



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

LAS QUIMIOCINAS RANTES, SDF-1 α Y
MDC PREVIENEN LAS ALTERACIONES
DEL SUEÑO Y CONDUCTA ALIMENTICIA
INDUCIDAS POR LA gp120 DEL VIH EN
RATAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA
P R E S E N T A:
KHALIL GUZMÁN VÁSQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR PROSPERO GARCÍA
JURADO: DRA. IRMA YOLANDA DEL RÍO PORTILLA
LIC. MARÍA EUGENIA DORANTES GUEVARA
DRA. ALEJANDRA EVELYN RUÍZ CONTRERAS
DR. OSCAR RICARDO GALICIA CASTILLO



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi padre
A mi madre

Este trabajo de tesis se realizó en el grupo de Neurociencias del departamento de fisiología de la facultad de medicina de la UNAM con el apoyo de la DGAPA-UNAM #212908 otorgado a OPG.

AGRADECIMIENTOS.

A mi padre y mi madre por el apoyo incondicional que me han dado a lo largo de la vida y sobre todo las enseñanzas.

A mis hermanas y hermanos: Donají, Dalia, Abigail, Constancio y Vicente porque todos de alguna forma ha contribuido a este logro.

A OPG por todo el apoyo para la realización de este trabajo.

A todos los integrantes del grupo de Neurociencias, a los que están y a los que se han ido, por las críticas, comentarios, apoyo y enseñanzas. En especial a Marina Cisneros.

A los miembros de mí jurado por las críticas y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

A todos los amigos de la facultad, perdón por no poner los nombres pero no quiero que se me pase alguno y se vayan a enojar.

ÍNDICE:

	Página
Resumen	6
Introducción	7
Capítulo 1:	
DEMENCIA ASOCIADA AL VIH	8
Capítulo 2	
VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA	15
Capítulo 3:	
QUIMIOCINAS	20
Capítulo 4:	
MODELOS ANIMALES DE DEMENCIA ASOCIADA AL VIH	25
Capítulo 5:	
HIPÓTESIS y OBJETIVOS	32
Capítulo 6:	
MÉTODO	33
Capítulo 7:	
RESULTADOS	40
Capítulo 8:	
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	50
Capítulo 9:	
REFERENCIAS	56

RESUMEN

En el mundo existen alrededor de 33 millones de personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), el cual causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). Alrededor del 30% de los adultos infectados con el virus presenta un cuadro clínico denominado demencia asociada al VIH caracterizado por alteraciones en la atención, la memoria, el lenguaje, las habilidades motoras, así como en el sueño y en la percepción del dolor. El VIH ataca principalmente a las células del sistema inmune que presentan el receptor CD4, que es el principal receptor para la infección, pero adicionalmente es indispensable la presencia de otros dos receptores, el CCR5 y el CXCR4, que son receptores a quimiocinas y en ausencia de ellos no se adquiere ésta. Se ha propuesto a la glucoproteína 120 (gp120) del VIH como el agente etiológico de la demencia, ya que en estudios *in vivo* e *in vitro* induce muerte por apoptosis que puede ser prevenida por agonistas de los receptores a quimiocinas. También se ha mostrado que la administración de la gp120 en ratas induce alteraciones semejantes a las observadas en los pacientes que presentan demencia.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si ligandos naturales (RANTES, SDF-1 α y MDC) de los receptores a quimiocinas administrados previo a la gp120 pueden prevenir las alteraciones inducidas por esta glucoproteína. En los resultados se encontró que las quimiocinas RANTES y MDC previenen la caída en la ingestión de alimento, ingestión de agua y control motor inducidas por la gp120, mientras que la quimiocina SDF-1 α parece tener los mismos efectos que aquella. En la percepción del dolor, la combinación de una quimiocina con la gp120 disminuye el umbral de éste y en el sueño no se encontraron cambios. Con estos datos se puede concluir que las quimiocinas

juegan un papel importante en la instalación de la demencia asociada al VIH y también en la modulación de distintas conductas.

INTRODUCCIÓN

A lo largo y ancho del planeta existen más de 33 millones de personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), de las cuales alrededor del 30 % presenta un cuadro clínico denominado demencia asociada al VIH. Esta demencia consiste en alteraciones cognoscitivas-motoras, así como alteraciones en la percepción del dolor y en el ciclo sueño-vigilia, de ahí la importancia de estudiar los efectos que tiene éste virus en el sistema nervioso central.

Debido a que se ha mostrado que el virus no infecta a las neuronas, porque éstas no expresan el principal receptor al cual se une el virus, se ha tratado de encontrar los mecanismos por los cuales el funcionamiento neuronal se modifica.

Los estudios en modelos animales han aportado información muy importante para determinar el posible mecanismo por el cual este virus daña al cerebro, siendo una glucoproteína (gp120) la principal candidata como el factor etiológico de la demencia. Esta glucoproteína del virus activa receptores neuronales y por lo tanto modifica su funcionamiento y en ocasiones lleva a las células a la muerte. Otro sistema que ha cobrado importancia en el cerebro es el de las quimiocinas debido a que recientemente se han visto involucradas en la modulación del funcionamiento neuronal y, por lo tanto, en distintas conductas.

En ese tenor, el presente estudio pretende conocer y aportar información que lleve a conocer los mecanismos subyacentes al deterioro de distintas conductas y que de alguna forma sirva para buscar alternativas terapéuticas para los pacientes que sufren de demencia asociada al VIH.

Planteamiento del Problema

Las personas infectadas con el VIH muestran un deterioro cognoscitivo-motor, así como alteración de la conducta alimenticia, el umbral al dolor y el ciclo sueño-vigilia. Existen varias hipótesis de cómo el virus entra al cerebro, siendo la más aceptada la del caballo de Troya. También se sabe que el virus no infecta a las neuronas por lo cual se cree que hay un mecanismo indirecto que está produciendo el daño neuronal. Diversos trabajos han mostrado en modelos animales que la administración de la glucoproteína 120 del virus induce alteraciones en la memoria, la atención, la ingesta de alimento, el sueño, la percepción del dolor y la muerte celular, proponiéndose a esta glucoproteína como el potencial factor etiológico de la demencia asociada al VIH. De igual forma se ha mostrado que el sistema de las quimiocinas juega un papel importante en el curso de la infección del virus, ya que sin receptores como el CCR5 y el CXCR4, el virus no infecta a las células. Por otro lado, estudios *in vitro* han evidenciado que algunas quimiocinas pueden bloquear la muerte celular inducida por la gp120, lo cual sugiere que las quimiocinas como RANTES y MDC, y probablemente SDF-1 α , pueden ejercer un papel protector en contra de los efectos de la gp120 en el cerebro.

Con base en los estudios mencionados en este trabajo se plantea que bloqueando los receptores a quimiocinas con sus ligandos naturales se puede disminuir o bloquear el daño conductual inducido por la gp120, ya que se ha demostrado que este tipo de moléculas pueden prevenir la muerte celular inducida por la gp120 pero se desconoce si también previenen las alteraciones conductuales.

Capítulo 1. DEMENCIA ASOCIADA AL VIH

La pandemia del Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (sida) ha originado en los últimos años millones de muertes en todo el mundo. Tan sólo para el año 2007 se estimaba que 33.2 millones de personas vivían infectadas con el virus que causa el sida (Figura 1.1). También para el 2007 el número de muertes causadas por este síndrome desde su aparición era de alrededor de 20 millones de personas (UNAIDS, 2008).

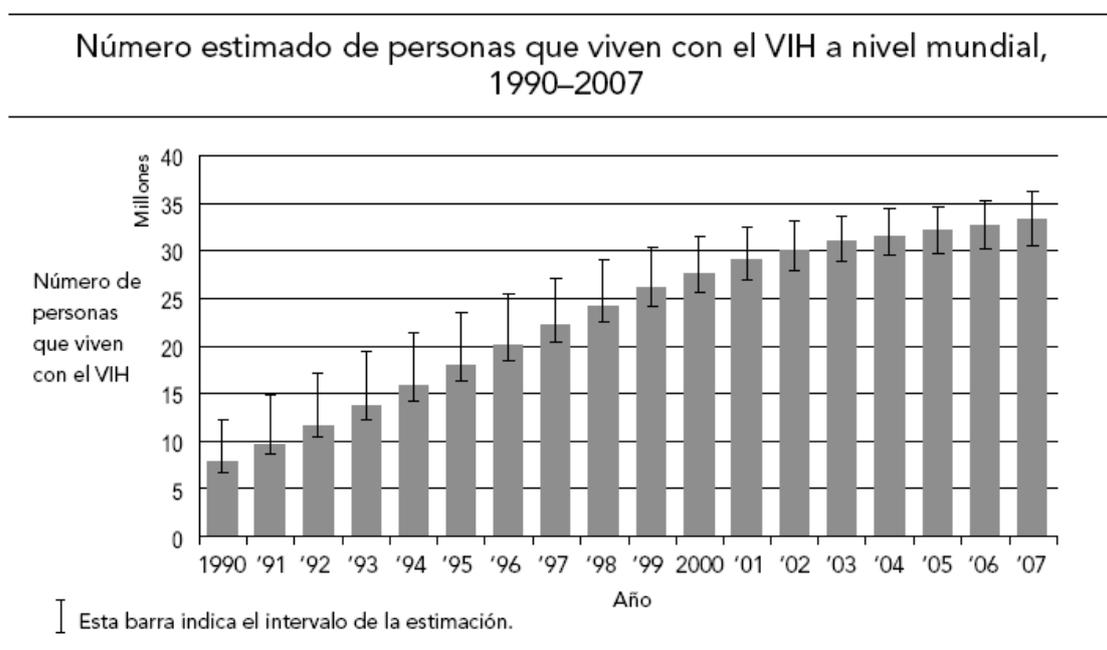


Figura 1.1. Se muestran los casos de VIH acumulados por año, (tomado de UNAIDS, 2008).

En México a finales del año 2007 había 115 mil personas infectadas con el virus que causa el sida y hasta el año 2005 habían muerto 4653 personas. Anualmente se estima que se presentan 4800 nuevos casos de personas infectadas (CONASIDA, 2008).

El Virus de Inmuno Deficiencia Humana (VIH) ataca principalmente a células del sistema inmune como son los macrófagos y linfocitos T, a los que ocupa para replicarse y posteriormente causarles la muerte.

La infección primaria por el VIH es llamada seroconversión y puede ir acompañada por una serie de síntomas inespecíficos parecidos a los de la gripe, por ejemplo: fiebre, dolores musculares y de las articulaciones, dolor de garganta y ganglios linfáticos inflamados. En esta etapa la persona infectada es más transmisora que en cualquier otro periodo de la enfermedad, ya que su organismo alcanza la más alta cantidad de virus (González-Scarano y Martín-García, 2005), lo que se debe a que todavía no se desarrolla por completo una respuesta inmunológica. Sin embargo, no todos los recién infectados con el VIH padecen los síntomas antes mencionados. Posteriormente se presenta una etapa llamada asintomática en donde el virus se sigue replicando pero la persona infectada no muestra ningún síntoma del sida, durante la cual diariamente se producen varios miles de millones de virus junto con una disminución de linfocitos T CD4+. El virus no sólo se encuentra en la sangre, sino en otras partes del cuerpo como en los ganglios linfáticos, el cerebro y las secreciones genitales.

El tiempo que tarda el diagnóstico de sida desde la infección inicial del VIH es variable. Algunos pacientes desarrollan algún síntoma de inmunosupresión pocos meses después de haber sido infectados, mientras que otros se mantienen asintomáticos hasta 20 años. El tiempo promedio entre la infección inicial y el desarrollo del sida varía de ocho a diez años en ausencia de tratamiento (figura 1.2).

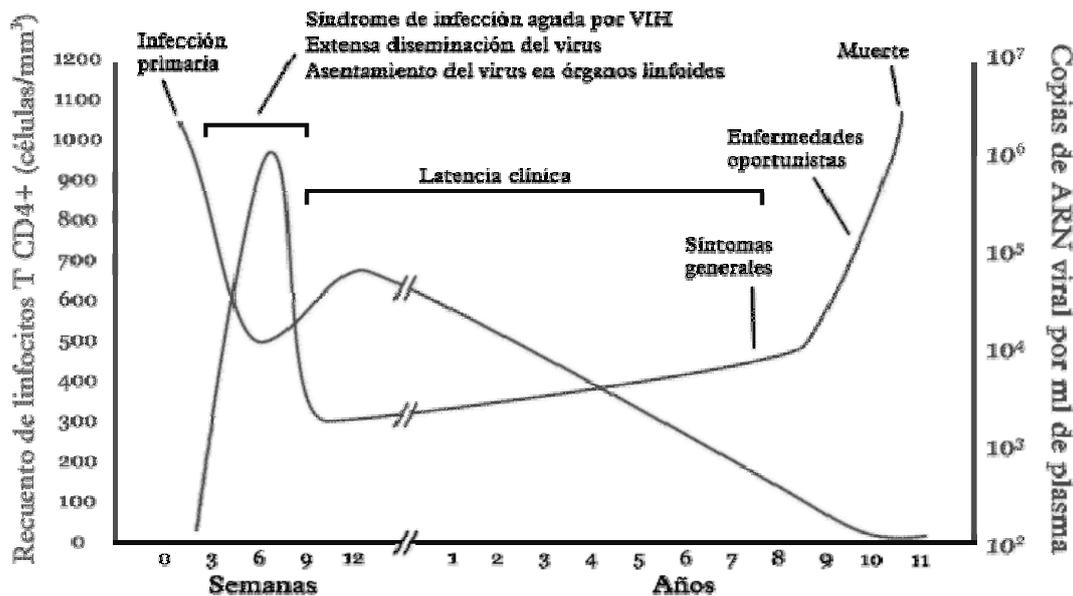


Figura 1.2. Curso típico de la infección por VIH. Los detalles y en particular los plazos, varían ampliamente de un infectado a otro.

Alrededor del 50% de los niños y del 30% de los adultos infectados con el VIH desarrollan un cuadro clínico denominado demencia asociada al VIH. Para el 2001, el DSM-IV planteó que la característica esencial de esta demencia era el efecto fisiopatológico directo de la enfermedad producido por el VIH, en donde los hallazgos neuropatológicos más frecuentes incluyen la destrucción multifocal difusa de la sustancia blanca y de las estructuras subcorticales, el líquido cefalorraquídeo puede mostrar un nivel de proteínas normal o elevado con moderada linfocitosis y habitualmente se puede aislar el VIH. La demencia que se asocia a la infección directa del sistema nervioso central (SNC) por VIH se caracteriza por un deterioro en la memoria, enlentecimiento motor, dificultad para poner atención y para la resolución de problemas. Las manifestaciones de comportamiento más frecuentes son apatía, retraimiento social, delirium ocasional, ideas delirantes o alucinaciones. En la exploración física se observa temblor, deterioro de los movimientos rápidos repetitivos, falta de equilibrio, ataxia, hipertonía, hiperreflexia generalizada, signos positivos de liberación frontal y deterioro de los reflejos palpebral y de seguimiento ocular. Los

niños también pueden desarrollar demencia debido a la enfermedad por VIH, que de forma típica se manifiesta por retraso en el desarrollo, hipertensión, microcefalia y calcificación de los ganglios basales (American Psychiatric Association, 2001).

La clasificación más reciente de las alteraciones neurocognoscitivas asociadas al VIH fue hecha en el 2007 (Antinori y cols., 2007) y hace énfasis en tres cuadros clínicos: daño neurocognoscitivo asintomático asociado al VIH, desorden neurocognoscitivo menor y demencia asociada al VIH. Dependiendo de la severidad del daño se puede incluir a los pacientes en cualquiera de estos síndromes. Brevemente se describen las características de cada uno de dichos cuadros clínicos.

Daño neurocognoscitivo asintomático asociado al VIH. El daño en el funcionamiento cognoscitivo involucra al menos dos habilidades que pueden incluir: verbal/lenguaje, atención/memoria de trabajo, abstracción, memoria (aprendizaje, recuerdo), velocidad de procesamiento de la información, sensación/percepción, habilidades motoras. El daño cognoscitivo no interfiere con las actividades cotidianas.

