rápidos Progresores comparada con donadores no infectados. Para la Prueba *T de Student* se logró que, P-01, P-03, P-04 y P-06 $P < 0.005$; P-02 y P-08 $P < 0.010$; P-09, P-10 y P-11 $P < 0.050$; P-07 $P < 0.100$; P-05 $P < 0.500$

6. Validación del experimento de *PCR* Cuantitativo en Tiempo Real.

Para la 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 tanto para el receptor *DC-SIGN* como para el control endógeno *GAPDH*.

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 (Figuras 10 y 11).

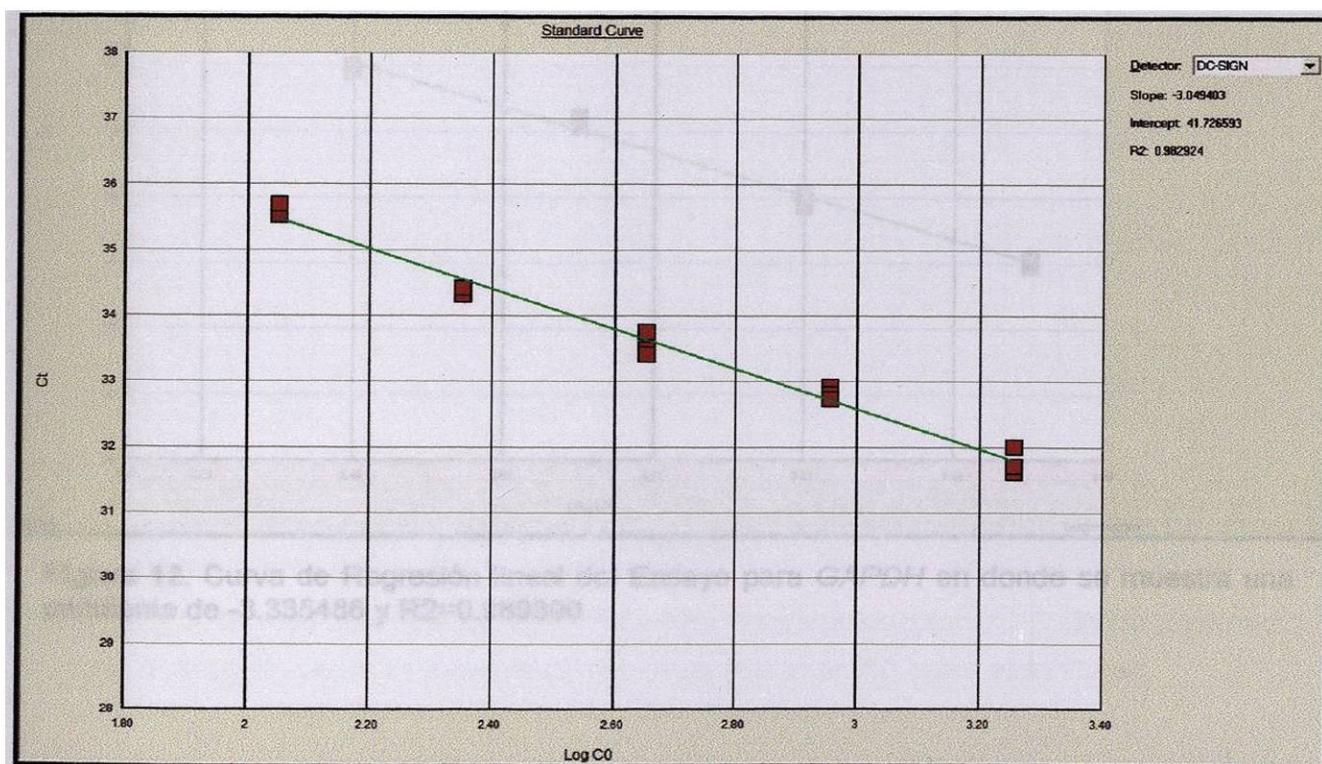


Figura 11. Curva de Regresión lineal del Ensayo para *DC-SIGN* en donde se muestra una pendiente de -3.049 y *R*²=0.982924



Figura 12. Curva de Regresión lineal del Ensayo para *GAPDH* en donde se muestra una pendiente de -3.335486 y R2=0.989390

