



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
(FACULTAD DE QUÍMICA)

“PAPEL DE LA PROGESTERONA Y SU RECEPTOR  
INTRACELULAR EN LA REGULACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DE LOS CORRECEPTORES CXCR4 Y  
CCR5 EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE  
SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES  
SEROPOSITIVOS AL VIRUS DE  
INMUNODEFICIENCIA HUMANA”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

M. en C. EDITH ARACELI CABRERA  
MUÑOZ

Tutor: IGNACIO CAMACHO ARROYO

MÉXICO, D. F.

JUNIO/2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo económico del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (proyecto PICDS08-35).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dra. María Eugenia Torres Márquez

Dr. Enrique Ortega Soto

El jurado de Examen de Doctorado estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Vocal: Dra. Marcela Lizano Soberón

Secretario: Dra. Milagros Méndez Ubach

Suplente: Dra. María Eugenia Torres Márquez

Suplente: Dr. Jorge Morales Montor

Hoy es siempre todavía.

Antonio Machado  
(1875-1939)

A veces sentimos que lo  
que hacemos es tan solo  
una gota en el mar, pero el  
mar sería menos si le  
faltara una gota.

Madre Teresa de Calcuta  
(1910-1997)

A mis papás, Xóchitl y Rigoberto por seguir apoyándome cada día. A mi hermano Rigo ya que sin ti no me preguntaría tantas cosas. A mi hermanita Judith porque en los momentos más agobiantes siempre me haces reír y pasármela bien, gracias por apoyarme en los tres meses más rudos de mi vida.

A Mario, ya que sin ti ni podría hacer ni la mitad de las cosas que hago día a día, gracias por tu apoyo y por lo que hemos compartido hasta ahora. A Braulio, ya que a tu corta edad me has enseñado que todos los días pueden ser sorprendentes y que cada esfuerzo, por pequeño o grande que sea, vale la pena.

Tania, gracias por ser una verdadera amiga, de esas que regañan cuando hace falta y que también echan porras.

A Las chicas y chicos del laboratorio por todo lo que compartimos y lo bien que la pasamos, Aliesha, gracias por todo, tanto en lo profesional como en lo personal, por tus consejos que me han sido de mucha utilidad, Graciela, Tania chiquita, Vale, Mike, Gaby. Gracias a Irene por ser parte fundamental para el laboratorio.

Gracias Dr. Ignacio Camacho por la flexibilidad y disposición ante la realización de proyectos muy diversos y por tu infinita paciencia, así como por tus enseñanzas.

Agradezco también a mi comité tutorial, Dra. Maru Torres y Dr. Enrique Ortega por la ayuda que me prestaron durante la realización de este proyecto.

A los chicos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su ayuda, Elsa, Roberto, Mónica, Zaida y Elo, gracias por su amistad, a Luis León Fuentes, gracias Luis por plantar esa semilla de curiosidad en un tema tan amplio como es el estudio del VIH, al Dr. Luis Enrique Soto por sus observaciones y por su disposición.

A los pacientes que, en medio de todo lo que viven tienen la disposición de ayudar a la investigación para que podamos comprender y aportar una gota de agua al mar de este terrible padecimiento.

## Índice

I. Abstract.	1
II. Resumen.	2
III. Antecedentes	3
3.1 Virus de inmunodeficiencia humana (VIH).	3
3.1.1. Características del VIH.	3
3.1.2. Ciclo replicativo del VIH.	4
3.2. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).	6
3.2.1. Factores implicados en la adquisición, establecimiento y progresión de la infección por VIH-1.	8
3.3. Correceptores del VIH: CCR5 y CXCR4.	9
3.3.1. CCR5.	11
3.3.2 CXCR4.	13
3.4. Estructura y función de la progesterona (P).	15
3.4.1. Mecanismos de acción de la P.	16
3.4.2. Características del Receptor a P (RP).	19
3.4.3. Isoformas del RP.	22
3.5. Papel de la P en la infección por VIH.	25
3.5.1. Efecto de la P sobre el contenido de CCR5 y CXCR4.	25
IV. Planteamiento del problema.	27
V. Hipótesis.	27
VI. Objetivos.	28
6.1. Objetivo General.	28
6.2. Objetivos Particulares.	28
VII. Materiales y Métodos.	29
7.1. Toma de muestra y separación de PBMCs en gradiente de Ficoll.	30
7.2 Determinación de concentraciones hormonales.	30
7.3. Cultivo Celular.	31
7.4. Determinación del contenido de CCR5, CXCR4 y RP.	32
7.4.1. Extracción de Proteínas totales.	32
7.4.2. Western Blot.	32

7.5. Determinación de la expresión de CCR5 y CXCR4.	33
7.5.1. Extracción de RNA total.	33
7.5.2. RT-PCR.	34
7.6. Análisis de resultados.	35
VIII. Resultados.	36
8.1. Niveles hormonales en mujeres seronegativas (SN), progresoras típicas (PT) y expuestas no infectadas ENI).	36
8.2. Contenido de las isoformas del RP en mujeres SN, PT y ENI.	37
8.3. Contenido basal de los correceptores CCR5 y CXCR4.	38
8.4. Efecto de la P sobre el contenido de los correceptores CCR5 y CXCR4.	39
8.5. Efecto de la P sobre la expresión de los correceptores CCR5 y CXCR4.	42
IX. Discusión.	47
9.1. Niveles hormonales en sujetos SN, PT y ENI.	47
9.2. Contenido basal de CCR5 y CXCR4 en SN, PT y ENI.	48
9.3. Regulación de los correceptores CXCR4 y CCR5 por P en PBMC de mujeres SN, PT y ENI.	49
X. Conclusiones	52
XI. Perspectivas	52
XII. Referencias.	53
XIII. Anexos.	60
12.1. Cabrera-Muñoz E, Escobedo G, Guzmán C, Camacho-Arroyo I. 2010. Role of progesterone in HIV and parasitic infections. <i>Open Neuroendocrin J.</i> 3:137-142.	60
12.2. Cabrera-Muñoz E, Zamora-Chávez J, Fuentes-Romero L.L, Camacho-Arroyo I. 2012. Effects of progesterone on the content of CCR5 and CXCR4 coreceptors in PBMCs of seropositive and exposed but uninfected Mexican women to HIV-1. <i>J Steroid Biochem Mol Biol.</i> 132:66-72.	60
12.3. Cabrera-Muñoz E, Hernández-Hernández OT, Camacho-Arroyo I. Role of progesterone and estradiol in VIH susceptibility and disease progression. <i>Mini Rev Med Chem.</i> En prensa	60

## **I. ABSTRACT**

CCR5 and CXCR4 coreceptors play an important role in the establishment of HIV infection and disease progression. Caucasian people exposed to HIV but uninfected (EU) present a deletion of 32 bp in CCR5 that has not been reported in EU hispanics from Latin America. Therefore, other factors besides mutations should be involved in this phenomenon. Studies in healthy women have shown that sex hormones such as progesterone (P) can modulate CCR5/CXCR4 expression through an unknown mechanism. The aim of this study was to determine the role of P in CCR5 and CXCR4 regulation of in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HIV-1 infected and EU women. We analyzed HIV-1-infected women with stable highly active antiretroviral therapy (HAART) with CD4+ cell counts < 400/mm<sup>3</sup> or diminution of 20%, EU, and HIV-1 seronegative healthy controls. PBMCs, from HIV-1 infected women, EU women and HIV-1 seronegative healthy controls were cultured and incubated with P, RU486 or P + RU486. CCR5/CXCR4 expression was determined by RT-PCR and Western blot. Densitometry data were analyzed using Mann-Whitney U test. We found that CCR5 content was reduced by P in all groups. In contrast, CXCR4 content was increased by P in both, controls and HIV-1 infected women. Interestingly, CXCR4 content was reduced by P in EU. RU486 did not block P effects in any group. These findings suggest that P participates in the acquisition and progression of HIV-1 infection by modulating CCR5 and CXCR4 expression. P contribution to the EU acquisition resistance of HIV could be through the down-regulation of both coreceptors.