Desorden neurocognoscitivo menor asociado al VIH. El daño cognoscitivo involucra al menos dos habilidades de las que se mencionaron anteriormente. El daño cognoscitivo produce una interferencia menor en las actividades cotidianas. El paciente puede reportar reducción de la agudeza mental e ineficiencia en el trabajo, en las actividades cotidianas y/o en las relaciones sociales.

Demencia asociada al VIH. Hay un marcado daño en el funcionamiento cognoscitivo, involucrando alteraciones en dos o más habilidades de las mencionadas anteriormente. El daño se puede ver principalmente en el aprendizaje de nueva información, procesamiento lento de ésta y deficiencias en la atención/concentración, produciendo una marcada interferencia con las actividades cotidianas (trabajo, casa, actividades sociales).

A continuación se describe brevemente cómo pueden alterarse las distintas habilidades involucradas en el deterioro neurocognoscitivo:

Atención y procesamiento de la información. En pacientes con VIH, la atención simple tiende a conservarse pero en tareas que involucran manipulación de información compleja, especialmente bajo presión de tiempo, su ejecución tiende a deteriorarse. Por ejemplo, los pacientes obtienen malas puntuaciones en pruebas de atención compleja, discriminación, búsqueda visual, atención selectiva o dividida y reflejo de orientación. Así mismo, en tareas de tiempo de reacción doble, en donde los sujetos responden a un estímulo auditivo y a uno visual, primero independientemente y después de manera simultánea, se puede observar que los pacientes no exhiben ninguna alteración en el tiempo de reacción a los estímulos presentados independientemente, pero cuando tienen que responder a los dos estímulos simultáneamente, muestran una mala ejecución, puntuando más alto en el tiempo de reacción (Hinkin y cols., 2000).

Aprendizaje y memoria. Los pacientes con VIH muestran un deterioro en pruebas de memoria a corto plazo. Por ejemplo, cuando tienen que recordar la secuencia de una lista de números o de palabras, o ubicarlas en el espacio, tienen dificultades para hacerlo (Antinori y cols., 2007). En una prueba de memoria lógica, que consistió en contarles a los pacientes una historia la cuál tenían que recordar posteriormente, cuando se les pidió que la evocaran, omitieron un mayor número de detalles que las personas sanas y de la misma forma mostraron un deterioro en pruebas de memoria visual, auditiva y verbal (Grant y cols., 1987). Adicionalmente, los pacientes con VIH reportan que olvidan con facilidad información adquirida recientemente como nombres de personas que acaban de conocer o la lista de cosas para el supermercado. En general se ha observado que estos pacientes presentan dificultades para adquirir nueva información.

Lenguaje. Los pacientes con VIH tienen menor fluidez, menor generación espontánea de palabras bajo presión de tiempo y si se les pide que digan palabras que inicien con una letra o dentro de una categoría como frutas, animales, etc. tienen dificultad para hacerlo (Hinkin y cols., 2000).

Habilidades psicomotoras. Las personas infectadas con VIH muestran una actividad psicomotora lenta y alteraciones en la coordinación (Grant, 2008).

Funciones ejecutivas. La infección está asociada con alteraciones en la inhibición de la respuesta, toma de decisiones, planeación y evaluación (Antinori y cols., 2007).

Por otro lado, además de la presencia de cualquiera de estos síntomas, las personas infectadas con el VIH, también pueden presentar alteraciones en el sueño, cambios en la percepción del dolor y pérdida de peso.

Sueño. Norman y cols. (1990, 1992) mostraron que los pacientes infectados con VIH tienen alteraciones en la arquitectura del sueño; esto es, muestran un incremento en el tiempo total de sueño de ondas lentas (SOL), además de un aumento en la segunda etapa de la noche que en condiciones normales es escaso y también muestran un aumento en la frecuencia de despertares, en la etapa 1 del sueño y en el sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR), aunque la duración promedio de éste disminuye, al igual que la de la etapa 2 y la latencia al sueño (el tiempo que tarda en dormirse el sujeto cuando se ha ido a la cama). Finalmente hay estudios que reportan que no hay cambios en los tiempos totales de SMOR y SOL (Wiegand y cols., 1991). Como puede observarse, los cambios en el sueño parecen inconsistentes, aunque dicha variabilidad podría depender del estado de la enfermedad, ya que a pesar de que puedan tener el mismo tiempo de infección, el estado de salud del paciente previo podría determinar el progreso de la misma, por lo que no todos exhiben cambios en el sueño.

Dolor. Las personas infectadas con el virus también tienen una disminución en el umbral al dolor; es decir, son más sensibles al dolor, en especial ante estímulos cálidos o mecánicos (Bouhassira y cols., 1999; Verma y cols., 2005).

Peso corporal. En un estudio en donde a pacientes infectados con el VIH se les midió repetidas veces su peso corporal, peso de la masa libre de grasa y el peso de la grasa, encontraron que el peso de cada una de estas variables iba disminuyendo mientras avanzaba la enfermedad y que no existían diferencias entre hombres y mujeres (Forrester y cols., 2002).

Como se ha visto, los pacientes infectados con el VIH muestran alteraciones tanto neurocognoscitivas como en las funciones básicas entre las que se encuentran el dormir, la percepción del dolor y el peso corporal. Estas alteraciones podrían ser un indicativo de que a nivel del sistema nervioso central está ocurriendo un deterioro provocado por el VIH, aunque no se sabe aún si es en forma directa o indirecta debido a que no todos los pacientes presentan alteraciones. Con la terapia antirretroviral, que es la administración de fármacos que previenen la replicación del VIH, la incidencia de estos síntomas ha disminuido, ya sea en cuanto al número de pacientes o la severidad del daño, pero aunque el daño ha disminuido persiste la incógnita de los mecanismos subyacentes. En los siguientes capítulos se tratará de ir esclareciendo cómo el virus puede inducir daño en el cerebro. Por lo pronto se explicarán las características básicas del Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

Capítulo 2. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es miembro de la familia de los lentivirus, los cuales incluyen retrovirus que poseen genomas complejos. El VIH tiene una morfología esférica de 100 a 120 nm de diámetro. Su genoma consiste en dos copias idénticas de ARN de 9.2 kb. Las características generales de un virión maduro del VIH (figura 2.1) son una bicapa lipídica que contiene aproximadamente 72 glucoproteínas 160 (gp160) la cual se divide en la glucoproteína 120 (gp120) y la glucoproteína 41 (gp41). Las principales proteínas que forman el centro del virus son la proteína matriz o p17 que forma una concha asociada con el lado interno de la membrana a través del extremo terminal N, la cápside o p24 que forma un aro hexamérico para constituir ésta, la proteína nucleocápside o p7 que está implicada en la formación y estabilización de los dímeros de ARN y del ensamble de la nucleocápside, la p6 que es requerida para las últimas etapas del ensamble viral, y eficiente la liberación del virión al exterior de la célula y la internalización de la proteína vpr dentro del virión (González-Scarano y Martín-García, 2005).

Algunas de las características generales del ciclo de replicación del VIH se mencionan a continuación (figura 2.2). El primer paso es el reconocimiento del virus por la célula huésped. La gp120 del virus se acopla al receptor CD4 y únicamente en presencia de los receptores a quimiocinas CCR5 (que se encuentran principalmente en los macrófagos) o CXCR4 (que se encuentran principalmente en los linfocitos T), el virus puede infectar a la célula, ya que sin estos receptores la infección no es posible. Diversos estudios han mostrado que existen variaciones genéticas en el receptor CCR5 en la población universal y que estas variaciones pueden ayudar a prevenir, retrasar o

adelantar la infección (De Silva y Stumpf, 2004; Singh, y cols., 2008; Arenzana-Seisdedos y Parmentier, 2006)).

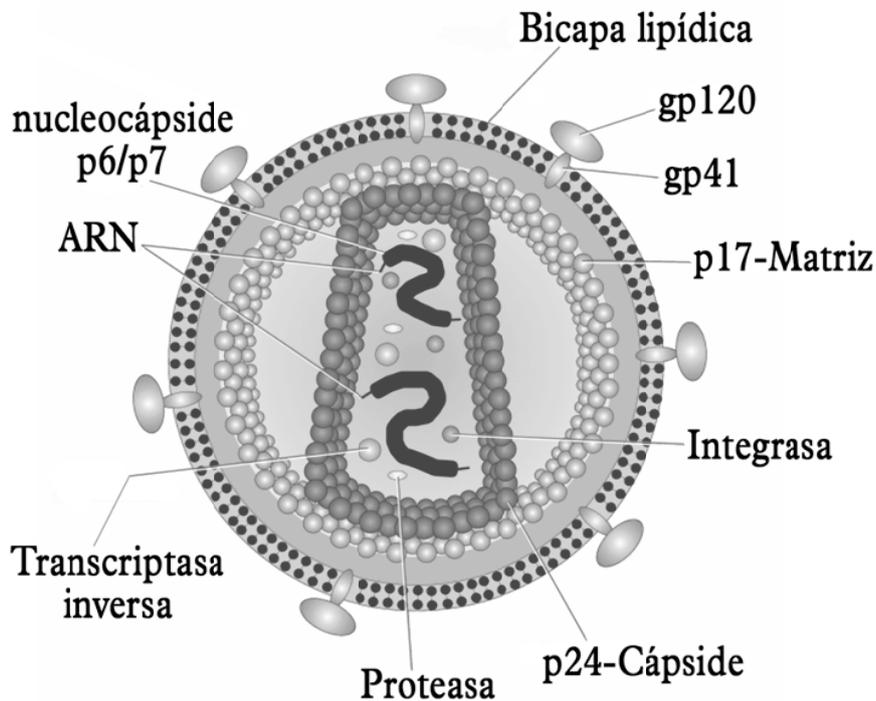


Figura 2.1. Representación de un virión maduro (Tomado de Sierra y cols., 2005).

Cuando se da el reconocimiento entre el virus y la célula se fusionan sus membranas, de esta manera el virus introduce la cápside, la nucleocápside, las proteínas accesorias y el ARN mensajero dentro del citoplasma de la célula. Inmediatamente el ARN mensajero se libera de la nucleocápside y está listo para que la transcriptasa reversa procese la información del ARN y forme el ADN complementario. Cuando se ha formado el ADN, éste viaja al núcleo de la célula y con la ayuda de la integrasa pasa a formar parte del ADN celular. Ya que el ADN viral ha sido integrado por procesos normales de la célula, se sintetiza el ARN mensajero viral que sale del núcleo de la célula para que pueda ser traducido por los ribosomas en proteínas. En este punto las proteasas del virus procesan y cortan las proteínas sintetizadas para formar los componentes internos del virión, es decir la cápside. Posteriormente, la cápside viaja

hacia la membrana celular en donde se envuelve con la membrana de la célula huésped y así se forma un nuevo virión. En cada célula se pueden formar miles de viriones nuevos, aunque no necesariamente todos son funcionales. Poco tiempo después de que el virión es expulsado madura y puede infectar otras células y continuar con su ciclo de vida y de replicación.

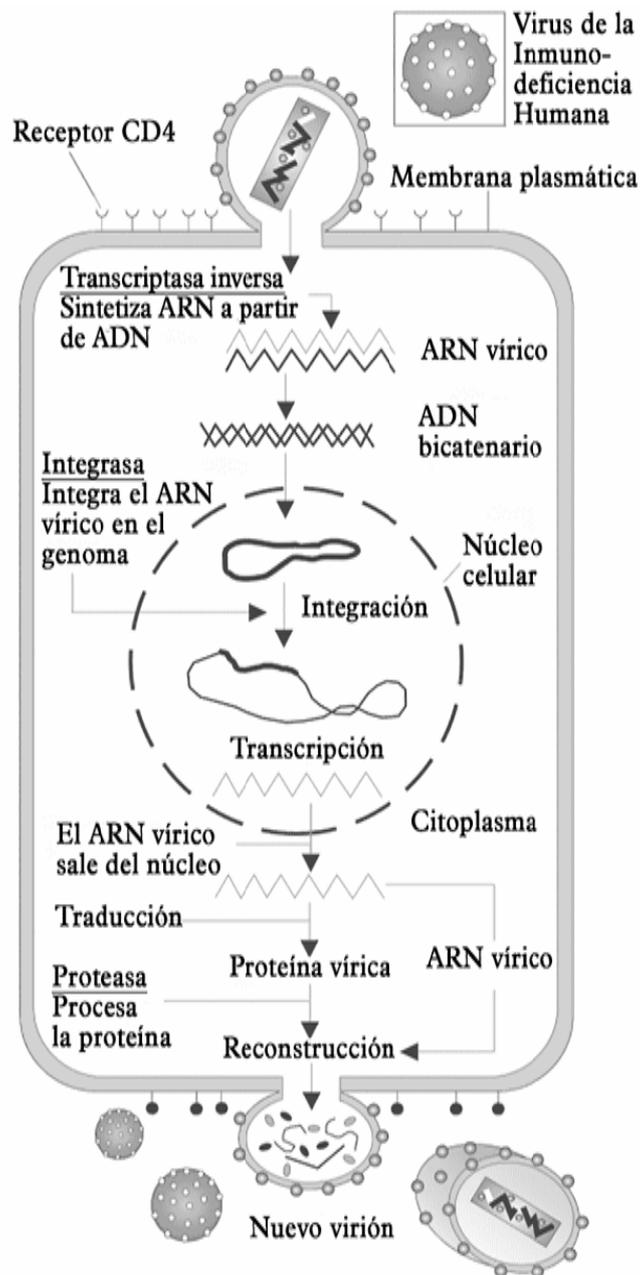


Figura 2.2. Ciclo de replicación del VIH (tomado de Sierra y cols., 2005).

Al infectarse una persona con el VIH, en la mayor parte de los casos se presentan síntomas parecidos a los de la gripe, proceso que se conoce como infección primaria. En esta etapa es cuando se puede identificar un mayor número de copias del ARN viral en la sangre debido a que aún no se produce una respuesta inmune para atacar al virus. Posteriormente hay producción de anticuerpos contra el VIH provocando una disminución en la cantidad de ARN y, por lo tanto, en la cantidad de virus en el plasma sanguíneo. Después de la infección primaria hay un periodo de latencia (etapa asintomática), en donde el virus principalmente se replica en los nodos linfáticos por lo que disminuye la detección de carga viral en el plasma sanguíneo y la cantidad de linfocitos T CD4 decrece progresivamente (Sierra y cols., 2005).

Al principio, el VIH tiende a infectar los macrófagos que expresan principalmente el correceptor CCR5 y posteriormente a los linfocitos T CD4 que expresan el correceptor CXCR4 (Sierra y cols., 2005) (figura 2.3).

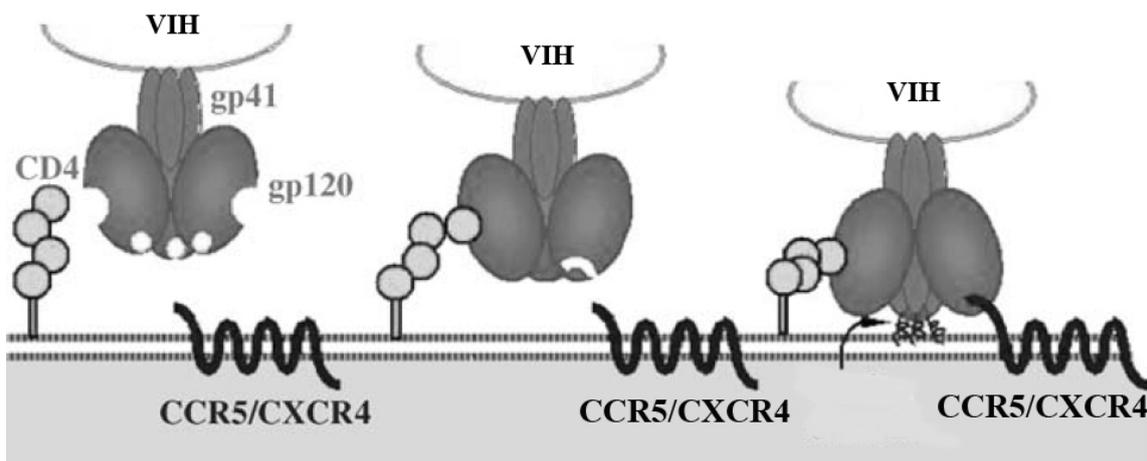


Figura 2.3. Se muestran los principales receptores a los que se une el VIH, (tomado de Sierra y cols., 2005).