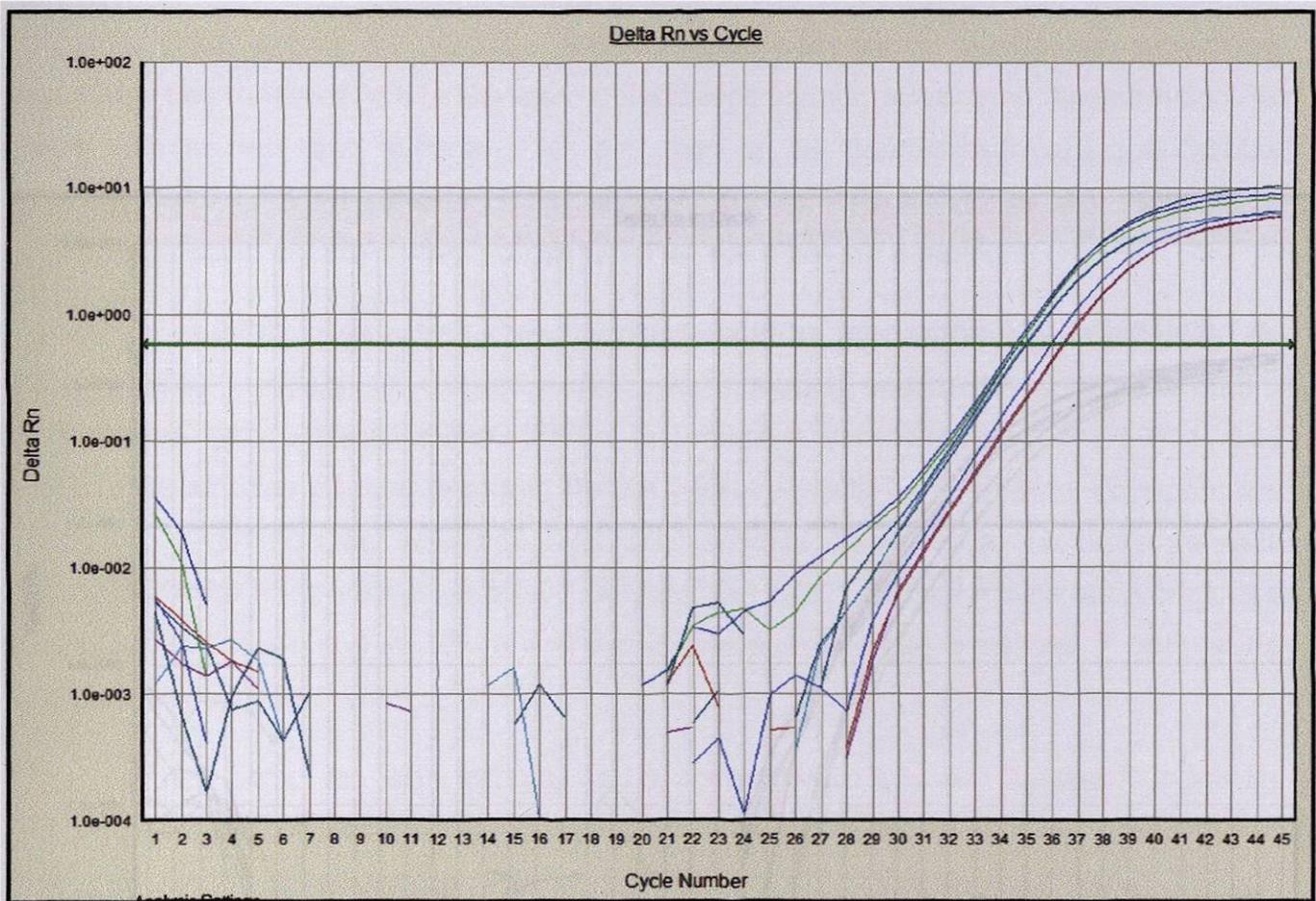


Figura 13. Gráfica obtenida del *PCR* en Tiempo Real del receptor *DC-SIGN* de pacientes *VIH-1+*. En color verde se muestra el umbral de detección *Ct* (*Threshold Cycle*).