## II. RESUMEN

Los correceptores CCR5 y CXCR4 juegan un papel importante en el establecimiento y la progresión de la infección por VIH. Personas de raza blanca expuestas al VIH pero no infectados (ENI) presentan una delección de 32 pb en CCR5, que no ha sido reportada en población hispana en América Latina. Por lo tanto, otros factores además de las mutaciones podrían estar involucrados en este fenómeno. Estudios realizados en mujeres sanas han demostrado que las hormonas sexuales, como la progesterona (P), pueden modular la expresión de CCR5/CXCR4 a través de un mecanismo desconocido. El objetivo de la presente tesis fue determinar el papel de la P en la regulación de CCR5 y CXCR4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de mujeres infectadas con VIH-1 y ENI. Se analizaron muestras de mujeres infectadas con VIH-1 (PT) y con tratamiento de terapia antirretroviral altamente activa (HAART) con recuentos de linfocitos TCD4 + menores 400/mm<sup>3</sup> o una disminución de un 20%, así como muestras de mujeres ENI y controles seronegativas a VIH-1(SN). 5x10<sup>6</sup> PBMCs, de mujeres PT, ENI y seronegativas se cultivaron y se incubaron con P (10 o 100 nM), RU486 (antagonista del RP, 1 μM) o P (100 nM) + RU486 (1 μM) durante 12 o 24 horas. La expresión de los correceptores CCR5/CXCR4 y su contenido fueron determinados por RT-PCR y Western blot, respectivamente. Los datos se analizaron mediante densitometría y los resultados fueron analizados utilizando la prueba estadística de U de Mann-Whitney, tomando una p<0.05 para señalar las diferencias significativas. Se encontró que la P redujo la expresión y el contenido de CCR5 en todos los grupos. Por el contrario, tanto la expresión como el contenido de CXCR4 se incrementaron después del tratamiento con P, en los controles sanos y en el VIH-1 las mujeres infectadas. De forma interesante, la P disminuyó la expresión de CXCR4 en las ENI. RU486 no bloqueó los efectos de P en ningún grupo. Estos hallazgos sugieren que la P participa en la adquisición y la progresión de la infección VIH-1 mediante la modulación de la expresión de CCR5 y CXCR4. La P puede contribuir a la adquisición de resistencia del VIH en las ENI a través de la regulación a la baja de los dos correceptores.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

##### 3.1.1. Características del VIH

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus de la familia retroviridae con un tamaño aprox. de 70 nm, cuyos genes se componen de moléculas de ácido ribonucleico (RNA). La parte externa del virus se conoce como la envoltura viral está formada por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula del huésped que el virus adquiere cuando penetra a través de la membrana celular. Esta envoltura puede contener proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (HMC) clases I y II, así como moléculas de adhesión intercelular. Insertado en la envoltura viral se encuentra un complejo proteínico conocido como env, formado por una capa externa sobresaliente, las glicoproteínas (gp) gp120, y gP1. Debajo de la envoltura se encuentra la proteína de matriz p17, que a su vez rodea el núcleo viral o nucleocápside, formado por la proteína viral p24.

Los elementos principales que están dentro del núcleo son dos cadenas sencillas de RNA, una proteína estructural denominada p7 (nucleocápside) y tres enzimas, p51 (transcriptasa reversa), p11 (proteasa) y p32 (integrasa) (Alcamí, 2004) (Fig. 1).

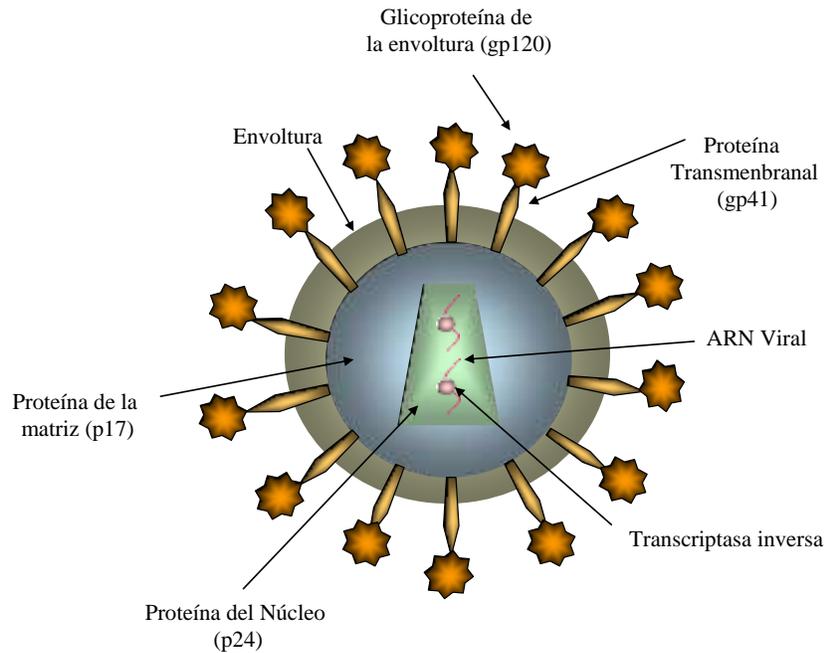
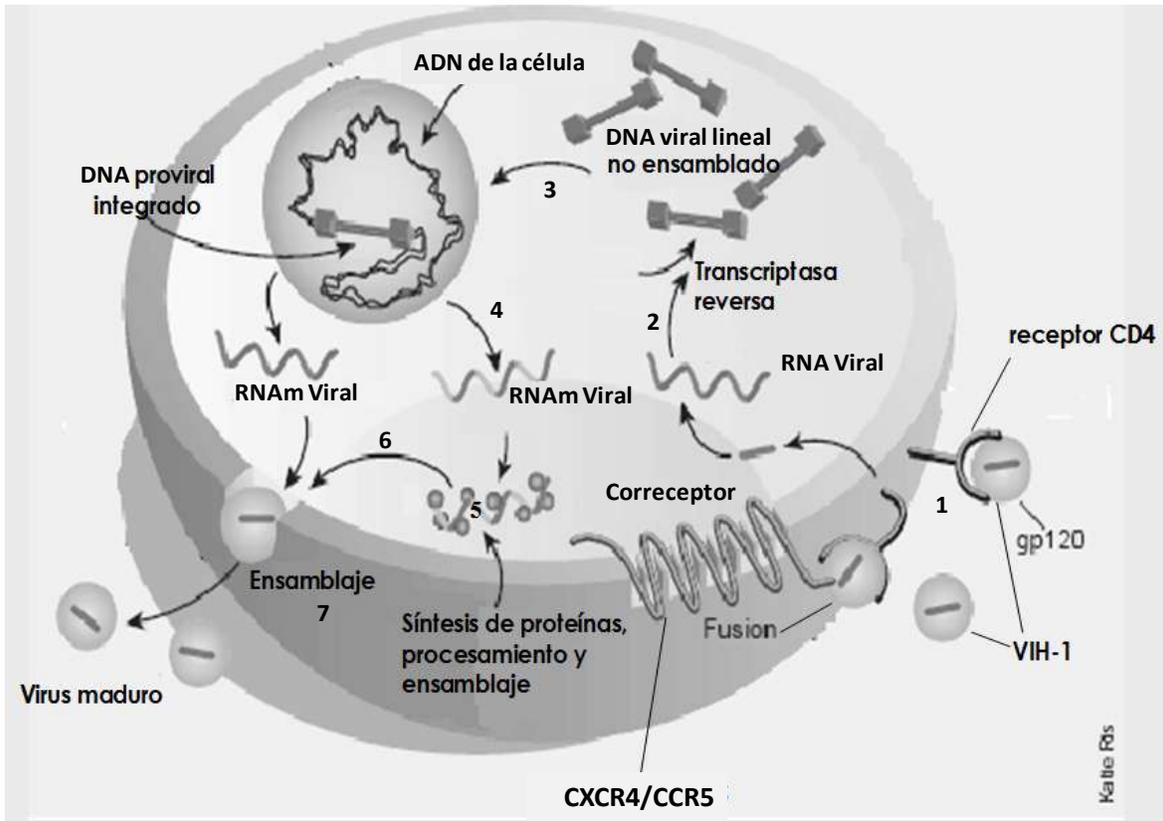