Existen varias teorías que tratan de explicar cómo el VIH llega al cerebro, siendo la más aceptada la teoría del caballo de Troya (Toborek y cols., 2005; Kramer-Hämmerle y cols., 2005) en la cual se postula que células del sistema inmune, los macrófagos infectados, pueden pasar libremente la barrera hematoencefálica, llevando así el virus hacia el cerebro. Se ha mostrado que la invasión del cerebro por el VIH ocurre poco después de que una persona se infecta durante la etapa asintomática. Una vez que el virus se encuentra en el cerebro, éste no infecta a las neuronas, astrocitos, ni oligodendrocitos porque carecen del principal receptor para la infección, el CD4, aunque sí puede activar a otros receptores que expresan estas células como se describirá más adelante. Las células que si pueden infectarse y, por lo tanto, que el VIH ocupa para replicarse son los macrófagos y la microglía.

Como resumen podemos decir que el VIH infecta a macrófagos y linfocitos T periféricamente, y en el cerebro a macrófagos y microglía. Para que el virus pueda infectar a las células, éstas deben tener el receptor principal CD4 y al menos uno de los dos principales correceptores: el CXCR4 o el CCR5. El VIH pasa al sistema nervioso central a través de los macrófagos infectados que lo transmiten a la microglía. Por lo anterior, es importante entender el sistema de las quimiocinas y cómo actúan dentro del cerebro.

Capítulo 3. QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son proteínas con actividad quimioattractiva y activación de células inmunológicas y no inmunológicas. Estas proteínas contienen alrededor de 60 a 100 aminoácidos con una homología del 80 al 90% entre ellas. Su peso molecular varía de 8 a 14 kDa. Las quimiocinas se clasifican en cuatro familias según el número y posición del residuo de cisteína en la posición N terminal, las cuales son nombradas de acuerdo con su nomenclatura sistemática como CXC, CC, CX3C y C, en donde C es por cisteína y X puede ser cualquier otro aminoácido (tabla 3.1). Las quimiocinas activan a receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Banisadr y cols., 2005).

CXC o α quimiocinas. En las α quimiocinas, un aminoácido separa las dos primeras cisteínas residuales (cisteína- X aminoácido-cisteína, CXC). Las quimiocinas de esta familia son conocidas por quimioatraer a neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B y células asesinas naturales. Entre las α quimiocinas, los efectos del factor derivado de células del estroma (SDF-1, por sus siglas en inglés) han sido de los más estudiados en el cerebro. Dos isoformas de la proteína SDF-1 han sido caracterizados, SDF-1 α y SDF-1 β , aunque recientemente se ha caracterizado una tercera isoforma SDF-1 γ . El receptor para el SDF-1, el CXCR4, fue clonado a partir del cDNA de células del locus coeruleus y nombrado LCR1 por Locus Coeruleus Receptor 1. En 1996, diversos estudios mostraron que el receptor CXCR4 funciona como un correceptor para que el VIH pueda infectar a las células del sistema inmune (Oberlin y cols., 1996; Bleul y cols., 1996).

CC o β quimiocinas. En las beta quimiocinas, los primeros dos residuos de cisteínas están juntos entre sí. Miembros de esta familia atraen monocitos, macrófagos, basófilos, linfocitos T, eosinófilos y muy pobremente neutrófilos. Wu y cols. en 1996 mostraron que el VIH utiliza al receptor CCR5 como correceptor. Dos quimiocinas importantes

para este estudio son la quimiocina RANTES que se une al receptor CCR5 y la quimiocina MDC que se une al receptor CCR4.

CX3C o δ quimiocinas. En esta familia sólo existe un miembro: la fractalcina. Esta familia se caracteriza por la presencia de tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas. La fractalcina y su receptor CX3C están altamente expresados en el sistema nervioso central, por lo cual se sugiere una importante relación entre las neuronas y la microglía, ya que la mayor producción del ligando está en las neuronas y la mayor expresión del receptor está en la microglía (Banisadr y cols., 2005).

C o γ quimiocinas. Esta familia de quimiocinas se distingue porque estructuralmente sólo contiene dos de las cuatro cisteínas que presentan las demás quimiocinas. Como en la familia anterior, la linfotactina es el único miembro y es conocido por su función en la atracción de linfocitos T (Banisadr y cols., 2005).

LIGANDO (NOMBRE SISTEMÁTICO)	RECEPTOR
CC - β	
I309 (CCL1)	CCR8
MCP1 (CCL2)	CCR2, CCR11
MIP1 α (CCL3)	CCR1, CCR5
MIP1 β (CCL4)	CCR5, CCR8
RANTES (CCL5)	CCR1, CCR3, CCR4, CCR5
MuC10 (CCL6)	CCR1
MCP3 (CCL7)	CCR1, CCR2, CCR3
MCP2 (CCL8)	CCR1, CCR2, CCR5, CCR11
MIP-1 γ (CCL9)	CCR1
CCL10	No descrito
Eotaxin (CCL11)	CCR3
MCP5 (CCL12)	CCR2
MCP4 (CCL13)	CCR1, CCR2, CCR3, CCR11
HCC1 (CCL14)	CCR1
HCC2 (CCL15)	CCR1
HCC4 (CCL16)	CCR1
TARC (CCL17)	CCR4, CCR8
PARC (CCL18)	CCR3
ELC (CCL19)	CCR7
LARC (CCL20)	CCR6
SLC (CCL21)	CCR7

MDC (CCL22)	CCR4
MPIF1 (CCL23)	CCR1
Eotaxin-2 (CCL24)	CCR3
TECK (CCL25)	CCR9
Eotaxin-3 (CCL26)	CCR3
Eskine (CCL27)	CCR10
C-γ	
Lymphotactin (XCL1) XCR1	Lymphotactin (XCL1) XCR1
CXC-α	
GRO-α (CXCL1)	CXCR2
GRO-β (CXCL2)	CXCR2
GRO-γ (CXCL3)	CXCR2
PF4 (CXCL4)	CXCR3B
ENA78 (CXCL5)	CXCR2
GCP2 (CXCL6)	CXCR1, CXCR2
NAP2 (CXCL7)	CXCR2
IL8 (CXCL8)	CXCR1, CXCR2
Mig (CXCL9)	CXCR3
IP10 (CXCL10)	CXCR3
ITAC (CXCL11)	CXCR3
SDF1 (CXCL12)	CXCR4
BLC (CXCL13)	CXCR5
BRAK (CXCL14)	No descrito
Lungkine (CXCL15)	No descrito
SRPSOX (CXCL16)	CXCR6
CX3C o δ	
Fractalkine (CX3CL1)	CX3CR1

Tabla 3.1. Clasificación de las quimiocinas mostrando el ligando y su receptor (tomado de Banisadr y cols., 2005).

Actualmente, las quimiocinas han adquirido gran importancia debido a que diversos estudios que a continuación se mencionarán, han mostrado que están involucradas en la modulación de diversas conductas afectando directamente al cerebro, como se describe en los siguiente párrafos.

A través de inmunohistoquímica se encontró que la quimiocina SDF-1 se expresa en la corteza prefrontal y ganglios basales de cerebros humanos, tanto en neuronas como en astrocitos (Rostasy y cols., 2003). De igual manera, también se

mostró que el receptor CXCR4, al cual se une el SDF-1, se encuentra en el cerebro de humanos, y se expresa en neuronas del giro temporal superior, hipocampo, amígdala, circunvolución del cíngulo, tálamo, región pulvinar, ganglios basales, médula espinal y núcleo dentado del cerebelo (Van Der Meer y cols., 2000). En la rata también se mostró que el receptor CXCR4 se encuentra tanto en la microglía y astrocitos como en las neuronas y se expresa en neuronas colinérgicas del caudado-putamen y sustancia innominada, en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, en neuronas que expresan la hormona concentradora de melanina en el hipotálamo lateral y en neuronas vasopresinérgicas de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo (Banisadr y cols 2002, 2003). La administración de SDF-1 a rebanadas de cerebro de rata en donde se encuentra la sustancia negra, aumenta la frecuencia de disparo de este núcleo y la administración de SDF-1 en la sustancia negra de ratas en libre movimiento provoca un aumento de los niveles extracelulares de dopamina (Skrzydelski y cols., 2007). Por otro lado, hay estudios que muestran que la quimiocina SDF-1 promueve la sobrevivencia de cultivos de células ganglionares de la retina, siendo el efecto de sobrevivencia dosis dependiente, ya que a mayor dosis sobrevive un mayor número de células y además el efecto de sobrevivencia es bloqueado cuando se agrega un antagonista del receptor CXCR4. Por lo tanto, los investigadores concluyen que el efecto de SDF-1 es a través del receptor CXCR4 (Chalasani y cols., 2003). Ma y cols. (1998) mostraron que ratones deficientes, ya sea del receptor CXCR4 o del ligando SDF-1 mueren a los pocos días de nacer.

Plata-Salaman y Borkoski (1994) mostraron que la quimiocina RANTES, la cual se une al receptor CCR5, induce una disminución en la ingestión de alimento dentro de las dos horas siguientes a la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de 20 ng, ellos también observaron que este efecto depende de la dosis, ya que si se administra

una dosis menor (1 ng) o mayor (100 ng), ésta ya no induce cambios en la cantidad de alimento ingerido. Por otro lado, se ha mostrado que RANTES no produce cambios en el ciclo sueño-vigilia cuando es administrada en el ventrículo lateral del cerebro, pero si se administra otro ligando natural del receptor CCR5 como es MIP-1 α y MIP-1 β provoca un aumento en el sueño de ondas lentas y fragmenta el sueño en general (Hogan y cols., 2001). Bakhiet y cols. (2001) mostraron que ésta quimiocina promueve la sobrevivencia de astrocitos en los primeros tres meses de vida en humanos, pero si se bloquea el receptor CCR5 con un antagonista, el efecto desaparece. Varios trabajos también han mostrado que el receptor CCR5 y RANTES se expresan en neuronas (Boutet y cols., 2001; Bakhiet y cols., 2001; Valerio y cols., 2004).

Se ha reportado que la activación de receptores como el CCR2, CCR5, CCR7 y el CXCR4 produce una desensibilización de los receptores μ y δ opioides, produciendo hiperalgesia y conjuntamente una sensibilización de los receptores a vaniloides 1 (TRPV1) que ayudan a detectar estímulos dolorosos y calor (Zhang y Oppenheim, 2005; Abbadie, 2005).

Otros estudios también han encontrado que la quimiocina derivada de macrófagos (MDC, por sus siglas en inglés) ha sido efectiva para prevenir la infección del VIH a linfocitos T (Pal y cols., 1997, Benhur y cols., 1998; Cota y cols., 2000).

Con estos datos se tiene evidencia de que las quimiocinas poseen una función importante en la regulación del cerebro, tanto para que el sistema nervioso se desarrolle, como en diversas funciones que involucran la modulación de conductas esenciales para la sobrevivencia: comer, dormir y sentir dolor. En la siguiente sección se analiza la evidencia que indica como una proteína del VIH es la potencial responsable del daño producido en el cerebro y la manera como está actuando.

Capítulo 4: MODELOS ANIMALES DE DEMENCIA ASOCIADA AL VIH.

Como se ha mencionado, exactamente no se sabe cuál es el mecanismo por el cual el VIH infecta al cerebro. Sin embargo, hay evidencia de que una proteína del virus está involucrada en la neurodegeneración del sistema nervioso como a continuación se mostrará. Estudios postmortem han revelado la presencia del virus en cerebros de pacientes que presentaron demencia asociada al VIH (Buzy y cols., 1989). En ratones transgénicos, a los cuales se les introduce el gen que codifica para la gp120 y empiezan a producirla en grandes cantidades, se encontró que había una disminución de alrededor del 40% de las neuronas de la corteza cerebral y también la cantidad de sinapsis disminuyó por lo que los ratones tuvieron una sobrevivencia corta (Toggas y cols., 1994). La administración sistémica de gp120 a ratas en el período neonatal causa que la longitud y la cantidad de las dendritas sea menor a las de grupo control (Hill y cols., 1993). Brenneman y cols. (1988) realizaron un experimento en cultivos hipocampales de rata a los cuales agregaron diferentes tipos de gp120 (recombinante, gp120 IIIB y gp120RF2), el virus sin la gp120 o gp160, encontrando que la cantidad de células disminuyó únicamente en los cultivos a los cuales se les agregó gp120, en los cultivos en donde se agregó el virus sin gp120 o sin gp160 no se encontró muerte celular. Con su hallazgo, éstos investigadores propusieron que la gp120 era la posible responsable de la muerte celular así como de las alteraciones neurológicas y conductuales que presentan los pacientes infectados con el VIH (Brenneman y cols., 1988). Diversos estudios han mostrado que la administración i.c.v. de gp120 a ratas (100 ng) durante varios días consecutivos (7 o 14) induce muerte por apoptosis (Bageeta y cols., 1995; Montes-Rodríguez y cols., 2004), pero si previamente a la administración de gp120 se administra RANTES o MIP-1 β (ligandos naturales del receptor a quimiocinas CCR5) se

puede prevenir la apoptosis (Meucci y cols., 1998; Kaul y Lipton, 1999). Por otro lado, si previamente se administra SDF-1 α , (que es el ligando natural del receptor a quimiocinas CXCR4) dependiendo de la dosis se puede prevenir la apoptosis o inducirla por sí misma (Corasaniti y cols., 2001). Adicionalmente, sí se bloquea el receptor CXCR4 con un antagonista (AMD3100) previo a la administración de gp120, se puede prevenir la muerte celular (Bachis y Mochetti, 2004). Estos experimentos sustentan al menos dos conceptos: 1) que los receptores CCR5 y CXCR4 están mediando al menos en parte los efectos tóxicos de la gp120, y 2) que en condiciones normales, las quimiocinas arriba mencionadas participan en la regulación de procesos cognoscitivos.

Como se mencionó en el capítulo 1, los pacientes infectados con el VIH pueden mostrar un cuadro de demencia. También se dijo que potencialmente una glucoproteína del virus, la gp120, es la responsable de causar la muerte celular en el cerebro. En la siguiente sección se presenta amplia evidencia relacionada a que esta proteína también está involucrada en el deterioro de distintas conductas.

Estudios previos (Sánchez-Alavés y cols., 2000) mostraron que la administración diaria de 140 ng de gp120 durante 5 días induce un deterioro en la ejecución de tareas espaciales y de procedimiento, por ejemplo en el laberinto de Barnes, donde la rata tiene que encontrar una salida y lo puede hacer de tres maneras: aleatoriamente, de forma serial o de forma espacial, siendo esta última la estrategia más eficiente. En esta prueba, las ratas tratadas con gp120 utilizan la forma aleatoria para resolver el laberinto, tardan más tiempo en encontrar la salida y la distancia que recorren para encontrarla es mayor respecto al grupo control, mostrando un deterioro en la memoria (Sánchez-Alavés y cols., 2000). Al inducir potenciación de largo plazo (modelo electrofisiológico de aprendizaje) en ratas bajo el mismo esquema de tratamiento, se encontró que la amplitud de las espigas poblacionales era menor durante

el tiempo que se registró tanto *in vivo* (Sánchez- Alavés y cols., 2000) como en rebanadas (Dong y Xiong, 2006). Utilizando el paradigma del condicionamiento al miedo por contexto en ratas, hubo un deterioro inducido por la administración de gp120, a dosis de 4, 6 y 8 μg posterior al entrenamiento, debido a que éstas mostraron menor tiempo de congelamiento (Pugh y cols., 2000), pero esto no ocurre en el condicionamiento por clave, en donde las ratas no mostraron cambios respecto al grupo control, lo cual indica que el deterioro inducido por la gp120 está ocurriendo a nivel del hipocampo y no de la amígdala (Pugh y cols., 2000). De igual forma, ratas pre-tratadas diariamente durante una semana con dosis de 1.2 y 12 ng de gp120 exhibieron un deterioro en la prueba del laberinto acuático de Morris, ya que necesitaron el doble de tiempo para encontrar la plataforma sumergida respecto al grupo control (Glowa y cols., 1992). El ciclo sueño-vigilia de ratas tratadas con gp120 también se vio afectado debido a que el sueño de ondas lentas 1 se mantuvo alto a lo largo del ciclo y el sueño de ondas lentas 2 junto con el sueño de movimientos oculares rápidos disminuyó (Díaz-Ruiz y cols., 2001). De igual forma la actividad locomotora espontánea fue disminuyendo conforme iba avanzando el tratamiento (Sánchez-Alavés y cols., 2000). Así mismo, los potenciales relacionados a eventos generados por un paradigma de *od ball* auditivo se vieron afectados por la administración de gp120 dado que la amplitud del componente P3 disminuyó respecto al control 24 horas después de la última administración y en mediciones posteriores de 7, 14 y 21 días los componentes N2 y P2 desaparecieron manteniéndose únicamente el componente N1 (Galicia y cols., 2000).