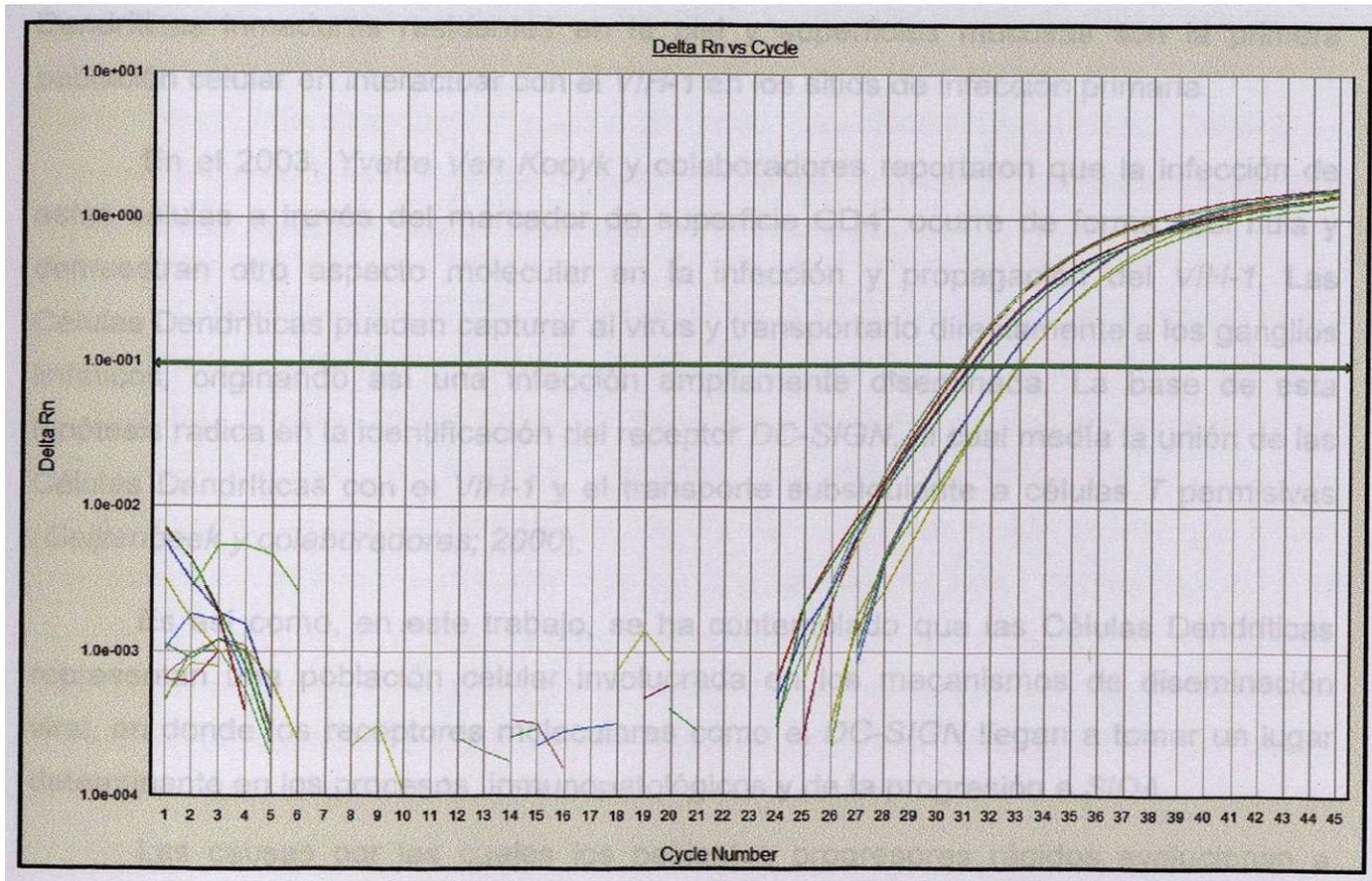


Figura 14. Gráfica obtenida del *PCR* en tiempo real del gen constitutivo *GAPDH* de pacientes *VIH-1+*. En color verde se muestra el umbral de detección *Ct* (*Threshold Cycle*).