Fig.1. Estructura del virus de inmunodeficiencia humana.

### 3.1.2. Ciclo replicativo del VIH

El ciclo replicativo del VIH (Fig. 2) inicia con el contacto entre la proteína viral gp120 (dominio VI) y el receptor CD4 de la célula hospedera, presente en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans (Caratola, 1999). Sin embargo, la unión requiere de la intervención de moléculas denominadas correceptores, que son importantes para que se lleve a cabo el proceso de fusión entre las membranas celular y viral (Yábar, 2003). Se han caracterizado diversos correceptores del VIH, localizados en la célula hospedera, entre ellos CCR5 (50 kDa) y CXCR4 (40.5 kDa), que son utilizados por el virus para llevar a cabo la fusión de la envoltura viral y la membrana de la célula hospedera (Shattcok R, 2003; Yábar, 2003).



**Fig. 2. Esquema representativo del ciclo replicativo del VIH.** El ciclo replicativo del VIH se divide en 7 etapas; 1) Acoplamiento de las proteínas de la envoltura viral (gp 120 y gp 41) con un receptor principal (CD4) y un correceptor (CCR5 o CXCR4) y fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula hospedera; 2) Transcripción inversa: El RNA viral (RNAv) se transcribe a DNA mediante la enzima transcriptasa inversa; 3) Integración del DNA viral (DNAv): El DNAv es integrado al genoma hospedero por la integrasa; 4) Transcripción: Cuando la célula infectada transcribe su material genético transcribe a su vez DNAv; 5) Traducción de proteínas virales; 6) Ensamblaje: En el citoplasma se conjuntan las proteínas virales y se ensamblan virus nuevos; 7) Salida o brote de viriones: El virus nuevo sale de la célula, trayendo consigo parte de la membrana celular. La enzima proteasa comienza el proceso postraduccional de las proteínas del virus inmaduro y una vez terminado este procesamiento el virus está maduro y es capaz de infectar a otra célula (Modificado de Fauci, 2003).

La unión entre gp120 con el receptor CD4 desencadena cambios conformacionales en gp120, los cuales exponen el sitio de unión a un correceptor, ya sea CCR5 o CXCR4 (Sierra et al., 2005). CCR5 es principalmente utilizado en etapas tempranas de la infección por cepas de VIH que infectan a macrófagos (VIH M-trópicos o R5), mientras que CXCR4 interactúa con virus que infectan a linfocitos T (VIH T-trópicos o R4) principalmente en estados avanzados de la

infección. Cabe mencionar que existe un tercer tipo de virus que puede interactuar con ambos correceptores (VIH R5X4) (Alcamí, 2004).

Una vez llevada a cabo la interacción gp120/correceptor, el extremo amino terminal del péptido de fusión de la proteína gP1 se inserta en la membrana de la célula hospedera y se finaliza la fusión de membranas. Posteriormente la cápside viral se inserta en el citoplasma y se libera el material genético viral, el cual es retrotranscrito a DNA por la transcriptasa reversa viral para posteriormente ser trasladado al núcleo de la célula hospedera por medio de la integrasa del virus. El DNA viral es transcrito por medio de la polimerasa celular produciendo péptidos precursores virales que son llevados al citoplasma celular donde son cortados por la proteasa produciendo proteínas virales que se ensamblarán formando nuevas partículas virales. Por último las partículas virales son liberadas de la célula llevándose parte de la membrana celular (Costin, 2007; Simon et al., 2006; Caratola, 1999).

### **3.2. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)**

El Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) constituye la principal causa infecciosa de muerte en adultos a nivel mundial. De acuerdo a las estimaciones más recientes del Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CENSIDA), en México existen alrededor de 182 mil personas adultas infectadas por el VIH, agente causal del SIDA, de las cuales alrededor de 99,000 desarrollaron SIDA. Del total de pacientes con SIDA el 83.3% son hombres y el 16.7% son mujeres, es decir, existe una relación hombres/mujeres de 5 a 1. Las personas de 15 a 44 años de edad constituyen el grupo más afectado, con 78.9% de los casos registrados (CENSIDA, 2011).

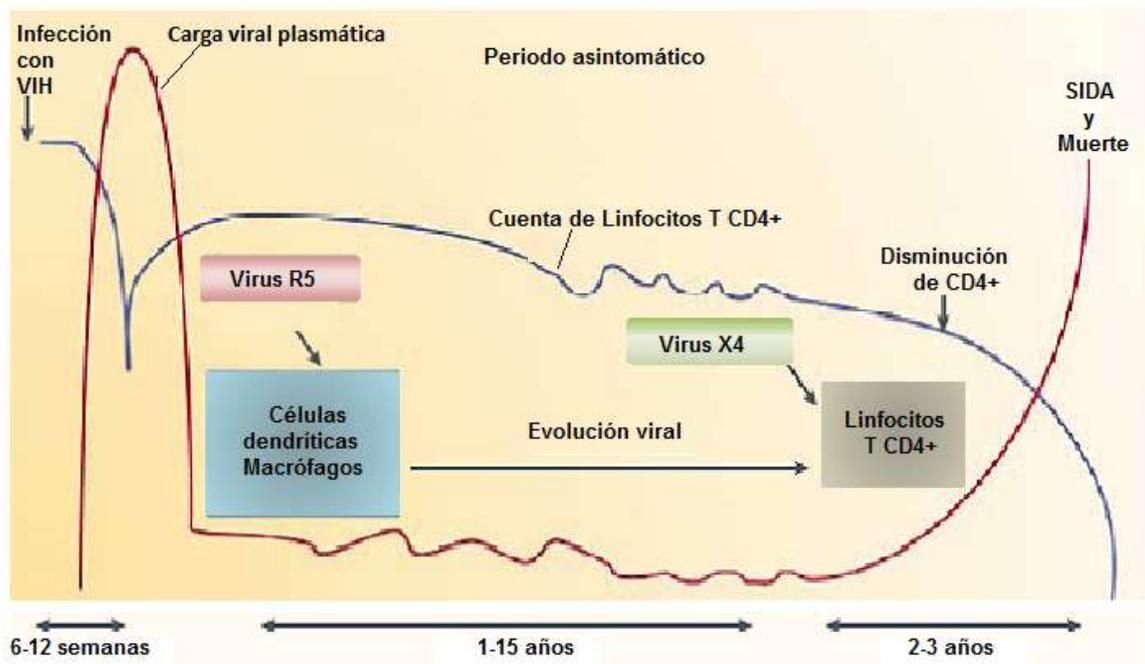
Dicho padecimiento se caracteriza por el deterioro de la respuesta inmune a diversos patógenos debido a una disminución progresiva de células CD4<sup>+</sup>. La historia natural de la enfermedad, sin tratamiento, se divide en tres etapas (Fig. 3):