Opp y cols. (1996), mostraron que la administración única de gp120 en ratas afecta el sueño dependiendo de la dosis, ya que a dosis bajas (20 ng) no hay cambios respecto al control, a dosis de 100 ng hay un aumento del SOL y del SMOR durante las primeras 4 horas de registro y una disminución de estas etapas entre la hora 8 y 12; por

otro lado, a dosis altas (500 ng) sólo tuvieron efecto durante las primeras horas de registro provocando un aumento del SOL (Opp y cols., 1996).

De la misma manera, la administración i.c.v. en ratas de 1 µg de gp120 produjo una reducción significativa en el consumo de alimento y en el peso corporal hasta por 24 horas después de la administración, el consumo de agua no se afectó, pero la ingesta de sacarina disminuyó y la actividad locomotora también se vio alterada (Barak y cols., 2002a, 2002b). La administración intraperitoneal de gp120 (2µg) no tuvo efectos significativos respecto al control, lo que indicaría que los efectos neurotóxicos se presentan únicamente cuando se administra directamente en el sistema nervioso central y no periféricamente (Barak y cols., 2002a, 2002b). Por otro lado, la administración periférica de gp120 intratecalmente o en una pata, induce hipersensibilidad al dolor y/o alodinia, que se refiere a cuando un estímulo que no producía dolor normalmente ahora sí lo provoca (Milligan y cols., 2000; Oh y cols., 2001).

Como se mencionó anteriormente el VIH no infecta a las neuronas, pero al parecer está provocando su muerte, por lo cual se han surgido diferentes explicaciones sobre los mecanismos involucrados en la inducción de ésta.

Al infectar el VIH a una célula, su envoltura membranal en donde se encuentra la gp120 queda fuera de la célula, la cual se vuelve soluble por lo que puede viajar extracelularmente y activar receptores a quimiocinas como el CCR5 y CXCR4 e incluso receptores a glutamato directamente en las neuronas provocando un aumento de las corrientes de calcio (Pattarini y cols., 1998). Brenneman y cols. (1988) han demostrado que la gp120 también interacciona con los receptores del péptido intestinal vasoactivo (VIP), de hecho se ha determinado una secuencia de ésta que es parecida al VIP.

La activación de macrófagos o microglía induce la liberación de sustancias excitotóxicas que producen una activación excesiva de receptores NMDA (Kaul y cols.,

2001). También se liberan citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF- α por sus siglas en inglés), ácido quinolínico, quimiocinas, radicales libres y ácido araquidónico. Todas estas sustancias pueden provocar daño neuronal a nivel de la sinapsis o dendritas y finalmente apoptosis (Kaul y cols., 2001) (figura 4.1).

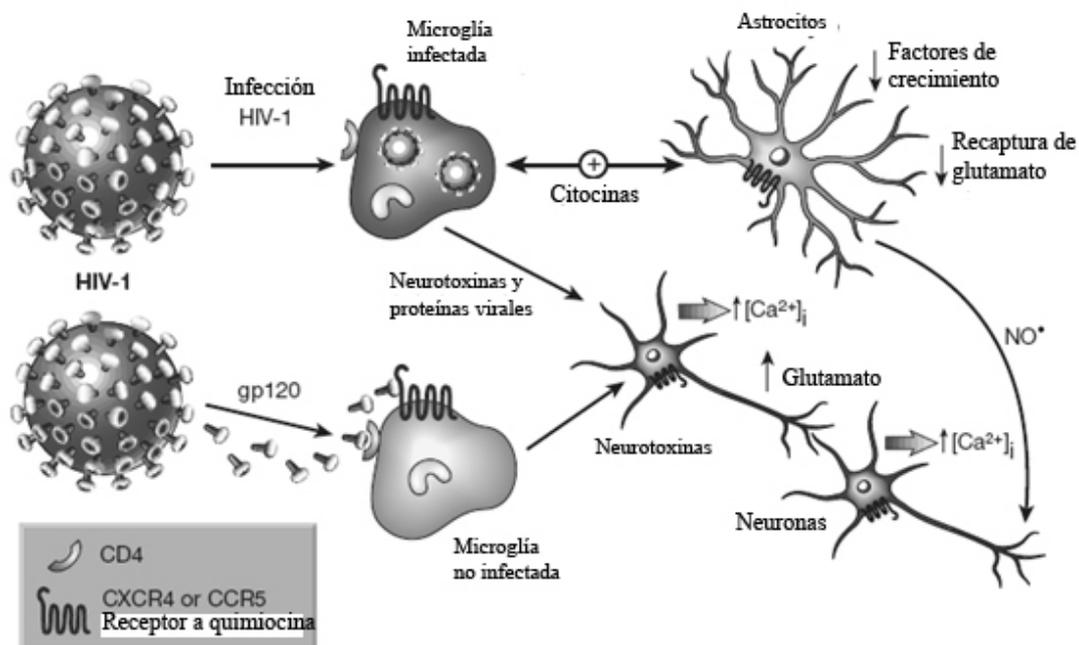


Figura 4.1. Posible vía por la cual el VIH induce daño neuronal (tomado de Kaul y cols., 2001).

La recaptura de glutamato por astrocitos puede ser reducida por las sustancias liberadas por la microglía, lo cual hace que haya más glutamato disponible a nivel extracelular.

Estos datos proporcionan evidencia sólida de que la gp120 está induciendo daño neuronal, ya sea de forma directa activando receptores a quimiocinas o glutamato, o indirectamente a través de la microglía y astrocitos induciendo la liberación y producción de sustancias que en altas concentraciones llegan a ser tóxicas como

citocinas, quimiocinas, radicales libres, ácido araquidónico y quinolínico. También la gp120 está produciendo alteraciones conductuales, lo cual indica que es una fuerte candidata para ser la responsable del deterioro al sistema nervioso.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Objetivo general.

Observar si las quimiocinas RANTES, MDC y SDF1 α disminuyen o bloquean los efectos de la gp120 en distintas conductas.

Hipótesis.

Las quimiocinas RANTES, MDC y SDF-1 α previenen la disminución en la ingesta de alimento y agua inducidas por la HIVgp120 en ratas.

Las quimiocinas RANTES, MDC y SDF-1 α previenen la disminución en el umbral al dolor inducida por la HIVgp120 en ratas.

Las quimiocinas RANTES, MDC y SDF-1 α previenen el daño en la conducta motora inducida por la HIVgp120 en ratas.

Las quimiocinas RANTES, MDC y SDF-1 α previenen la reducción en el sueño inducida por la HIVgp120 en ratas.

Objetivos particulares.

- Observar si la gp120 reduce la ingestión de alimento y agua y las quimiocinas RANTES, MDC y SDF-1 α previenen esta reducción.
- Observar si la gp120 disminuye el umbral al dolor y las quimiocinas RANTES, MDC y SDF-1 α previenen dicho cambio.
- Observar si la gp120 altera el control motor y las quimiocinas RANTES, MDC y SDF-1 α previenen este efecto.
- Observar si la gp120 reduce el sueño y que dicha alteración es prevenida por las quimiocinas RANTES, MDC y SDF-1 α .

MÉTODO:

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 a 280 g al inicio del experimento. Todas las ratas se alojaron en cajas individuales con agua y comida (Ratchow, Purina) *ad libitum*, en condiciones constantes de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) y humedad en una habitación con un ciclo de luz-oscuridad 12/12, encendiéndose la luz a las 08:00 hrs.

Para un mejor manejo de las variables, los experimentos se dividieron en dos fases: en el experimento 1 se incluyó la medición de la ingestión de alimento y agua, peso corporal, control motor y percepción del dolor. En el experimento 2 se obtuvo el electroencefalograma (EEG) de la actividad cerebral.

EXPERIMENTO 1. INGESTIÓN DE ALIMENTO, INGESTIÓN DE AGUA, PESO CORPORAL, PERCEPCIÓN DEL DOLOR y CONTROL MOTOR.

Para poder administrar directamente los fármacos al cerebro, ochenta ratas fueron sometidas a cirugía bajo 1 ml de anestesia administrada intraperitonealmente (Ketamina 25%, Rompun 5%, Calvimet 10%, Solución Salina 60%), para implantarles una cánula guía (23G) de acero inoxidable en el ventrículo lateral izquierdo (posterior (p): 0.8, lateral (l): 1.5, ventral (v): -3.8) (Paxinos and Watson, 1986). Se dieron siete días de recuperación posquirúrgica. Después de la recuperación las ratas se dividieron aleatoriamente en ocho grupos ($n = 10$) que recibieron uno de los siguientes tratamientos:

Grupo 1: PBS (Phosphates Buffer and saline) 2.5 μl por día.

Grupo 2: VIH IIBgp120 (glucoproteína 120 del Virus de Inmuno Deficiencia Humana) (total: 560 ng. 112 ng/2.5 µl por día).

Grupo 3: RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) (total: 40 ng. 8 ng/2.5 µl por día).

Grupo 4: SDF-1 α (Stromal Cell-Derived Factor 1 Alpha) (total 40 ng 8 ng/2.5 µl por día).

Grupo 5: MDC (Macrophage-Derived Chemokine) (total: 40 ng 8 ng/2.5 µl por día).

Grupo 6: RANTES + VIHgp120.

Grupo 7: MDC + VIHgp120.

Grupo 8: SDF-1 α + VIHgp120.

Administración. A las ratas se les administró el tratamiento correspondiente a través de la cánula guía con una bomba de infusión (KDscientific) a una velocidad de 1µl/min durante cinco días consecutivos a las 20:00 hrs.

Ingesta de alimento y agua. El alimento y el agua consumidos fueron medidos 24 horas después de cada administración así como 48 y 72 horas después de la última infusión, esto último para determinar si el efecto de los fármacos persistía a través del tiempo.

Peso corporal. Para evaluar si había variaciones en el peso corporal al final del experimento, las ratas fueron pesadas antes de la primera administración y después de la última medición de alimento, que fue hecha 72 horas después de la última infusión.

Adicionalmente a las ochenta ratas se les hicieron dos pruebas, una de ellas para medir la percepción del dolor y la otra para medir el control motor.

Percepción al dolor. Para esta prueba se usó el sistema de plancha caliente (Socrel, Mod. DS35).

La prueba consiste en poner a las ratas sobre la plancha caliente de acero inoxidable que se calienta a una temperatura constante de 55° C y se cuenta el tiempo a partir del momento en que se colocan en la plancha hasta que comienzan a lamerse las patas. Las ratas fueron probadas 48 horas después de la última administración de los fármacos (figura 6.1).

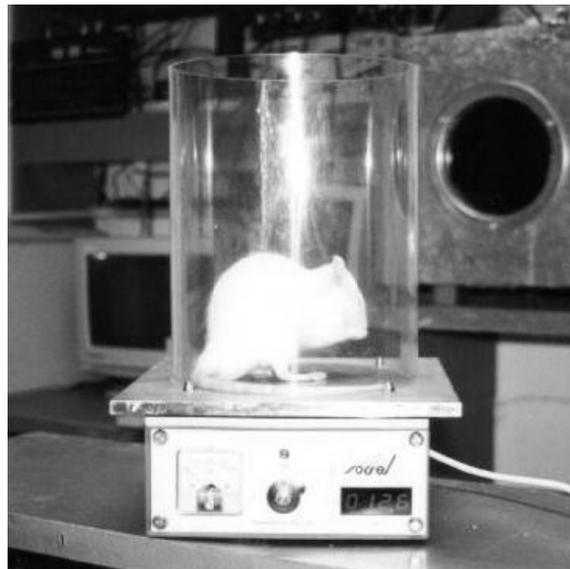


Figura 6.1. Se muestra a una rata en la plancha caliente.

Control motor. Fue usado el sistema de Rota Rod Ugo basile (Jones & Roberts) para ratas. Quienes fueron probadas 48 horas después de la última administración. Para ello se coloca a la rata sobre el tubo estático durante 60 segundos para habituarla a quedarse en ese lugar, al término de este tiempo se regresa a su caja y se le deja reposar 60 segundos. Posteriormente se coloca nuevamente a la rata sobre el tubo pero esta vez en

movimiento a una velocidad de 2 rpm, la cual va aumentando 1.5 rpm cada 30 segundos hasta alcanzar una velocidad máxima de 13 rpm. El parámetro a medir es el tiempo desde que se coloca a la rata en el tubo con la velocidad más baja y hasta que la rata cae del tubo en movimiento (figura 6.2).

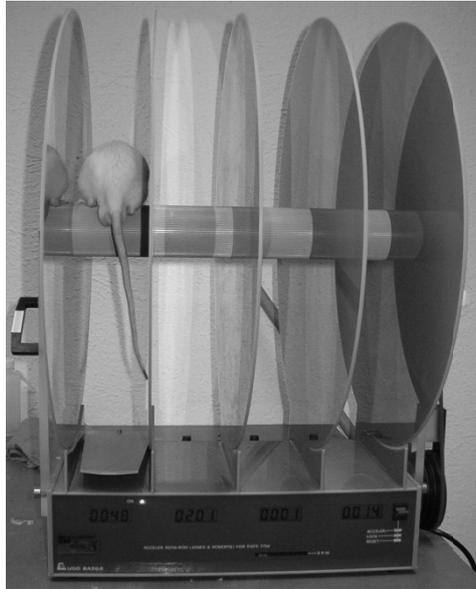


Figura 6.2. Se muestra a una rata en el rota rod.

EXPERIMENTO 2. REGISTROS DE EEG.

Para observar si hubo cambios inducidos por la gp120 en la actividad eléctrica cerebral se hicieron registros de la actividad del cerebro a cuarenta y ocho ratas distintas a las del experimento 1. A estas se les implantó bajo anestesia dos electrodos hipocampales (P -4.0, L -2.5, V -2.5) (Paxinos y Watson, 1986) para el electroencefalograma (EEG), dos electrodos en los músculos posteriores del cuello para el registro del electromiograma (EMG), un electrodo de tierra en la superficie del cráneo frontal y una cánula de acero inoxidable dirigida al ventrículo lateral izquierdo del cerebro (figura 6.3). Se dejaron a las ratas siete días en recuperación postquirúrgica antes de iniciar los experimentos.



Figura 6.3: Ejemplo de la cirugía estereotáxica para la implantación de los electrodos y la cánula guía.

Los EEG se realizaron en una habitación sonoamortiguada en cámaras de registro individuales a través de un polígrafo digital (Nihon Kohden, neurotop MME 3116k). Éste amplifica la señal y la lleva a una computadora que la digitaliza y guarda por medio de una tarjeta analógico/digital (National Instruments) con un programa llamado Icelus (Gsystems). Los filtros usados para el EEG fueron de 1Hz para las frecuencias bajas y 35 Hz para las frecuencias altas, los filtros utilizados para el EMG fueron de 30 Hz para las frecuencias bajas y 100 Hz para las frecuencias altas. Los EEG se calificaron por épocas de 12 segundos tomando en cuenta tres estados de actividad que fueron: vigilia, SOL y sueño MOR (figura 6.4).

Las ratas se dividieron aleatoriamente en los mismos grupos explicados en el experimento 1, contando cada grupo con una $n = 6$.