XIII. DISCUSIÓN

Está ampliamente descrito que la forma más frecuente de transmisión del Virus de Inmunodeficiencia Humana es por exposición sexual; de ésta forma, logra alcanzar las principales zonas del sistema inmunológico pasando a través de superficies mucosas. Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la diseminación del virus aun no han sido definidos, sin embargo se ha determinado que las Células Dendríticas inmaduras residentes en la piel y superficies mucosas son la primera población celular en interactuar con el *VIH-1* en los sitios de infección primaria.

En el 2003, *Yvette Van Kooyk* y colaboradores reportaron que la infección de estas células a través del marcador de superficie $CD4^+$ ocurre de forma casi nula y demuestran otro aspecto molecular en la infección y propagación del *VIH-1*. Las Células Dendríticas pueden capturar al virus y transportarlo directamente a los ganglios linfáticos, originando así una infección ampliamente diseminada. La base de esta hipótesis radica en la identificación del receptor *DC-SIGN*, el cual medía la unión de las Células Dendríticas con el *VIH-1* y el transporte subsiguiente a células *T* permisivas (*Geijtenbeek y colaboradores; 2000*).

Es así como, en este trabajo, se ha contemplado que las Células Dendríticas representan una población celular involucrada en los mecanismos de diseminación viral, en donde los receptores moleculares como el *DC-SIGN* llegan a tomar un lugar determinante en los procesos inmunopatológicos y de la progresión a *SIDA*.

Las causas por las cuales los pacientes progresores rápidos evolucionan a *SIDA* en menos de dos o tres años a partir de la seroconversión mientras que en otros, este proceso dura alrededor de diez años (*Haynes, 1996*) aun se desconocen, sin embargo, se han propuesto varios mecanismos que explican estas diferencias en los que se incluyen aspectos genéticos, virológicos e inmunológicos (*Pantaleo, 1993*). Un fino balance entre estos mecanismos finalmente determina el curso de la infección por el virus.

El *DC-SIGN* es expresado tanto por Células Dendríticas derivadas de monocitos *in Vitro* como por células $CD34^+$ y de forma específica por las $CD14^+$. Éstas últimas son precursores de las CD en sangre periférica (*Van-Kooyk, 2003*). Lo anterior fue corroborado en un estudio previo realizado por *Ordaz Sánchez* en el 2005, al lograr identificar un fragmento de la región codificante para el receptor *DC-SIGN* en células mononucleares totales extraídas de pacientes infectados en diferentes estadios de la

enfermedad. Por otra parte, *Frédéric Baribaud* en el 2002 publicó estudios sobre la expresión del *DC-SIGN* en células dendríticas derivadas de monocitos (*CD14⁺*), éstos últimos fueron aislados de donadores no infectados, en donde reportó altos niveles de expresión del receptor. Es importante mencionar que, en el 2001 se publicaron deficiencias bioquímicas que se traducen en deficiencias funcionales en Células Dendríticas derivadas de monocitos (*Martin Thurnher, 2001*).

Para el presente trabajo, se implementó un novedoso sistema de aislamiento de Células Dendríticas a partir de mononucleares de sangre periférica, el cual permitió realizar el estudio de expresión génica de forma específica en las Células Dendríticas aisladas de individuos con infección por *VIH-1* y así, evaluar el comportamiento de la expresión del receptor durante una infección en pacientes.

La identificación del *DC-SIGN* mediante la *PCR* Convencional empleando los oligonucleótidos *MIOS DC-SIGN5'* y *MIOS DC-SIGN3'* diseñados por *Ordáz Sánchez en el 2005* no fue posible debido a que, por una parte, en una persona sana las Células Dendríticas representan alrededor del 1% del total de las Células Mononucleares en sangre periférica y por otro lado, la disminución celular que sufren los pacientes con inmunosupresión que es característico en una infección por *VIH*, la técnica de *PCR* convencional cuyo alcance esta en orden de nanogramos no alcanza a detectar la región que codifica para el receptor. Para la evaluación de la expresión génica es necesaria una cantidad considerable de *ARNm* que es difícil de obtener cuando el número de muestras es limitado ó cuando la población celular en estudio se presenta disminuida (*Ordaz Sánchez, 2005*).