1) Infección aguda o primaria: fase de viremia donde se produce síndrome de mononucleosis severa caracterizada por fiebre, dolor de garganta e inflamación de los ganglios linfáticos, especialmente en el cuello. Se presenta una inmunosupresión pasajera (disminución de linfocitos T CD4<sup>+</sup>). En esta fase se pueden presentar enfermedades respiratorias, gastrointestinales, inflamación de ganglios linfáticos, pérdida de peso repentina, sudoraciones nocturnas, etc.

Del total de los casos de infección primaria por VIH, aproximadamente el 50% se desarrolla de forma asintomática, mientras que el otro 50% desarrolla síntomas similares a los del resfriado común. Sin embargo, en esta etapa se lleva a cabo la replicación viral en nódulos linfáticos y ocurre un pico de la carga viral en plasma al igual que un decremento de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> llevando al virus a un estado de latencia.

2) Fase de latencia: ocurre un decremento gradual y progresivo en la cuenta de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, mediante la proteína viral vpr, induciendo la apoptosis celular mediante la activación de caspasas (Kogan et al., 2011) además de una disminución y mantenimiento en la carga viral en sangre periférica a tal grado que puede llegar a ser indetectable. Sin embargo, existe una replicación constante del virus. En esta etapa no se presentan síntomas y su duración es muy variable, llegando a durar incluso años.

3) Enfermedad clínicamente aparente (SIDA): ocurre un incremento en la replicación de partículas virales y una disminución drástica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> llegando a un conteo igual o menor de 200 células/cm<sup>3</sup> de sangre (1200 células/cm<sup>3</sup> en la condición normal). En esta fase se presentan síntomas como sudoraciones nocturnas, diarreas severas, adenopatías, cáncer y la aparición de múltiples enfermedades oportunistas que definen en su totalidad el SIDA (Calarota, 1999; Simon et al., 2006).



**Fig. 3. Esquema representativo de la historia natural de la infección por VIH.** (Modificada de Rowland-Jones, 2003).

De acuerdo al tiempo de la etapa asintomática y el desarrollo a SIDA, la cuenta de CD4<sup>+</sup> y la carga viral se puede clasificar a los pacientes en progresores típicos (PT), pacientes con carga viral constante y la cuenta de CD4<sup>+</sup> decreciente en un periodo de tiempo menor a 5 años; lentos progresores (LP) y no progresores (NP), enfermos con carga viral constante y niveles de CD4<sup>+</sup> estables durante periodos iguales o mayores a 7 años, respectivamente.

### 3.2.1. Factores implicados en la adquisición, establecimiento y progresión de la infección por VIH-1

Se han descrito factores intrínsecos del VIH y factores del hospedero que regulan la patogénesis y la infección por el virus. Por ejemplo, la presencia de los correceptores del VIH juega un papel importante en el establecimiento y desarrollo de la infección. De manera muy interesante, se han reportado casos de personas

expuestas al VIH que no se infectan (ENI). La condición se ha asociado con una deleción de 32 pb en el gen que codifica a CCR5 (CCR5 $\Delta$ 32). Esta deleción produce un fenotipo defectuoso para CCR5, el cual parece conferir cierta resistencia a la infección (Paranjape, 2005). Esta forma defectuosa de CCR5 se ha detectado en la raza caucásica, pero no en mexicanos. Sin embargo, existen ENI (principalmente mujeres) que no presentan CCR5 $\Delta$ 32.

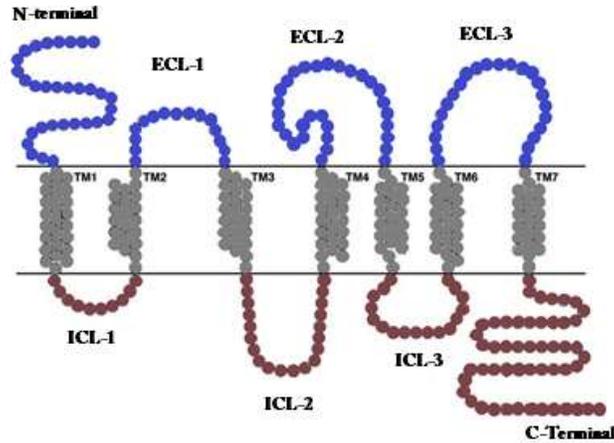
En cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mujeres sanas se ha reportado que tanto la infectividad del VIH como la expresión de los correceptores CCR5 y CXCR4 en mujeres sanas disminuyen de manera inversa a la concentración de progesterona (P) (Vassialiadou, 1999) De manera interesante, en biopsias de cérvix de mujeres sanas tomadas durante el ciclo menstrual, los niveles de CCR5 son menores en la fase secretora (cuando la concentración de P es mayor) comparados con la fase proliferativa (cuando la concentración de P es menor) sugiriendo que la expresión de CCR5 y CXCR4 es susceptible a la regulación por P (Yeaman et al., 2003).

### **3.3. Correceptores del VIH: CCR5 y CXCR4**

Los correceptores CCR5 y CXCR4 son receptores a quimiocinas, las cuales son proteínas de aproximadamente 70-90 aminoácidos y tienen como función principal el actuar como quimio atrayentes de linfocitos, regulan su activación y traslado al sitio de inflamación, además de tener un papel importante en los procesos alérgicos, enfermedades autoinmunes, angiogénesis, desarrollo tumoral y hematopoyético, así como en infecciones como la provocada por el VIH (Suresh et al., 2006).

Las quimiocinas pueden agruparse de acuerdo al arreglo de sus motivos de cisteína cercanos al extremo N-terminal. Los dos grupos principales de quimiocinas son CXC o  $\alpha$ -quimiocinas, en las cuales las dos primeras cisteínas están separadas por un solo residuo, y las CC o  $\beta$ -quimiocinas, en las cuales las cisteínas están en posición adyacente (Berger, 1999). Los receptores a

quimiocinas están compuestos por 340-370 aminoácidos que forman 7 dominios transmembranales, con un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal citoplasmático que contienen motivos críticos para su funcionamiento, y su vía de señalización está dada por medio de proteínas G inhibitoras (Gi) (Fig. 4).