A las ratas se les administró el tratamiento correspondiente bajo el mismo esquema del experimento 1 durante cinco días a las 20:00 hrs.

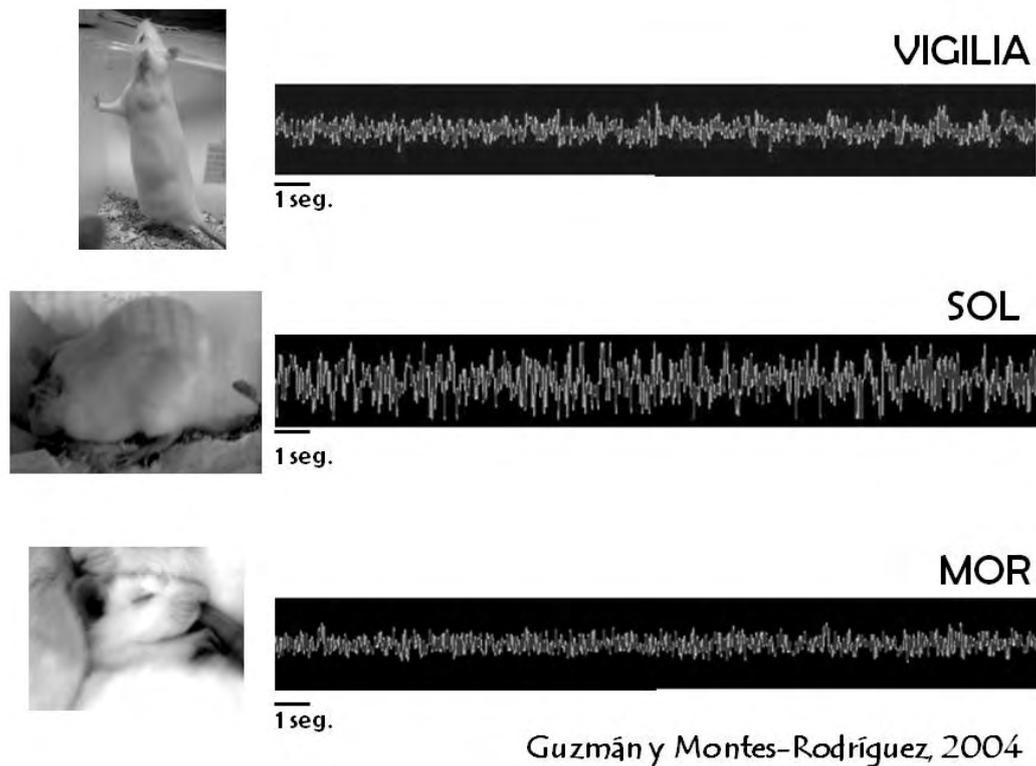


Figura 6.4. Se muestran los estados del ciclo sueño-vigilia que se tomaron en cuenta para calificar los EEG.

Se hicieron dos registros de la actividad eléctrica cerebral de 12 horas cada uno. Las ratas se habituaron al sistema de registro 24 horas continuas antes de realizarse éstos. El primer registro se hizo inmediatamente después de la primera dosis administrada y el segundo registro se hizo 24 horas después de la última administración.

Histología. Todas las ratas fueron perfundidas (PBS 0.01 mM, paraformaldehído 4.0%) para extraer los cerebros. Estos se cortaron y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina para la verificación de la posición de la cánula.

Análisis estadístico. Se empleó un análisis de varianza de una vía y una prueba de LSD como prueba post hoc para comparar los grupos experimentales y control, y establecer

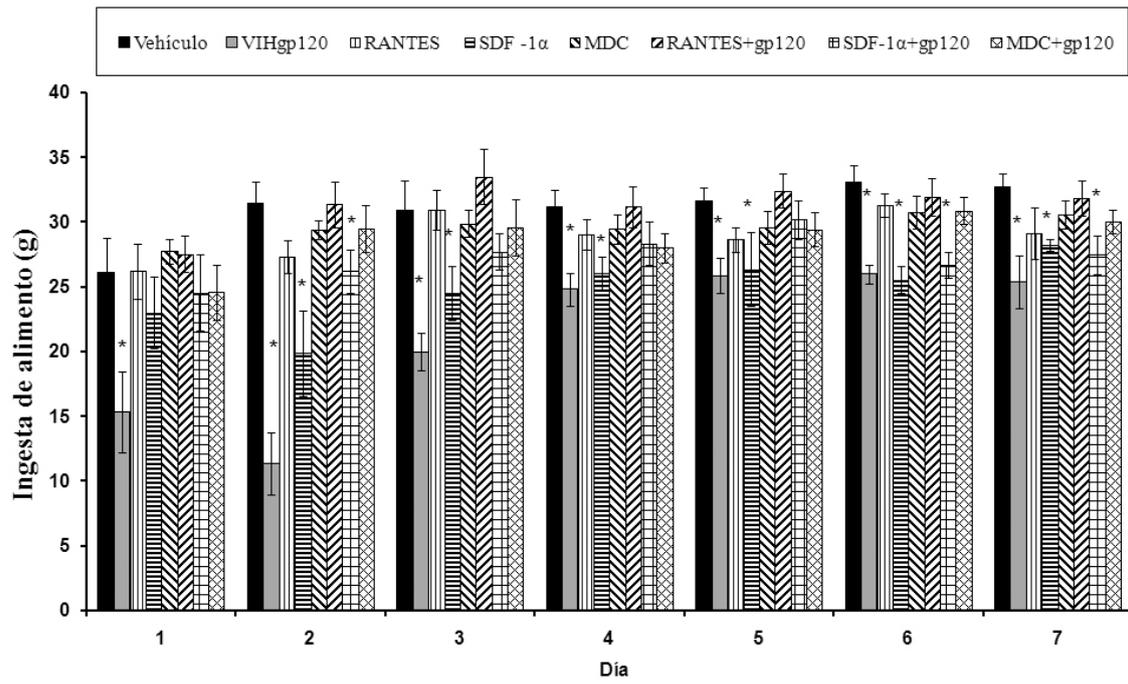
las diferencias estadísticamente significativas. Se consideraron significativos los resultados con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

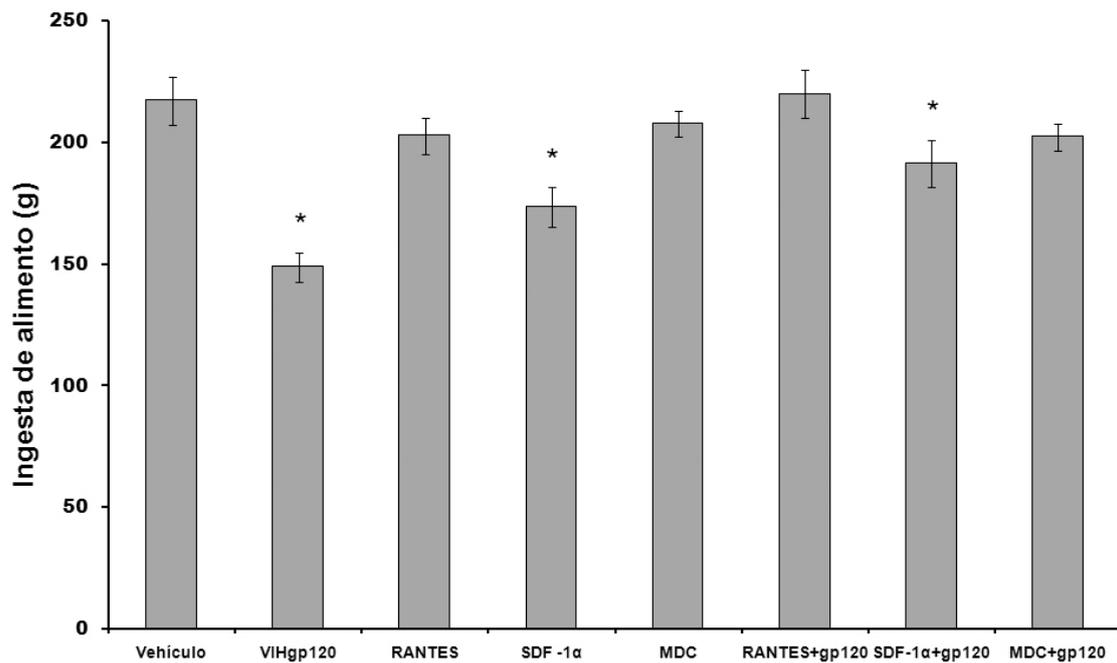
EXPERIMENTO 1.

Ingestión de alimento. El grupo de ratas tratado con VIHgp120 mostró una caída en la ingestión de alimento respecto al grupo control a lo largo de los siete días que se midió la cantidad de alimento que consumían (gráfica 1). El grupo de SDF-1 α mostró una caída en la ingestión a partir del segundo día de administración y se mantuvo bajo hasta el último día de medición. El grupo que recibió la combinación de VIHgp120 y SDF-1 α sólo mostró una disminución en los días dos, seis y siete. Los grupos a los que se les administraron las quimiocinas RANTES y MDC no mostraron cambios significativos respecto al control a lo largo de los siete días. De igual forma, la combinación de estas quimiocinas con la VIHgp120 tampoco mostró cambios en la ingesta. Al hacer una suma de todo el alimento ingerido a lo largo de los siete días de experimento se observó que la VIHgp120 indujo una caída significativa en el consumo al igual que SDF-1 α , a diferencia de RANTES y MDC que no produjeron ningún cambio respecto al control. La combinación de RANTES+VIHgp120 y MDC+VIHgp120 tampoco mostraron ningún cambio, pero la combinación de SDF-1 α y VIHgp120 presentó una caída significativa en la ingesta de alimento (gráfica 2).

Estos resultados indican que RANTES y MDC previenen la caída en la ingesta inducida por la VIHgp120 y que administrados de manera independiente no inducen cambios, a diferencia de la quimiocina SDF-1 α que por sí sola induce una disminución en la ingesta de alimento y al combinarse con la VIHgp120 no previene este efecto.



Gráfica 1. Media y error estándar de la cantidad de alimento ingerido por día durante los siete días de experimento (*p < 0.05 vs el grupo vehículo).

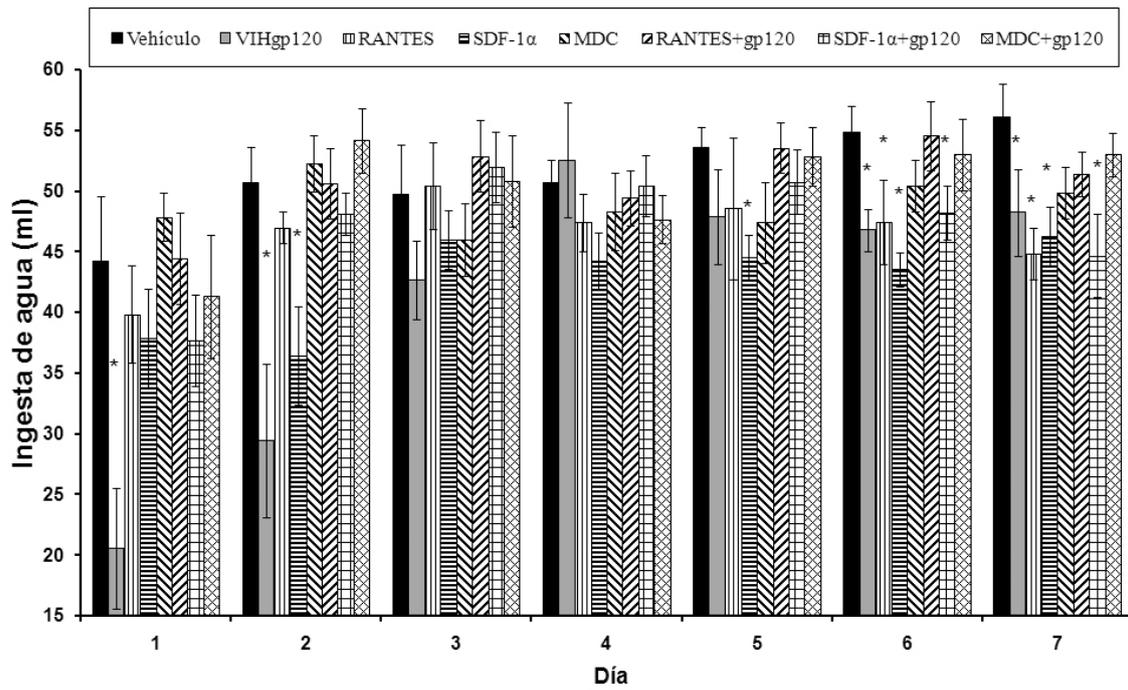


Gráfica 2. Media y error estándar del total del alimento ingerido durante los siete días del experimento (*p < 0.05 vs el grupo vehículo).

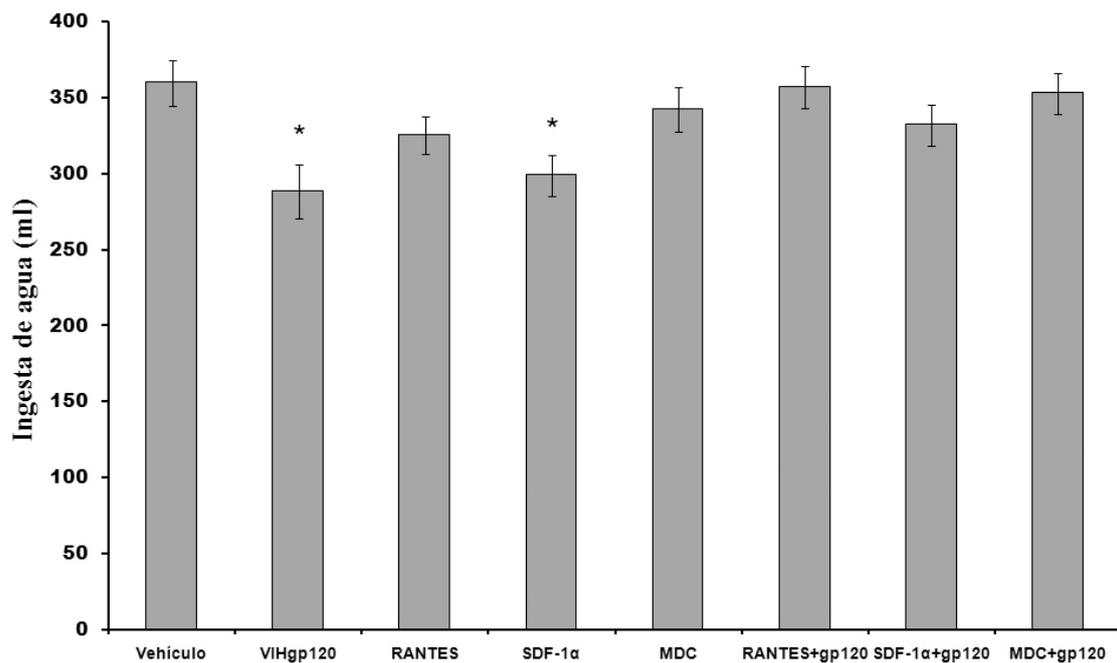
Ingesta de agua. Respecto al grupo control, la VIHgp120 mostró una caída significativa en los días 1, 2, 6 y 7 (gráfica 3), RANTES expuso una caída únicamente los días 6 y 7, SDF-1 α mostró una disminución los días 2, 5, 6 y 7 y MDC no mostró cambios a lo largo de los siete días del experimento. De igual forma que en la ingesta de alimento, RANTES y MDC previeron la disminución de la ingesta cuando se combinó con la VIHgp120 y la combinación de SDF-1 α con VIHgp120 no evidenció cambios en los 5 días de administración, pero los días 6 y 7 mostraron una caída respecto al control (gráfica 3). Haciendo un análisis de la suma del agua consumida durante los siete días del experimento se observó que únicamente la VIHgp120 y SDF-1 α mostraron una disminución significativa en la ingesta de agua, mientras que RANTES, MDC y la combinación de RANTES+VIHgp120, MDC+VIHgp120 y SDF-1 α +VIHgp120 no manifestaron diferencias significativas (gráfica 4).