Con la introducción del *PCR* Cuantitativo en Tiempo Real se logra un avance muy importante gracias a que es al menos 10 veces mas sensible que la *PCR* convencional, lo que incrementa las posibilidades de detección cuando se trabaja con cantidades limitadas de *ADNc* o *ARNm*. *Stephen A. Bustin* indica que el *PCR* Cuantitativo en Tiempo Real es la técnica para la detección y cuantificación por excelencia y por lo tanto, podemos decir que gracias a su alta sensibilidad la detección del receptor *DC-SIGN* fue llevada a cabo mediante ésta técnica.

Con respecto a la cuantificación del receptor, se aplicó el esquema de Cuantificación Relativa ($\Delta\Delta Ct$) para lo cual, *GAPDH* fue establecido como control endógeno y donadores no infectados como calibradores de comparación. Los resultados observados en este trabajo, no muestran diferencias significativas en la

expresión del receptor de Células Dendríticas *DC-SIGN* presentes en pacientes de progresión típica y rápida al *SIDA* comparada con la expresión en individuos no infectados, concordando de esta forma con la información encontrada en el estudio de mononucleares presentado por *Ordaz Sánchez* en el 2005 en la población de pacientes típicos y rápidos progresores a *SIDA*.

Los niveles circulantes de lectinas unidas a manosa (*MBL*) como el *DC-SIGN* son factores que pueden influir en la evolución de la enfermedad. Estudios realizados por *Cintia Nobile* en el 2003, muestran que los individuos con altos niveles circulantes de *MBL* tienen una mayor probabilidad de infección de las células T por el *VIH-1* y por ende una mayor probabilidad de progresión a *SIDA*, con lo que se puede inferir que, una alta expresión de *DC-SIGN* podría mostrar un incremento en la transmisión del *VIH-1* a células del sistema inmunológico. Nosotros no encontramos una mayor expresión del receptor en los pacientes incluidos en este estudio en comparación con los donadores no infectados sin embargo, dado que el número de pacientes incluidos es limitado y que es necesario tener información sobre los pacientes que, en ausencia de terapia antiretroviral, logran mantenerse en el período de latencia de la infección durante más de 10 años sin presentar síntoma alguno del estado de *SIDA* aun no se puede descartar la participación del *DC-SIGN* en la progresión a *SIDA*.

XIV. CONCLUSION

El presente trabajo, realizado en pacientes considerados típicos y rápidos progresores a *SIDA* además de donadores no infectados, nos ha permitido:

1. Aislar Células Dendríticas a partir de Células Mononucleares de Sangre Periférica.
2. Detectar la expresión del receptor *DC-SIGN* en Células Dendríticas de sangre periférica.
3. Cuantificar la expresión génica del receptor *DC-SIGN*

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del receptor de Células Dendríticas *DC-SIGN* en los pacientes Típicos y Rápidos en comparación con donadores no infectados sin embargo, aun no es posible concluir de forma determinante que los niveles de expresión del receptor no están relacionado con la progresión Típica y Rápida al *SIDA* debido al numero limitado de pacientes incluidos en este estudio.

XV. PERSPECTIVAS

Las Células Dendríticas representan una población celular de alta importancia gracias a las funciones que desempeñan, especialmente en los procesos inmunopatológicos durante la infección por *VIH*; por otra parte, los mecanismos por los cuales los pacientes alcanzan el estado *SIDA* a diferentes tiempos después de la seroconversión a un no han sido definidas y creemos que las Células Dendríticas pueden estar involucradas en éste proceso.

Algunas mutaciones y cambios morfológicos en el *DC-SIGN* así como nuevos estudios en niveles de expresión de otros co-receptores contribuirán de forma significativa a entender la biología de las Células Dendríticas durante la infección por *VIH*.