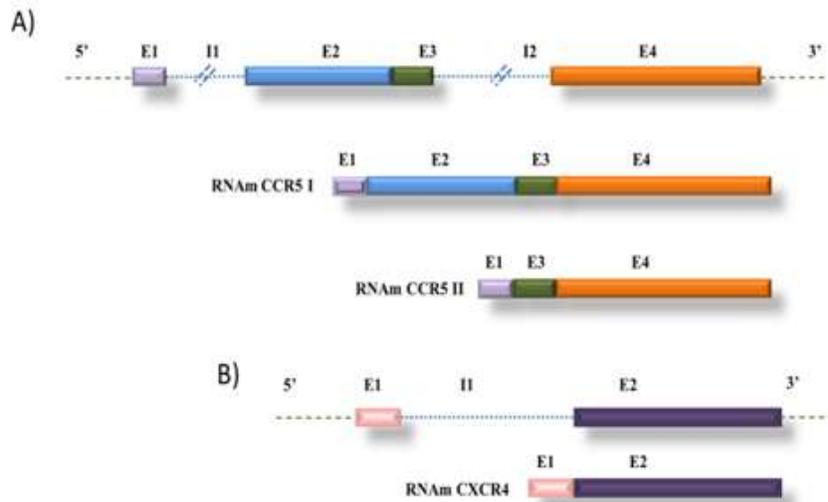


**Figura 4. Estructura general de los receptores de quimiocinas.** En la figura se muestran los dominios que componen a los receptores de quimiocinas. ECL: dominios extracelulares del 1 al 3; TM: Dominios transmembranales del 1 al 7; ICL: dominios intracelulares del 1 al 3.

Los correceptores CCR5 y CXCR4 están presentes en diferentes tipos de células en el organismo, por lo que la cantidad o distribución de estos correceptores en las células determina el tropismo que presenta el VIH, permitiendo no sólo la infección de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, sino también la infección de células importantes en la presentación de antígenos en la respuesta inmune, entre ellas macrófagos y células dendríticas. Este tropismo le confiere al VIH un mecanismo efectivo para ocultar sus epitopes de la acción de anticuerpos y le permite infectar y establecerse en diferentes partes del organismo facilitando su permanencia y la formación de reservorios aún frente a tratamientos antirretrovirales (Stevenson, 2003).

### 3.3.1. CCR5.

CCR5 es un receptor de las  $\beta$ -quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES, las cuales han sido identificadas por su capacidad de impedir la fusión entre VIH M-trópicos y la célula hospedera (Premack., et al, 1996). CCR5 tiene un peso aproximado de 41 KDa (Oppermann, 2004) y está expresado en tejido linfoide como bazo y timo, y también en monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras. En el humano, CCR5 es codificado en el cromosoma 4, posee 4 exones y dos intrones; los exones 1 y 2 están separados por el primer intrón mientras que los exones 2 y 3 se encuentran seguidos y por último los exones 3 y 4 están separados por el segundo intrón. Este correceptor posee dos RNAs alternativos (CCR5I y CCR5II), uno largo que contiene todos los exones y uno corto al que le falta el exón 2, que codifican para una proteína de 356 y 352 aminoácidos, respectivamente (Figs. 5A y 6A).



**Fig 5. Estructura de los genes de los correceptores CCR5 y CXCR4 humanos.** A) Se esquematiza el gen de CCR5 que contiene 3 exones y 2 intrones, en donde los exones del 1 al 4 están señalados con la letra E mayúscula y el número correspondiente a cada exón, las líneas punteadas representan a los intrones, señalados con la letra I mayúscula. Se muestran también los dos RNAm alternativos para dicho correceptor; B) Se esquematiza el gen de CXCR4 que contiene dos exones y 1 intrón, los exones 1 y 2 están señalados con la letra E mayúscula y el número correspondiente a cada exón. Los intrones están señalados como líneas punteadas entre cada exón. También se muestra el RNAm (Modificada de Januchowski et al., 2004; Mumindi et al., 1997; Caruz et al., 1998).

En su extremo N-terminal, CCR5 contiene varios residuos de tirosina adyacentes a aminoácidos con características ácidas. Estos residuos tienen la capacidad de ser modificados postraduccionalmente con la adición de sulfato, lo cual le confiere cargas negativas que facilitan la interacción ligando/receptor (Fig. 6A) (Oppermann, 2004); durante la interacción VIH-célula hospedera, dichas cargas negativas facilitan la interacción de CCR5 con el dominio V3 de la proteína viral, *Env*, del VIH. El correceptor CCR5 es utilizado por el VIH para infectar las células por cepas del tipo M-trópicas las cuales generalmente están presentes en etapas tempranas de la infección o por cepas que tienen la capacidad de utilizar ambos correceptores (R5X4) (Fauci, 2003).

Existe una gran cantidad de mutaciones en el gen que codifica para CCR5, que pueden conferir resistencia o disminución de la susceptibilidad a la infección por el VIH. La delección de 32 pares de bases ( $\Delta 32$ ) en el segundo dominio extracelular del receptor, entre los dominios transmembranales 4 y 5 de CCR5, resulta en la codificación de una proteína de 215 aminoácidos que no se expresa en la membrana celular, debido a ello es una proteína no funcional. Individuos homocigotos a esta mutación presentan resistencia al VIH de tipo R5, en cambio individuos heterocigotos a esta mutación presentan cierta resistencia observándose una lenta progresión de la infección (Suresh, 2006).

In vitro, se ha demostrado que CCR5 pasa a través del retículo endoplásmico para poder expresarse en la membrana celular. CCR5 maduro puede ser post-traduccionalmente modificado por fosforilación y co-traduccionalmente por multimerización. La mutante CCR5 $\Delta 32$ , no puede ser fosforilada, pero si puede formar homodímeros (CCR5 $\Delta 32$ : CCR5 $\Delta 32$ ) o heterodímeros (CCR5 $\Delta 32$ :CCR5 o CCR5 $\Delta 32$ :CXCR4). CCR5 $\Delta 32$  puede actuar como un modulador negativo de CCR5 y de CXCR4. En PBMC de individuos tanto homocigotos como heterocigotos para CCR5 $\Delta 32$  confiere protección contra el VIH debido a que CCR5 $\Delta 32$  puede formar dímeros tanto con CCR5 como con CXCR4, lo que provoca el secuestro de CCR5 o CXCR4 en el retículo endoplásmico y no permite