Peso corporal. Las ratas tratadas con VIHgp120 y SDF-1 α mostraron una caída significativa en el peso corporal respecto al grupo control. Las ratas tratadas con RANTES, MDC y las combinaciones de RANTES+VIHgp120, SDF-1 α +VIHgp120 y MDC+VIHgp120 no mostraron ninguna diferencia en el peso (gráfica 5).

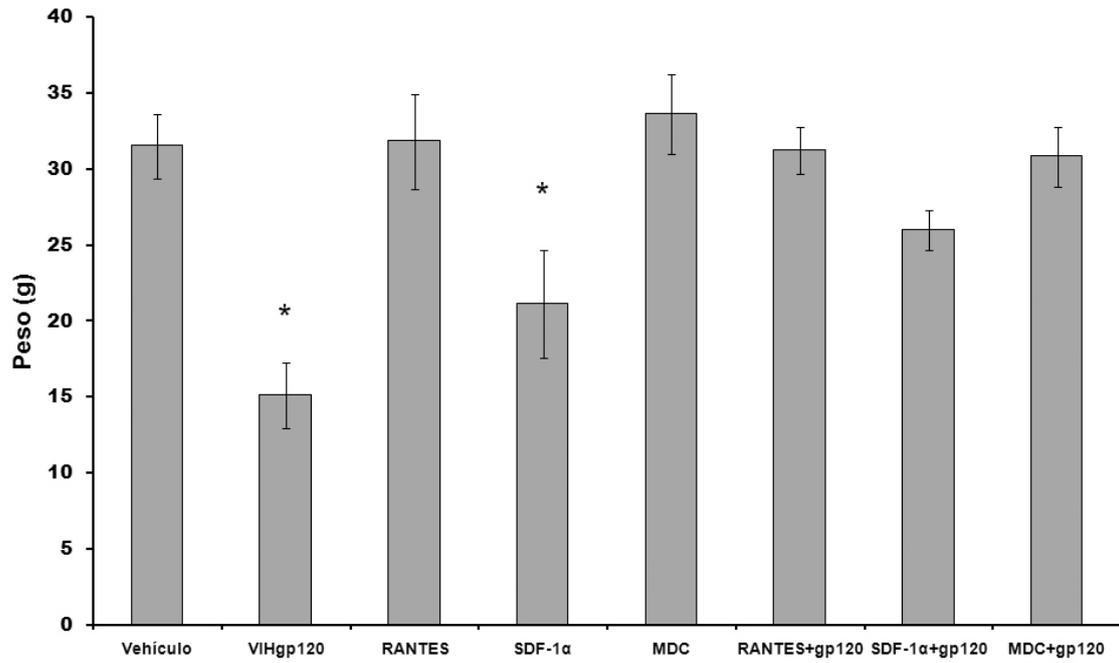
Percepción del dolor. Los resultados encontrados en la prueba de la plancha caliente fueron los siguientes: las ratas tratadas con SDF-1 α y las combinaciones de RANTES+VIHgp120 y SDF-1 α +VIHgp120 mostraron un aumento en la percepción del dolor, ya que tuvieron una latencia menor con respecto al control; los demás grupos no mostraron ningún cambio significativo respecto al grupo control (gráfica 6).



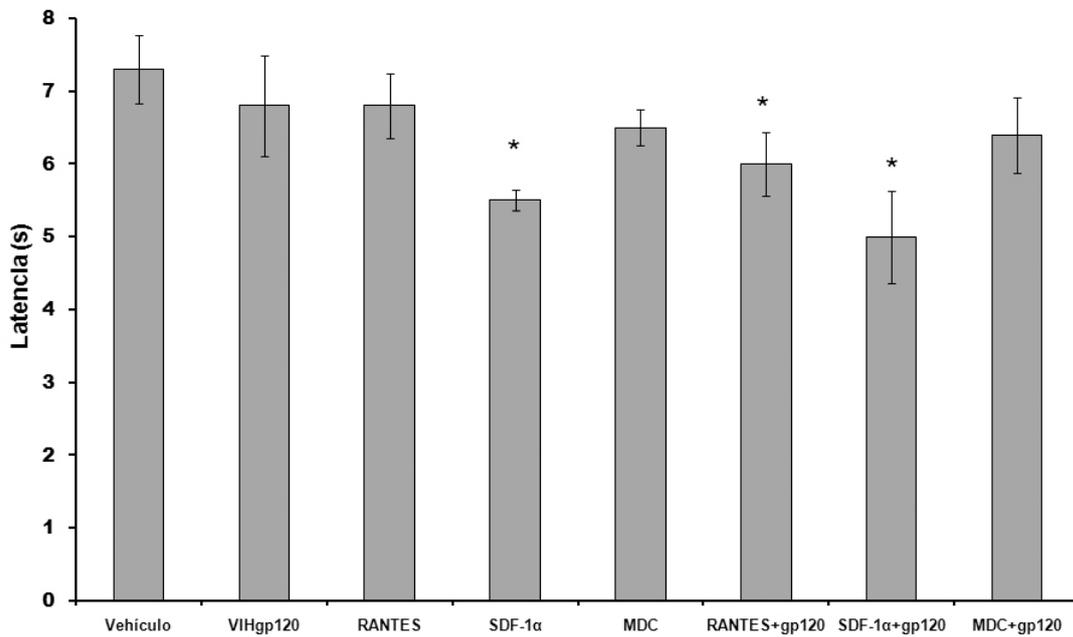
Gráfica 3. Media y error estándar de la cantidad de agua ingerida por día a lo largo de los siete días del experimento (* $p < 0.05$ vs el grupo vehículo).



Gráfica 4. Media y error estándar del total de agua consumida en los siete días de experimento (* $p < 0.05$ vs el grupo vehículo).

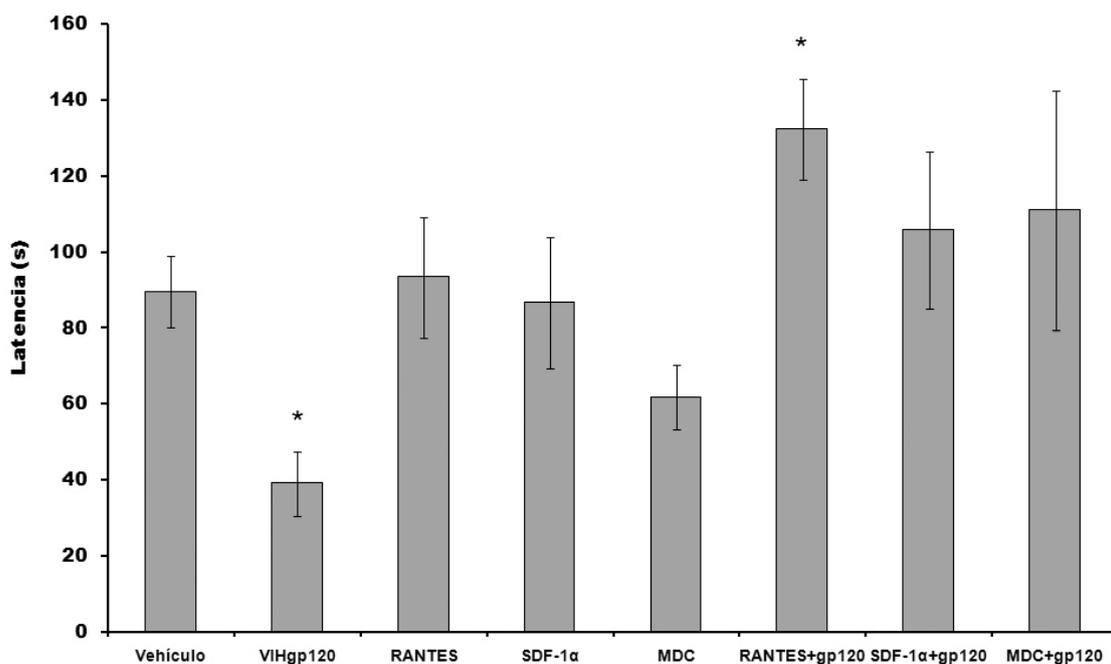


Gráfica 5. Media y error estándar del incremento del peso de las ratas del primer día al día siete (* $p < 0.05$ vs grupo vehículo).



Gráfica 6. Media y error estándar de la latencia para mostrar signos de dolor (* $p < 0.05$ vs grupo vehículo).

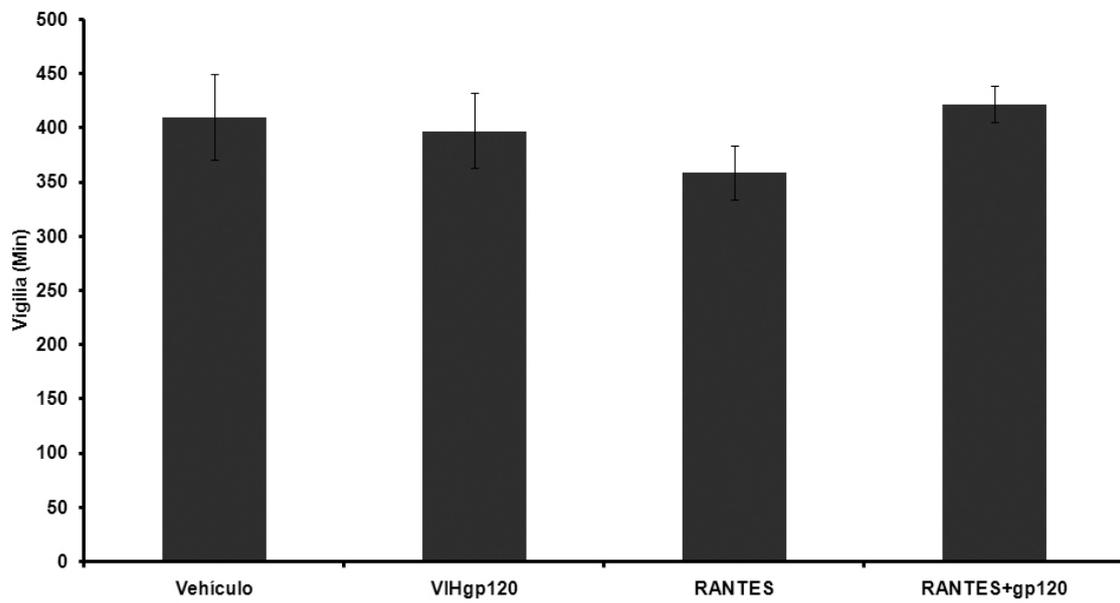
Control motor. Lo que se encontró en esta prueba fue que las ratas tratadas con VIHgp120 caían rápidamente del tubo en movimiento y que al combinarse la gp120 con cualquiera de las quimiocinas se podía prevenir esta pobre ejecución. Las demás ratas tratadas con los fármacos no mostraron ninguna alteración respecto al grupo control (gráfica 7).



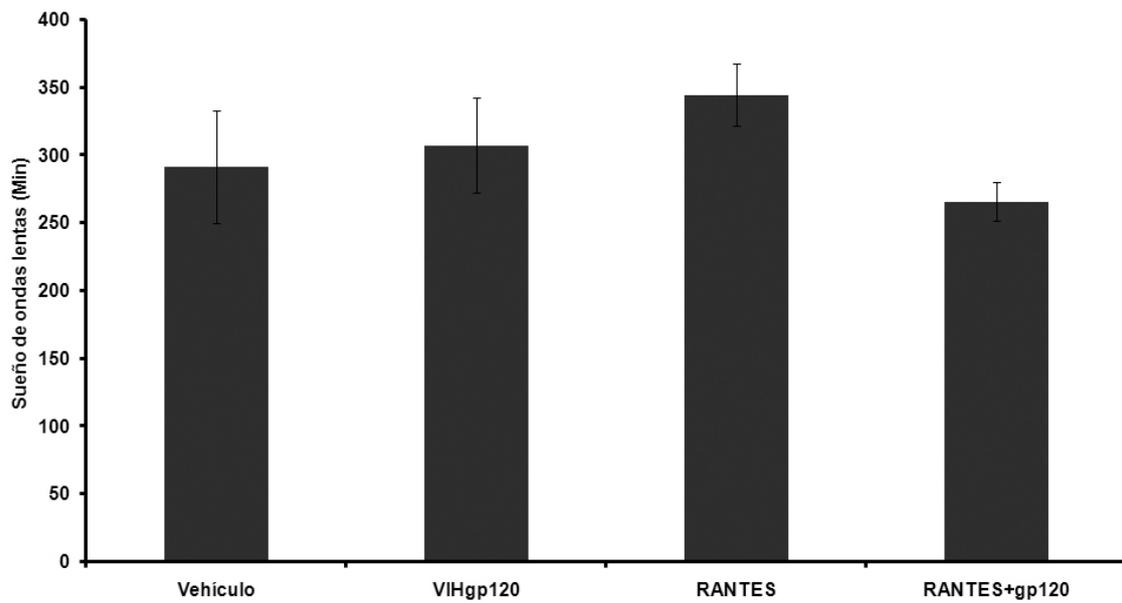
Gráfica 7. Media y error estándar del tiempo que tarda en caer la rata del tubo (* $p < 0.05$).

EXPERIMENTO 2

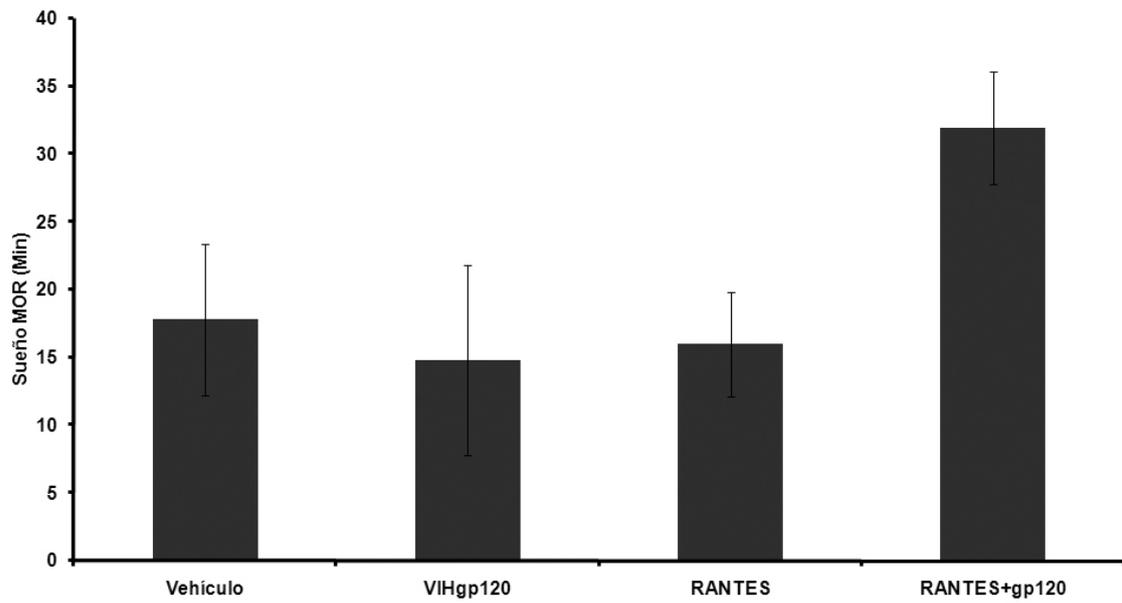
El primer registro de la actividad cerebral se realizó inmediatamente después de la primera administración del fármaco. Los resultados del primer EEG mostraron que no hubo diferencias entre los grupos experimentales y el grupo control (gráficas 8, 9, y 10). El segundo registro se realizó 24 horas después de la última administración del fármaco, y de igual forma tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control (gráficas 11, 12 y 13).