XVI. REFERENCIAS

1. C. Vidal-Lampurdanés, T. Fumarola-Suñé. Virus de la Inmunodeficiencia Humana: Características Viroológicas, Historia Natural y Fisiopatogenia de la Infección del Sistema Nervioso. Rev Neurol 1996; 24 (136): 1563-1568.
2. Barré-Sinussi F, Cherman JC, Rey F, et al. Isolation of T-lymphotropic Retrovirus From a Patient at Risk for AIDS. Science 1983; 220:868-871.
3. Robert C. Gallo and Luc Montagnier. AIDS in 1988. Scientific American. Oct. 1988; Vol. 259, 4: 41-48.
4. ONUSIDA-OMS Situación de la Epidemia de SIDA., Diciembre de 2003.
5. J. Roberto Trujillo et al. La Neuroinmunopatogénesis del VIH. Revista Mexicana de Neurociencia 2001, 2(5): 259-267.
6. Epidemiología del VIH/SIDA en México en el Año 2003. Secretaría de Salud, Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA, 1 de noviembre de 2003: 1-7.
7. Preston BD, Píos BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 Reverse Transcriptase. Sience 1984; 224: 497-500.
8. Kirsi Liitsola. Genetic Typing to Study HIV Epidemiology. National Public Health Institute, University of Helsinki, 2000: 1-60.
9. Massimo Galli. HIV-1 Long-Term Non-progression: More Open Questions than Answers. AIDS Rev 1999; 1:74-79
10. Pantaleo G, graziosi C, Fauci A. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. New England Journal of Medicine 1993; 328:327-335.
11. 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.

12. 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,.
13. Robert C. Mellors. Pathogenesis of HIV Infection and AIDS. Weill Medical College of Cornell University, 1999
14. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature*. 1998; 392:245-252
15. 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.
16. Brian Jameson, Frédéric Baribaud, Stefan Pöhlmann, Darlene Ghavimi, Frank Mortari, Robert W. Doms, and Akiko Iwasaki. Expression of DC-SIGN by Dendritic Cells of Intestinal and Genital Mucosae in Humans and Rhesus Macaques. *Journal of Virology*, 2002, 1866-1875
17. Vincent Piguet and Andrew Blauvelt. Essential Roles for Dendritic Cells in the Pathogenesis and Potential Treatment of HIV Disease. *The Journal of Investigative Dermatology*.
18. Yvette van Kooyk and Teunis B. H. Geijtenbeek. DC-SIGN: Escape Mechanism for Pathogens. *Nature reviews, Immunology*, 2003; Vol 3: 697-709.
19. Steinman, R. M. DC-SIGN: A Guide to Some Mysteries of Dendritic cells. *Cell* 2000;b100, 491-494.
20. Stephen V. Su, Kevin B. Gurney and Benhur Lee. Sugar and Spice: Viral Envelope-DC-SIGN Interactions in HIV Pathogenesis.
21. Anneke Engering, Sandra J. van Vliet, Tenius B. H. Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk. Subset of DC-SIGN⁺ Dendritic Cells in Human Blood Transmits HIV-1 to T Lymphocytes. *Blood*, 2002; Vol. 100, No. 5, 1780-1786
22. 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

23. Linda Morison. The Global of HIV/AIDS. *British Medical Bulletin* 2001; 58: 7-18
24. Frédéric Baribaud, Stefan Pöhlmann, George Leslie, Frank Mortari and Robert W. Doms. Quantitative Expression and Virus Transmission Analysis of DC-SIGN on Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Journal of Virology*, 2002; Vol 76, No 18. 9135-9142.
25. Stephen V. Su, Patrick Hong, Sarah Baik, Oscar A. Negrete, Kevin B. Gurney, Benhur Lee. 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.
26. Martin Thurnher, Claudia Zelle-Rieser, Reinhold Ramoner, Georg Bartsch and Lorenz Hörtl. The disabled Dendritic Cell. *The FASEB Journal*, 2001; Vol. 15, 1054-1061.
27. Shin-ichi Hashimoto, Takuji Suzuki, Hong-Yan Dong, Shigenori Nagai, Nobuyuki Yamazaki y Kouji Matsushima. Serial Analysis of Gene Expression in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Blood* 1999; Vol 94, No. 3, 845-852.
28. Mei Mei Tian. Dendritic Cells: A Lesser Known Part of the Immune System. *BioTeach Journal*, 2004; Vol. 2.
29. Caetano Reis e Sousa, Philip D. Stahl and Jonathan M. Austyn. Phagocytosis of Antigens by Langerhans Cells In Vitro. *Journal of Experimental Medicine*, The Rockefeller University Press, 1993. Volume 178, 509-519.
30. Jonathan M. Austyn. Antigen-Presenting Cells Experimental and Clinical Studies of Dendritic Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 2000. Vol. 162; S146-S150.
31. Stuart G. Turville, Jim Arthos, Kelli Mac Donald, Garry Lynch, Hassan Naif, Georgina Clark, Derek Hart y Anthony L. Cunningham. HIV gp120 Receptors on Human Dendritic Cells. *The American Society of Hematology. Blood*, 2001; Vol. 98, No. 8 2482-2488.
32. Lydia G. Rivera-Morales, Vladimir A. Novitsky, Roberto Trujillo, Cristina Rodríguez Padilla, Max Essex *et al.* The Molecular Epidemiology of HIV Type 1