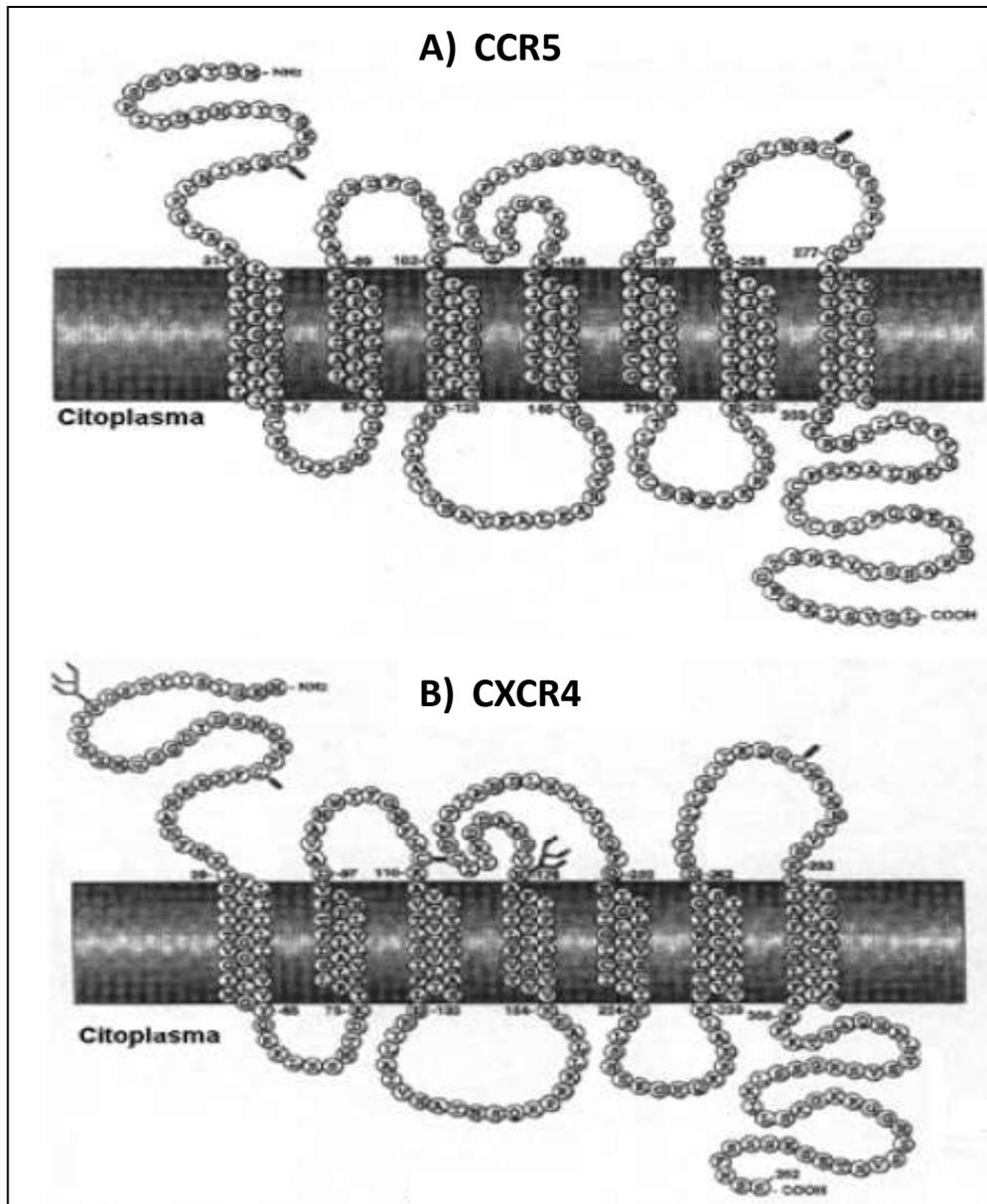
su expresión en la membrana celular (Benkirane M et al., 1997; Agrawa L et al., 2004).

### **3.3.2. CXCR4.**

CXCR4 es un receptor de  $\alpha$ -quimiocinas, cuyo ligando es el factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1). CXCR4, también conocido como Fusina, tiene como funciones principales la activación de células primarias de líneas leucocíticas, la organogénesis, hematopoyesis y la inmunoregulación (Doranz et al., 1999). Este receptor a quimiocinas es uno de los correceptores principales que utiliza cepas del VIH del tipo T-trópico, las cuales se presentan al término de la etapa de latencia y al inicio de la tercera fase de la enfermedad, cuando ocurre una depleción e infección principalmente de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Bleul et al., 1996).

CXCR4 está codificado en el cromosoma 2 en el ser humano y posee sólo dos exones separados por un intrón (Fig. 5B) (Patersen et al., 2006). CXCR4 está altamente expresado en todas las células del sistema inmune como linfocitos T y en células del sistema nervioso (astrocitos, neuronas y células de la microglia) (Lazarini et al., 2000). Es una proteína de 353 aminoácidos con un peso aproximado de 43 KDa (Figura 6B) (Lapham et al., 2004),

Existen condiciones genéticas que alteran la infectividad del VIH y que están relacionados con la interacción CXCR4/SDF-1, como son: la mutación SDF-1 3'á que ocasiona el incremento de la producción de SDF-1 que compite con el VIH por la unión con CXCR4. Personas que son homocigotos para esta mutación presentan una disminución en la progresión a SIDA; sin embargo no muestran algún tipo de resistencia al VIH (Suresh et al., 2006)

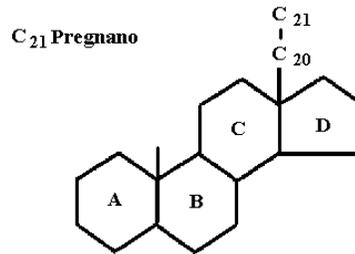


**Fig. 6. Estructura de los correceptores al VIH.** A) Representa la secuencia de aminoácidos que componen a CCR5. B) Representa la secuencia de aminoácidos de CXCR4. Se puede observar los siete dominios transmembranales característicos de los receptores a quimiocinas (Modificada de Oppermann, 2004, Doranz et al., 1998).

Tanto CCR5 como CXCR4 pueden ser regulados por diversos factores, tanto inmunes (MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES, SDF-1, IL-2), como hormonales, como el estradiol (E) y la P (Moriuchi et al., 1997; Wegner et al., 1998; Vassialiadou, 1999; Yeaman et al., 2003, Cabrera-Muñoz et al., 2012).

### 3.4. Estructura y función de la progesterona

La P (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides. Su nombre se deriva del latín, *pr*, a favor y *gestare*, llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción (Pérez-Palacios, et al., 1985). La estructura química base de la P y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21; Fig. 7).

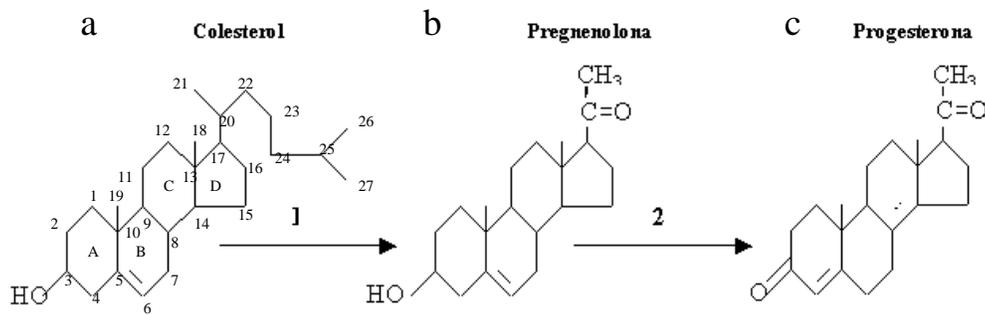


**Fig. 7. Pregnano.** Estructura del pregnano. Las letras indican cada uno de los anillos de la estructura principal de las hormonas esteroides (Gore-Langton et al., 1988).