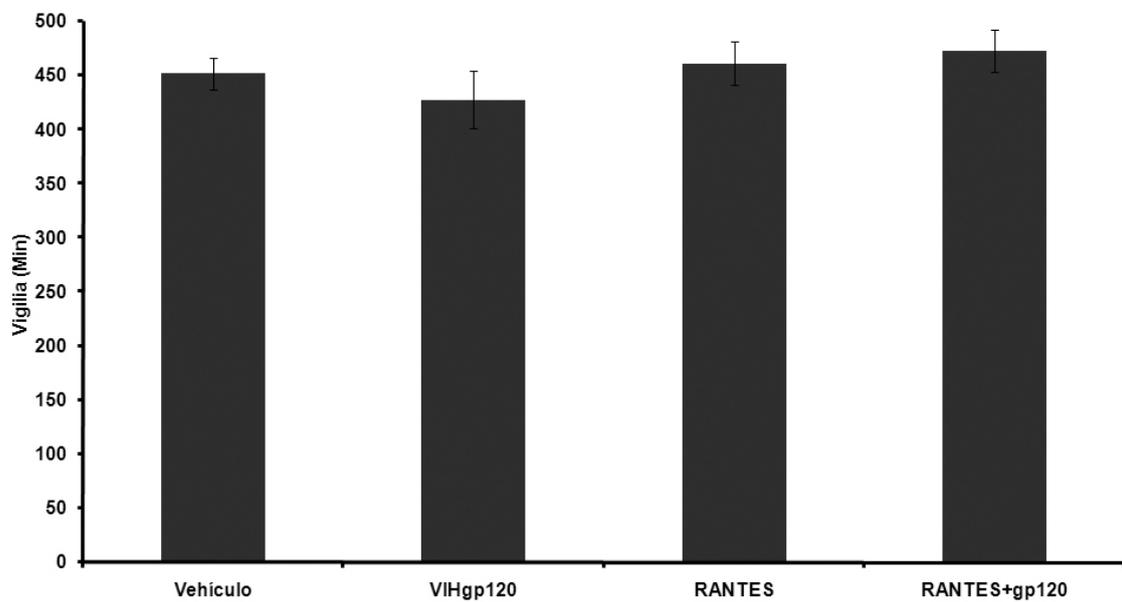
Gráfica 8. Media y error estándar del total de la vigilia durante las doce horas de registro posteriores a la primera administración.



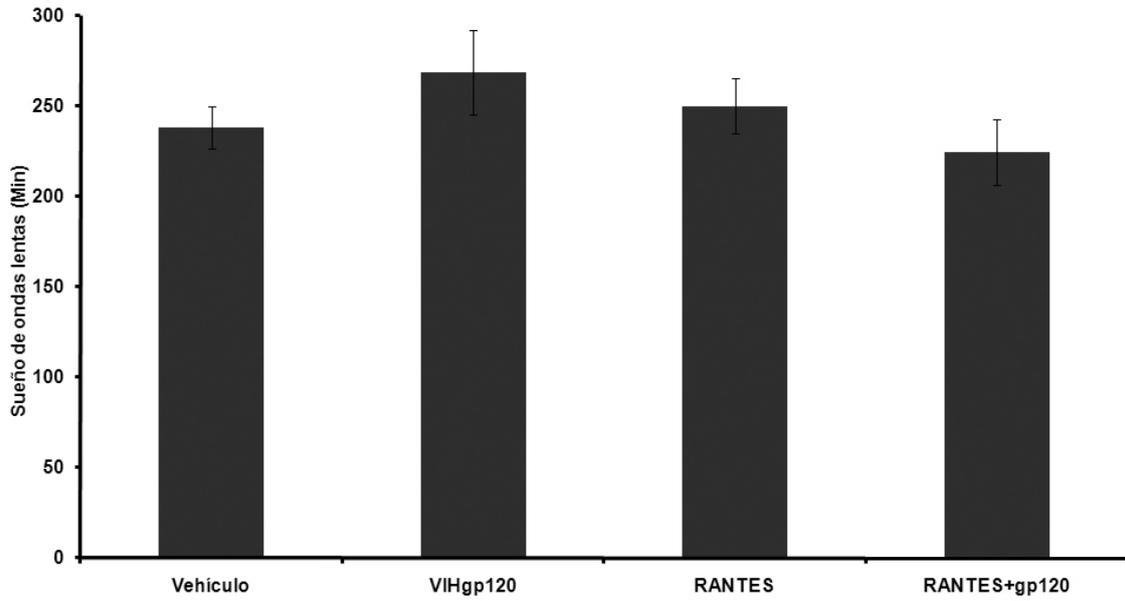
Gráfica 9. Media y error estándar del total de sueño de ondas lentas durante las doce horas de registro posteriores a la primera administración.



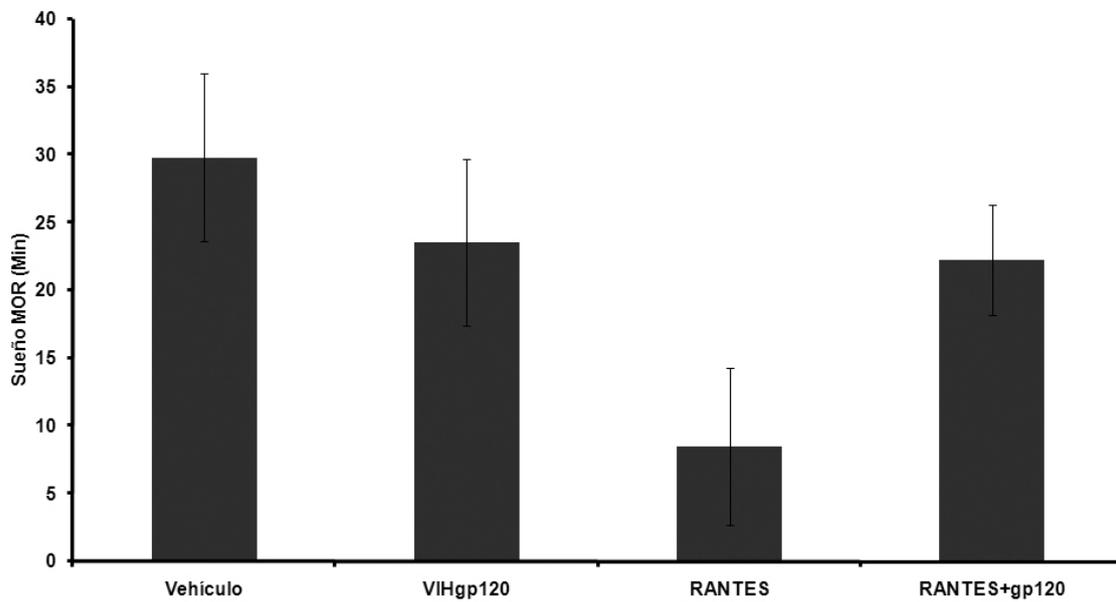
Gráfica 10. Media y error estándar del total de sueño MOR durante las doce horas de registro posteriores a la primera administración.



Gráfica 11. Media y error estándar del total de vigilia durante doce horas de registro después de 24 hrs. desde la última administración.



Gráfica 12. Media y error estándar del total de sueño de ondas lentas durante las doce horas de registro después de 24 hrs. desde la última administración.



Gráfica 13. Media y error estándar del total de sueño MOR durante las doce horas de registro después de 24 hrs. desde la última administración.

Los datos obtenidos podemos resumirlos en la siguiente tabla:

TX	gp120	RANTES	SDF-1 α	MDC	RANTES + gp120	SDF-1 α + gp120	MDC + gp120
INGESTA DE ALIMENTO	↓		↓			↓	
INGESTA DE AGUA	↓		↓				
PESO	↓		↓				
CONTROL MOTOR	↓				↑		
PRECEPCIÓN DEL DOLOR			↓		↓	↓	
VIGILIA REGISTRO 1							
SOL REGISTRO 1							
SMOR REGISTRO 1							
VIGILIA REGISTRO 2							
SOL REGISTRO 2							
SMOR REGISTRO 2							

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en todas las pruebas realizadas bajo los distintos esquemas de administración. Las flechas indican ↑ un aumento respecto al grupo control y ↓ una disminución.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

Los resultados obtenidos muestran que la gp120 está modificando el sistema nervioso central, lo cual se ve reflejado en las alteraciones conductuales que se observaron en los experimentos realizados.

En la ingesta de alimento hubo una caída desde la primera administración, lo que indica que la gp120 tiene un potente efecto para disminuir la ingesta. Se observa este efecto a pesar de haberse usado una dosis baja comparada con la que usaron Barak y cols. (2002a, 2002b) que fue de 1µg, y quienes encontraron también una caída significativa en la ingestión de alimento. De la misma forma vemos que SDF-1α está induciendo una caída en la ingestión de alimento similar a la de gp120 y que combinadas estas dos moléculas inducen una disminución en la ingestión aunque es menor cuando se comparan los efectos independientes, sugiriendo una competencia por el mismo receptor. Una posible explicación para este efecto como se había mencionado es que, el receptor CXCR4 se expresa en el hipotálamo lateral, que es un núcleo ejecutor para inducir la ingestión de alimento. La sobreactivación de dicho receptor induce muerte celular, lo que sugiere que la activación de éste, ya sea por SDF-1α o por gp120 está causando un daño a las células del hipotálamo y por el contrario, las quimiocinas RANTES y MDC tienen un papel protector frente a la gp120. Un trabajo previo muestra que RANTES disminuye la ingestión de alimento (Plata-Salaman y Borkoski, 2005) durante las dos primeras horas posteriores a la administración, pero en el presente estudio no se pudo corroborar ese dato debido a que las mediciones se hicieron cada 24 horas, pero los datos si concuerdan con la medición hecha 24 horas después de la administración en donde no se encontraron cambios en la cantidad total de alimento ingerido.

Respecto a la ingestión de agua, aquí nuevamente la gp120 indujo una disminución en el consumo desde la primera administración, teniendo los primeros días un efecto más drástico. Asimismo, la SDF-1 α induce una disminución en el consumo de agua, pero al combinarse estas moléculas sus efectos independientes desaparecen, lo cual sugiere que la gp120 y SDF-1 α están compitiendo por el mismo receptor y que esta competencia farmacológica llega a un tope. Las otras moléculas administradas solas no inducen cambios respecto al control pero previenen nuevamente el daño causado por la gp120. Aunque los datos del consumo de agua de las ratas tratadas con la gp120 no coinciden con los publicados por Barak y cols. (2002a, 2002b), quienes no encontraron cambios, una posible explicación es que manejaron dos opciones de líquido, una era agua pura y la otra agua con sacarina, encontrando únicamente una reducción en el consumo de agua con sacarina. Haciendo los cálculos adecuados se puede observar que el volumen total consumido fue menor respecto al grupo control.

Como una consecuencia de la disminución en la ingesta de alimento y agua en los grupos tratados con gp120 y SDF-1 α , se encontró que las ratas con estos tratamientos tenían una menor ganancia en el peso; es decir, estas ratas sólo ganaron en promedio de 15 g de peso al final del experimento mientras que las ratas control ganaron alrededor de 30 g, lo que significa 50% menos. Como RANTES y MDC no indujeron cambios en la ingesta de alimento y agua lo esperado era que tampoco hubiera variaciones en el peso al igual que en las combinaciones de fármacos.

Estos datos sugieren que el receptor CXCR4 puede ser uno de los mecanismos a través del cual la gp120 o SDF-1 α están induciendo un daño al menos funcional y que RANTES y MDC están proveyendo mecanismos de defensa o protección.

Respecto a la percepción del dolor, los experimentos mostraron que la gp120 no modificó el umbral de éste, dato que apoya la idea de que el efecto sobre la percepción

del dolor se modifica únicamente cuando es administrada periféricamente (Milligan y cols., 2000). Por otro lado, se mostró que la SDF-1 α sí induce una disminución al umbral del dolor, lo que hace que las ratas muestren signos de dolor más rápido que los controles. Este hallazgo es completamente novedoso y sugiere que algunas quimiocinas pueden ser moduladoras de la percepción dolorosa. La combinación de SDF-1 α +gp120 y RANTES+gp120 modifican la percepción del dolor disminuyendo la tolerancia a un estímulo doloroso, efectos que se pueden explicar por los datos publicados por Zhang y Oppenheim (2005), quienes demostraron que la activación de receptores como el CCR5 y el CXCR4 promueven la desensibilización de los receptores μ y δ opioides induciendo hiperalgesia. Otro estudio mostró que la administración de SDF-1 α en la sustancia gris periacueductal bloquea el efecto analgésico de los endocannabinoides (Benamar y cols., 2008).

La gp120 induce una alteración motora que es prevenida por la preadministración de cualquiera de las quimiocinas que se usaron en este estudio. En esta prueba SDF-1 α no induce ninguna alteración en el control motor e incluso puede prevenir el deterioro que induce la gp120.

En los registros de EEG no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratas experimentales respecto al control en los estados de vigilia, SOL y SMOR, debido a que el intervalo de los datos intragrupo son grandes, pero sí se observaron algunas tendencias como en el caso del segundo registro en donde se vio que la gp120 produce un ligero aumento en el sueño de ondas lentas y una disminución en el SMOR, hecho que concuerda con datos previamente publicados en nuestro grupo y en otros laboratorios (Opp y cols., 1996; Sanchez-Alavez y cols., 2000).

Como se ha visto la quimiocina SDF-1 α pareciera estar induciendo por sí sola las alteraciones conductuales inducidas por la gp120, la cual ya en estudios anteriores se

había mostrado que puede inducir muerte celular dependiendo de la dosis y que también de una manera dosis dependiente puede prevenir la muerte celular inducida por la gp120. Por otro lado, RANTES y MDC están teniendo un papel protector frente a la gp120 y SDF-1 α , lo que sugiere que los receptores CXCR4 y CCR4 y CCR5 tienen diferentes cascadas de señalización, así mientras unos protegen los otros están induciendo muerte celular.

En un estudio Kaul y cols. (2007) mostraron que en cultivos de cerebro de ratón que incluían microglía, astrocitos y neuronas, los cuales fueron modificados genéticamente para que no expresaran el receptor CXCR4 o CCR5 o ambos, vieron que al agregar gp120 a los cultivos de las células que no tenían el receptor CXCR4 la cantidad de células que morían disminuía en forma semejante al control, a diferencia de los cultivos de células que no expresaban el receptor CCR5 en donde no se modificó la cantidad de células sobrevivientes, y finalmente en los cultivos que no expresaban los dos receptores no se detectaron cambios respecto al control. Estos resultados indican que es indispensable la presencia del receptor CXCR4 para que la gp120 pueda inducir muerte celular. Por otro lado, en cultivos en donde se expresaban normalmente los receptores a quimiocinas agregaron SDF-1 β y vieron que inducía muerte celular. Posteriormente Kaul y cols. administraron al mismo tiempo MIP-1 β con SDF-1 β o RANTES con SDF-1 β , encontrando que las quimiocinas que se unen al receptor CCR5 bloquean la muerte inducida por SDF-1 β ; luego midieron las corrientes de calcio en neuronas corticales expuestas a SDF-1 β y hallaron que ésta quimiocina induce un aumento en éstas, no así las quimiocinas RANTES y MDC que no la modificaron. Estos autores observaron que si inmediatamente después de la administración de SDF-1 β se agrega MIP-1 β , este último bloquea las corrientes de calcio inducida por SDF-1 β y si se pone antes, las previene. Lo que indica que la activación del receptor CCR5 está

bloqueando la acción del receptor CXCR4, con lo cual se deduce que el receptor CCR5 está induciendo una desensibilización del receptor CXCR4, aunque finalmente faltaría probarlo.

Con esta información se puede concluir que un mecanismo por el cual la gp120 podría estar induciendo daño al cerebro es a través del receptor CXCR4, probablemente a través de inducir un aumento en el calcio intracelular y la activación de vías que inducen muerte por apoptosis, lo que consecuentemente hace que se deterioren conductas como la memoria, la atención, el aprendizaje, el lenguaje, así como la ingestión de alimento y de agua, el control motor, la percepción al dolor y el sueño. Por otro lado, RANTES y MDC tiene un papel protector en el cerebro en contra del deterioro inducido por la gp120.