of Men in Mexico. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2001; Number 1 Volume 17, 87-92.

33. Secretaría de Salud, CONASIDA, Registro Nacional de Casos de Sida. Cifras al 31 de diciembre de 2005.
34. Marco Iván Ordaz Sánchez, Pablo Zapata Benavides, Laura Trejo Ávila, Reyes S. Tamez Guerra, Cristina Rodríguez Padilla, Lydia Guadalupe Rivera Morales. Células Dendríticas en la Inmunopatología del Virus de Inmunodeficiencia Humana. *RESPYN*, Julio-Septiembre de 2004; Vol. 5, No. 3.
35. Andrzej Dzionek, Anja Fuchs, Petra Schmidt, Sabine Cremer, Monika Zysk, Stefan Miltenyi, David W. Back y Jürgen Schmitz. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cell in Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology*; The American Association of Immunologists, 2000; 165:6037-6046.
36. Kelli McKenna, Anne-Sophie Beignon, and Nina Bhardwaj. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Virology*, American Society for Microbiology, 2005; No. 1, Vol 79 17-27.
37. Cinzia Nobile, Arnaud Moris, Françoise Porrot, Nathalie Sol-Foulon and Oliver Schwartz. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env-Mediated Fusion by DC-SIGN. *Journal of Virology*, American Society for Microbiology, 2003; Vol 7, No. 9, 5313-5323.
38. Paul R. Clapham y Áine McKnight. HIV-1 Receptors and Cell Tropism. *British Medical Bulletin*; The British Council 2001; 58:43-59.
39. Andrew Blauvelt, Hideo Asada, M. Wayne Saville, Vera Klaus-Kovotun, David J. Altman and Stephen I. Katz. Productive Infection of Dendritic Cells by HIV-1 and Their Ability to Capture Virus are Mediated through Separate Pathways. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997; Volume 100, No. 8, 2043-2053.
40. Christine Trumpfheller, Chae Gyu Park, Jennifer Finke, Ralph M. Steinman y Angela Granelli-Piperno. Cell Type-Dependent Retention and Transmission of HIV-1 by DC-SIGN. *International Immunology*, The Japanese Society for Immunology, 2003; Vol. 15, No. 2, 289-298.

41. Una O'Doherty, Ralph M. Steinman, Michael Peng, Paul U. Cameron, Stuart Gezelter, Iris Kopeloff, William J. Swiggard, Melissa Pope y Nina Bhardwaj. Dendritic Cells Freshly Isolated from Human Blood Express CD4 and Mature into Typical Immunostimulatory Dendritic Cells after Culture in Monocyte-Conditioned Medium. *Journal of Experimental Medicine*, The Rockefeller University Press, 1993; Vol. 178, 1067-1078.
42. Mark A. Valasek and Joyce J. Repa. The power of Real-Time PCR. *Advances in Physiology Education*; The American Physiological Society, 2005; Vol 29, 151-159.
43. Ian M. Mackay, Katherine E. Arden and Andreas Nitsche. Survey and Summary. Real Time *PCR* in Virology. *Nucleic Acids Research*, 2002, Vol 30, No. 6, 1292-1305.
44. S. A. Bustin. Quantification of mRNA using Real-Time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002, Vol. 29, 23-39.
45. Michael W. Pfaffl. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001, Vol. 29, 2002-2007.
46. Pantaleo G, Grazioni C, Fauci AS. New Concepts In the Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal Medicine*, 1993; 328:327-335.
47. Stephen A. Bustin y Reinhold Muller. Real-Time Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) and its Potential use in Clinical Diagnosis. Review. *Clinical Science* 2005; 109, 365-379.