La P se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo del ovario (Hsue et al., 1984; Hutchison et al., 1986); también se ha demostrado la síntesis de P en otros órganos, como la corteza adrenal, la placenta (Goroscope et al., 1985; Perrot-Appianat et al., 1982), el testículo, (Weisz et al., 1980; Dalkin et al., 1992) y el cerebro (Zwain y Yen, 1999; Ukena, et al., 1999). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas, como la luteinizante (LH), la folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina (Graham et al., 1997). La síntesis de P se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P (Fig. 8).

La P participa en un amplio rango de funciones en diferentes tejidos, entre los que se encuentran el útero y el ovario donde participa en la liberación del ovocito, facilita la implantación, mantiene el embarazo y estimula la regeneración

del estroma; en la glándula mamaria aumenta el desarrollo alveolar; en el cerebro regula la respuesta sexual, reduce la excitabilidad neuronal, aumenta el sueño y tiene efectos neuroprotectores (Susuki et al., 1994; Graham y Clarke, 1997; Rotchild et al., 1983; Clarke, 1993; Topper et al., 1980; Camacho-Arroyo et al., 1994; Camacho-Arroyo et al., 1995; González et al., 1998; Vongher y Frye, 1999). Además, se ha descrito que la P está implicada en procesos de la regulación de la masa ósea y en la involución del timo. La P también está relacionada con la regulación de la respuesta inmune, teniendo efecto sobre la migración y la proliferación de linfocitos en el tracto genital femenino, la inhibición de fagocitosis por macrófagos, actividad de células NK, secreción de citocinas y la inducción de la respuesta inmune de linfocitos T tipo 2 (Cu-Uvin et al., 2000, Vassiliadou et al., 1999, Mannel et al., 1990, White et al., 1997).

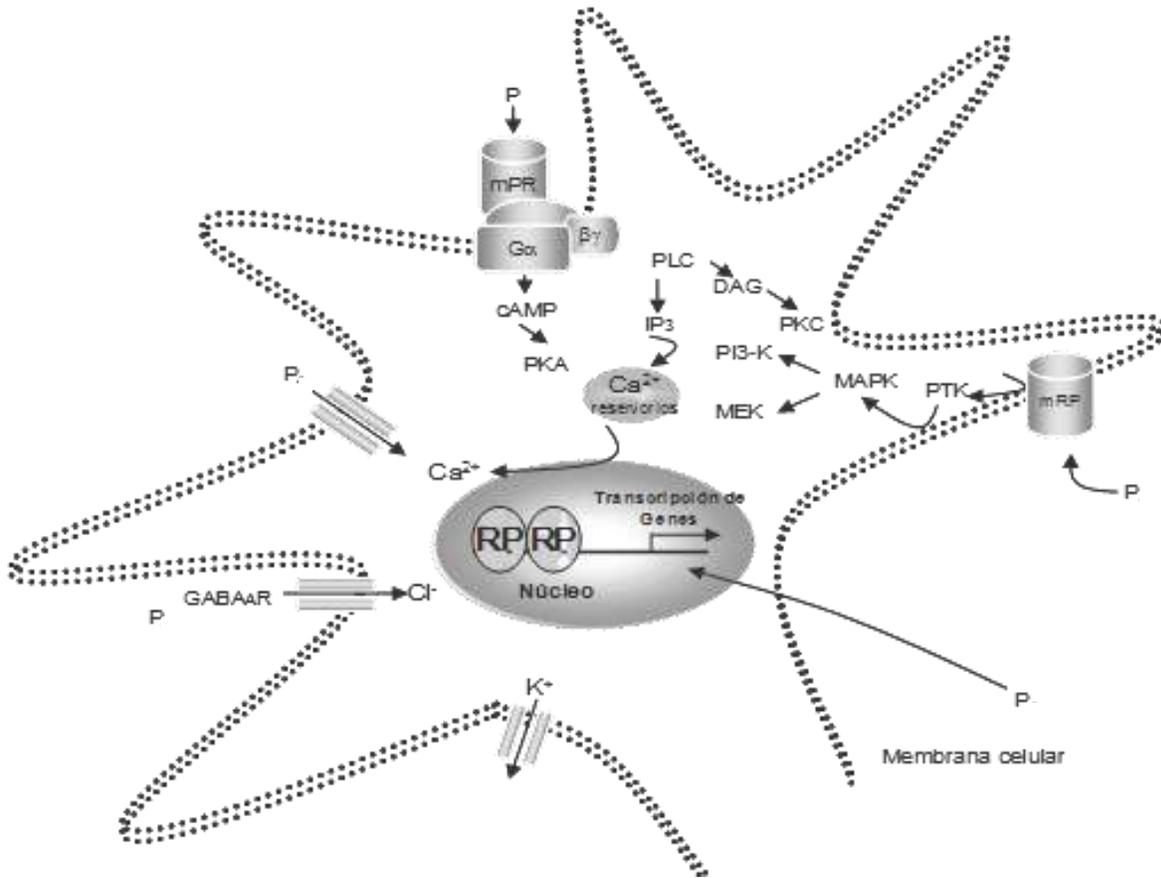


**Fig. 8. Biosíntesis de la P.** La biotransformación de colesterol a P implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17. b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3. c) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A. 1) 20,22 esteroide liasa; 2)  $3\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa (Gore-Langton et al., 1988).

### 3.4.1. Mecanismos de acción de la P

Se han determinado dos mecanismos de acción, el genómico y el no genómico, por los cuales la P actúa en la célula. El mecanismo genómico involucra la unión de la P su receptor intracelular (RP) y así regula la transcripción de genes específicos. El mecanismo no genómico involucra la acción de la P sobre la membrana plasmática mediante su interacción con receptores a neurotransmisores como el  $GABA_A$  o con receptores membranales a P (mRP), lo

cual modifica la conductancia de iones, induce la formación de segundos mensajeros como el AMPc, así como la activación de la fosforilación de proteínas, (Fig. 9) (Camacho-Arroyo, 2003).



**Fig. 9. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P.** Los efectos de la P ocurren por 2 diferentes mecanismos celulares: 1) en la membrana, incluyen receptores membranales y canales, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares; 2) en el núcleo donde receptores a P (RP), que son moduladores directos de la expresión génica, mediante la interacción del complejo hormona-receptor con elementos de respuesta hormonal, ubicados en las regiones promotoras de los genes blanco en el DNA. G: Proteína G,  $\alpha\beta\gamma$ : Subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinas A, GABA<sub>A</sub>R: Receptor a GABA tipo A, RP: Receptor intracelular a P, mRP: Receptor membranar a P, PLC: Fosfolipasa C, IP<sub>3</sub>: Inositol Trifosfato, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinas C, PI3-K: Cinas de Inositol Trifosfato, PTK: Proteína de Tirosina Cinas, MAPK: Proteína Cinas Activada por Mitógeno, MEK: Cinas de MAPK, Cl<sup>-</sup>: Cloro, Ca<sup>2+</sup>: Calcio, K<sup>+</sup>: Potasio (Tomada de Camacho-Arroyo, 2003).