En este estudio se reprodujeron datos reportados previamente que indican que la gp120 está induciendo alteraciones conductuales en modelos animales y que éstos a su vez reproducen las alteraciones encontradas en pacientes humanos infectados con el VIH. Lo que señala que al parecer esta glucoproteína es potencialmente la responsable del daño provocado en el cerebro de los humanos. También los datos obtenidos de este trabajo apuntan a que el sistema de las quimiocinas está jugando un papel fundamental en la modulación de distintas conductas, a pesar de ser un sistema que tiene su principal función en el sistema inmunológico. Hay investigadores que proponen que las quimiocinas son el tercer sistema mayormente distribuido en el cerebro (Adler y Rogers, 2005) por lo que ha adquirido mayor atención e importancia, hecho que debe conducir a hacer mas estudios para buscar la forma de manipular este sistema y probablemente de esta forma prevenir la demencia asociada al VIH.

Algunos estudios que podrían dar más información acerca del daño focalizado que provoca la gp120 son aquellos encaminados a medir la cantidad de muerte celular que

induce en núcleos específicos relacionados a las conductas que se están deteriorando y haciendo administraciones locales y evaluando su efecto conductual. También se pueden administrar RANTES y SDF-1 α juntas y ver si RANTES puede prevenir las alteraciones que provocó en este estudio.

REFERENCIAS

1. Abbadie C. (2005). Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol*, 26, 529-534.
2. Adler M. W. y Rogers T. J. (2005). Are chemokines the third major system in the brain? *J Leukoc Biol*.78(6), 1204-9.
3. American Psychiatric Association. (2001). *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. DSM-IV TR*. Barcelona: Masson.
4. Antinori A., Arendt G., Becker J. T., Brew B. J., Byrd D. A., Cherner M., Clifford D. B., Cinque P., Epstein L. G., Goodkin K., Gisslen M., Grant I., Heaton R. K., Joseph J., Marder K., Marra C. M., McArthur J. C., Nunn M., Price R. W., Pulliam L., Robertson K. R., Sacktor N., Valcour V., Wojna V. E. (2007). Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology*, 69(18), 1789-99.
5. Arenzana-Seisdedos F., Parmentier M. (2006). Genetics of resistance to HIV infection: role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin Immunol*, 18(6), 387-403.
6. Bachis A., Mocchetti I. (2004). The chemokine receptor CXCR4 and not the N-methyl-D-aspartate receptor mediates gp120 neurotoxicity in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*,75(1), 75-82.
7. Bagetta G., Corasaniti M. T., Berliocchi L., Navarra M., Finazzi-Agrò A., Nisticò G. (1995). HIV-1 gp120 produces DNA fragmentation in the cerebral cortex of rat. *Biochem Biophys Res Commun.*, 211(1), 130-6.

8. Bakhiet M., Tjernlund A., Mousa A., Gad A., Stromblad S., Kuziel W. A., Seiger A., Andersson J. (2001). RANTES promotes growth and survival of human first-trimester forebrain astrocytes. *Nat Cell Biol*, 3(2), 150-7.
9. Banisadr G., Fontanges P., Haour F., Kitabgi P., Rostène W., Mélik Parsadaniantz S. (2002). Neuroanatomical distribution of CXCR4 in adult rat brain and its localization in cholinergic and dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*, 16(9), 1661-71.
10. Banisadr G., Rostene W., Kitabgi P., Parsadaniantz S. M. (2005). Chemokines and brain functions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(3), 387-99.
11. Banisadr G., Skrzydelski D., Kitabgi P., Rostène W., Parsadaniantz S. M. (2003). Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur J Neurosci*, 18(6), 1593-606.
12. Barak O., Goshen I., Ben-Hur T., Weidenfeld J., Taylor A. N., Yirmiya R. (2002a). Involvement of brain cytokines in the neurobehavioral disturbances induced by HIV-1 glycoprotein 120. *Brain Res*, 933(2), 98-108.
13. Barak O., Weidenfeld J., Goshen I., Ben-Hur T., Taylor A. N., Yirmiya R. (2002b). Intracerebral HIV-1 glycoprotein 120 produces sickness behavior and pituitary-adrenal activation in rats: role of prostaglandins. *Brain Behav Immun*, 16(6):720-35.
14. Benamar K., Geller E. B., Adler M. W. (2008). First in vivo evidence for a functional interaction between chemokine and cannabinoid systems in the brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 325(2), 641-5.
15. Benhur Lee, Joseph Rucker, Robert W. Doms, Monica Tsang, Xiachun Hu, Mary Dietz, Robert Bailer, Luis J. Montaner, Craig Gerard, Nancy Sullivan,

- Joseph Sodroski, Tzanko S. Stantchev, Christopher C. Broder, F. Arenzana-Seisdedos, A. Amara, D. Thomas, J. L. Virelizier, F. Baleux, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, B. Moser, M. Baggiolini, Anthony L. DeVico, Ranajit Pal, Philip D. Markham, Alfredo Garzino-Demo, and Robert C. Gallo. (1998). β -chemokine MDC and HIV-1 Infection. *Science*, 24, 281: 487
16. Bleul C. C., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark-Lewis I., Sodroski J., Springer T. A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382(6594), 829-33.
17. Bouhassira D., Attal N., Willer J. C., Brasseur L. (1999). Painful and painless peripheral sensory neuropathies due to HIV infection: a comparison using quantitative sensory evaluation. *Pain*, 80(1-2), 265-72.
18. Boutet A., Salim H., Leclerc P., Tardieu M. (2001). Cellular expression of functional chemokine receptor CCR5 and CXCR4 in human embryonic neurons. *Neurosci Lett*, 311(2), 105-8.
19. Brenneman D. E., Westbrook G. L., Fitzgerald S. P., Ennist D. L., Elkins K. L., Ruff M. R., Pert C. B. (1988). Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature*, 335(6191), 639-42.
20. Buzy J. M., Brenneman D. E., Siegal F. P., Ruff M. R., Pert C. B.. (1989). Cerebrospinal fluid from cognitively impaired patient with acquired immunodeficiency syndrome shows gp120-like neuronal killing in vitro. *Am J Med*, 7(3), 361-2.
21. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA. (2008). *Epidemiología del SIDA en México*. <http://www.salud.gob.mx/conasida>.

22. Corasaniti M. T., Piccirilli S., Paoletti A., Nisticò R., Stringaro A., Malorni W., Finazzi-Agrò A., Bagetta G. (2001). Evidence that the HIV-1 coat protein gp120 causes neuronal apoptosis in the neocortex of rat via a mechanism involving CXCR4 chemokine receptor. *Neurosci Lett*, 312(2), 67-70.
23. Cota M., Mengozzi M., Vicenzi E., Panina-Bordignon P., Sinigaglia F., Transidico P., Sozzani S., Mantovani A., Poli G. (2000). Selective inhibition of HIV replication in primary macrophages but not T lymphocytes by macrophage-derived chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(16), 9162-7.
24. Chalasani S. H., Baribaud F., Coughlan C. M., Sunshine M. J., Lee V. M., Doms R. W., Littman D. R., Raper J. A. (2003). The chemokine stromal cell-derived factor-1 promotes the survival of embryonic retinal ganglion cells. *J Neurosci*, 23(11), 4601-12.
25. De Silva E., Stumpf M. P. (2004). HIV and the CCR5-Delta32 resistance allele. *FEMS Microbiol Lett*, 241(1):1-12.
26. Diaz-Ruiz O., Navarro L., Mendez-Diaz M., Galicia O., Elder J. H., Sanna P. P., Drucker-Colin R., Prospero-Garcia O. (2001). Inhibition of the ERK pathway prevents HIVgp120-induced REM sleep increase. *Brain Res*, 913(1), 78-81.
27. Dong J., Xiong H. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 inhibits long-term potentiation via chemokine receptor CXCR4 in rat hippocampal slices. *J Neurosci Res*. 83(3), 489-96.
28. Forrester J. E., Spiegelman D., Tchetgen E., Knox T. A., Gorbach S. L. (2002). Weight loss and body-composition changes in men and women infected with HIV. *Am J Clin Nutr*, 76(6), 1428-34.
29. Galicia O., Sánchez-Alavez M., Díaz-Ruiz O., Sánchez Narváez F., Elder J. H., Navarro L., Prospéro-García O. (2000). HIV-derived protein gp120 suppresses

- P3 potential in rats: potential implications in HIV-associated dementia. *Neuroreport*, 11(6), 1351-5.
30. Glowa J. R., Panlilio L. V., Brenneman D. E., Gozes I., Fridkin M., Hill J. M. (1992). Learning impairment following intracerebral administration of the HIV envelope protein gp120 or a VIP antagonist. *Brain Res*, 570(1-2), 49-53.
 31. González-Scarano F., Martín-García J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*. 5(1), 69-81.
 32. Grant I., Atkinson J. H., Hesselink J. R., Kennedy C. J., Richman D. D., Spector S. A., McCutchan J. A. (1987). Evidence for early central nervous system involvement in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and other human immunodeficiency virus (HIV) infections. Studies with neuropsychologic testing and magnetic resonance imaging. *Ann Intern Med*, 107(6), 828-36.
 33. Grant I. (2008). Neurocognitive disturbances in HIV. *Int Rev Psychiatry*, 20(1), 33-47.
 34. Hill J. M., Mervis R. F., Avidor R., Moody T. W., Brenneman D. E. (1993). HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates. *Brain Res*, 603(2), 222-33.
 35. Hinkin C. H., Castellon S. A., Hardy D. J. (2000). Dual task performance in HIV-1 infection. *J Clin Exp Neuropsychol*, 22(1), 16-24.
 36. Hogan D., Hutton L. A., Smith E. M., Opp M. R. (2001). Beta (CC)-chemokines as modulators of sleep: implications for HIV-induced alterations in arousal state. *J Neuroimmunol*. 119(2), 317-26.
 37. Kaul M., Garden G. A., Lipton S. A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, 410(6831), 988-94.

38. Kaul M., Lipton S. A. (1999). Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*, 96(14), 8212-6.
39. Kaul M., Ma Q., Medders K. E., Desai M. K., Lipton S. A. (2007). HIV-1 coreceptors CCR5 and CXCR4 both mediate neuronal cell death but CCR5 paradoxically can also contribute to protection. *Cell Death Differ*, (2), 296-305.
40. Kramer-Hämmerle S., Rothenaigner I., Wolff H., Bell J. E., Brack-Werner R. (2005). Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res*, 111(2), 194-213.
41. Ma Q., Jones D., Borghesani P. R., Segal R. A., Nagasawa T., Kishimoto T., Bronson R. T., Springer T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 9448-53.
42. Meucci O., Fatatis A., Simen AA., Bushell T. J., Gray P. W., Miller R. J. (1998). Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), 14500-5.
43. Milligan E. D., Mehmert K. K., Hinde J. L., Harvey L. O., Martin D., Tracey K. J., Maier S. F., Watkins L. R. (2000). Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res*, 861(1), 105-16.
44. Montes-Rodriguez C. J., Alavez S., Elder J. H., Haro R., Moran J., Prospero-Garcia O. (2004). Prolonged waking reduces human immunodeficiency virus glycoprotein 120- or tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in the cerebral cortex of rats. *Neurosci Lett*, 360(3), 133-6.

45. Norman S. E., Chediak A. D., Freeman C., Kiel M., Mendez A., Duncan R., Simoneau J., Nolan B. (1992). Sleep disturbances in men with asymptomatic human immunodeficiency (HIV) infection. *Sleep*, 15(2), 150-5.
46. Norman S. E., Chediak A. D., Kiel M., Cohn M. A. (1990). Sleep disturbances in HIV-infected homosexual men. *AIDS*, 4(8), 775-81
47. Oberlin E., Amara A., Bachelier F., Bessia C., Virelizier J. L., Arenzana-Seisdedos F., Schwartz O., Heard J. M., Clark-Lewis I., Legler D. F., Loetscher M., Baggiolini M., Moser B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382(6594), 833-5.
48. Oh S. B., Tran P. B., Gillard S. E., Hurley R. W., Hammond D. L., Miller R. J. (2001). Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. *J Neurosci*, 21(14), 5027-35.
49. Opp MR, Rady PL, Hughes TK Jr, Cadet P, Tyring SK, Smith EM. (1996). Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein 120 alters sleep and induces cytokine mRNA expression in rats. *Am J Physiol*, 270(5 Pt 2), R963-70.
50. Pal R., Garzino-Demo A., Markham P. D., Burns J., Brown M., Gallo R. C., DeVico A. L. (1997). Inhibition of HIV-1 infection by the beta-chemokine MDC. *Science*, 278(5338), 695-8.
51. Pattarini R., Pittaluga A., Raiteri M. (1998). The human immunodeficiency virus-1 envelope protein gp120 binds through its V3 sequence to the glycine site of N-methyl-D-aspartate receptors mediating noradrenaline release in the hippocampus. *Neuroscience*, 87(1), 147-57.
52. Paxinos, G., Watson, C. (1986) *The rat Brain in stereotaxic coordinates*. USA, academis press, second edition.

53. Plata-Salaman C. R., Borkoski J. P. (1994). Chemokines/intercrines and central regulation of feeding. *American Journal of Physiology*, 266(5 Pt 2), R1711-5.
54. Pugh C. R., Johnson J. D., Martin D., Rudy J. W., Maier S. F., Watkins L. R. (2000). Human immunodeficiency virus-1 coat protein gp120 impairs contextual fear conditioning: a potential role in AIDS related learning and memory impairments. *Brain Res*, 861(1), 8-15.
55. Rostasy K., Egles C., Chauhan A., Kneissl M., Bahrani P., Yiannoutsos C., Hunter D. D., Nath A., Hedreen J. C., Navia B. A. (2003). SDF-1alpha is expressed in astrocytes and neurons in the AIDS dementia complex: an in vivo and in vitro study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(6), 617-26.
56. Sanchez-Alavez M., Criado J., Gomez-Chavarin M., Jimenez-Anguiano A., Navarro L., Diaz-Ruiz O., Galicia O., Sanchez-Narvaez F., Murillo-Rodriguez E., Henriksen S. J., Elder J. H., Prospero-Garcia O. (2000). HIV- and FIV-derived gp120 alter spatial memory, LTP, and sleep in rats. *Neurobiol Dis*, 7(4), 384-94.
57. Sierra S., Kupfer B., Kaiser R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*, 34(4), 233-44.
58. Singh P., Kaur G., Sharma G., Mehra N. K. (2008). Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression. *Vaccine*. 26 (24), 2966-80.
59. Skrzydelski D., Guyon A., Daugé V., Rovère C., Apartis E., Kitabgi P., Nahon J. L., Rostène W., Parsadaniantz S. M. (2007). The chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 activates the nigrostriatal dopamine system. *J Neurochem*, 102(4), 1175-83.

60. Toborek M., Lee Y. W., Flora G., Pu H., András I. E., Wylegala E., Hennig B., Nath A. (2005). Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell Mol Neurobiol*, 25(1), 181-99.
61. Toggas S. M., Masliah E., Rockenstein E. M., Rall G. F., Abraham C. R., Mucke L. (1994). Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature*, 367(6459), 188-93.
62. UNAIDS. (2008). *2008 Report on the global AIDS epidemic*. <http://www.unaids.org>.
63. Valerio A., Ferrario M., Martinez F. O., Locati M., Ghisi V., Bresciani L. G., Mantovani A., Spano P. (2004). Gene expression profile activated by the chemokine CCL5/RANTES in human neuronal cells. *J Neurosci Res*, 78(3), 371-82.
64. Van der Meer P., Ulrich A. M., Gonzalez-Scarano F., Lavi E. (2000). Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Exp Mol Pathol*, 69(3), 192-201.
65. Verma S., Estanislao L., Simpson D. (2005). HIV-associated neuropathic pain: epidemiology, pathophysiology and management. *CNS Drugs*, 19(4), 325-34.
66. Wiegand M., Möller A. A., Schreiber W., Krieg J. C., Fuchs D., Wachter H., Holsboer F. (1991). Nocturnal sleep EEG in patients with HIV infection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 240(3), 153-8.
67. Wu L., Gerard N. P., Wyatt R., Choe H., Parolin C., Ruffing N., Borsetti A., Cardoso A. A., Desjardin E., Newman W., Gerard C., Sodroski J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*, 384(6605), 179-83.

68. Zhang N., Oppenheim J. J. (2005). Crosstalk between chemokines and neuronal receptors bridges immune and nervous systems. *J Leukoc Biol*, 78(6), 1210-4.