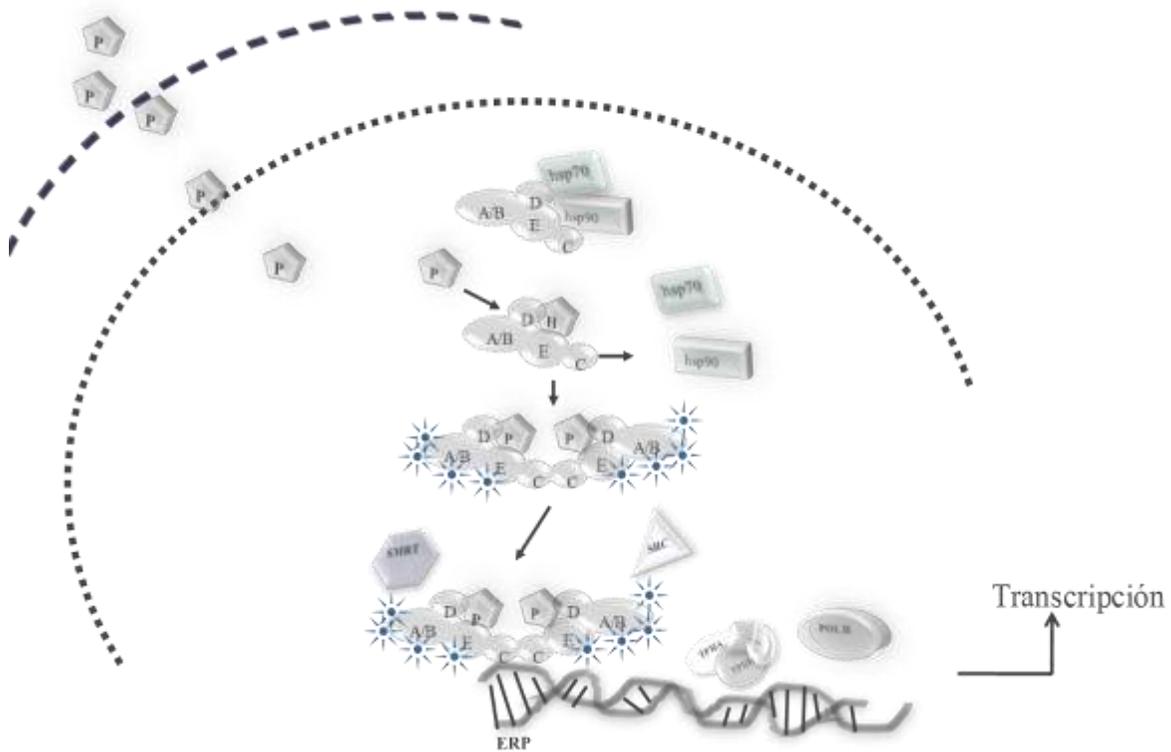
Zhu y *col.* detectaron en el genoma de diferentes especies, como el ratón, el cerdo y el humano, genes que codificaban para proteínas de membrana

plasmática con siete dominios transmembranales y que podían dividirse en tres grupos denominados mRP $\alpha$ , mRP $\beta$  y mRP $\gamma$  (Zhu *et al.*, 2003). En el humano estas proteínas están codificadas en los cromosomas 1, 6 y 15 respectivamente.

La vía genómica es la más estudiada, en ésta la P interactúa con su RP, el cual dimeriza e interactúa con elementos de respuesta a P (ERP) ubicados en los promotores de los genes blanco (Camacho–Arroyo, 2003).

En ausencia del ligando el RP forma complejos con proteínas chaperonas, entre ellas proteínas de choque térmico (40, 70 y 90) y ficobilinas (FKBP51 y KKBP52) y p23 (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006). Una vez que la P se une a su receptor éste presenta cambios conformacionales que le permiten la disociación de las proteínas chaperonas; se activa al receptor exponiendo la región que le permite dimerizarse, lo que resulta en una estructura con alta afinidad por secuencias específicas de DNA llamadas elementos de respuesta hormonal (ERH). Los ERH son secuencias palindrómicas de DNA separadas por tres nucleótidos en donde dos receptores se unen simétricamente a cada mitad de la secuencia como un homodímero cooperativo. Una vez unido al HRE, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por hormonas esteroides, favoreciendo así la transcripción de genes blanco.

Estos receptores nucleares interactúan con corre reguladores que pueden: 1) modificar la estructura de la cromatina y 2) favorecer la interacción de manera indirecta del receptor con los factores generales de transcripción y la RNA polimerasa II (Fig. 10) (Prieto *et al.*, 2003; Burris y McCabe, 2001).

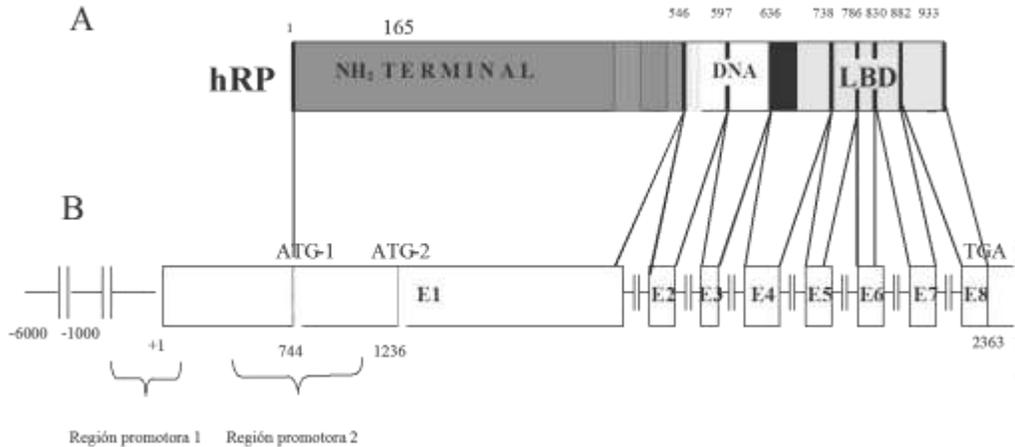


**Fig. 10. Mecanismo de acción genómica de la P.** El RP intracelular está presente en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico (HSP); cuando la P se une al RP, las HSP se disocian y el RP presenta cambios conformacionales que le permiten unirse a un elemento de respuesta hormonal (HRE), reclutar a cofactores y a la maquinaria basal de transcripción (MBT), lo cual modifica la transcripción del gen blanco. El complejo formado puede reclutar otros corre reguladores al promotor como el SRC-1 que: 1) abren la estructura de la cromatina a través de su actividad de histona acetil transferasa en el caso de los coactivadores; si se reclutan correpresores como SMRT, se presenta una estructura más compacta de la cromatina por la actividad de histona desacetiltransferasa, y 2) contribuir a la estabilización del complejo de pre-iniciación (Cabrera-Muñoz et al., 2009).

### 3.4.2. Características del Receptor Intracelular de P (RP)

El RP pertenece a la familia de receptores a hormonas esteroides, cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner et al., 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes a través de la interacción con secuencias específicas en el DNA (elementos de respuesta hormonal). Este receptor presenta dos isoformas: una

larga denominada RP-B y una corta denominada RP-A (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Ambas isoformas se generan a partir del mismo gen pero son reguladas por distintas regiones promotoras (Fig. 11).

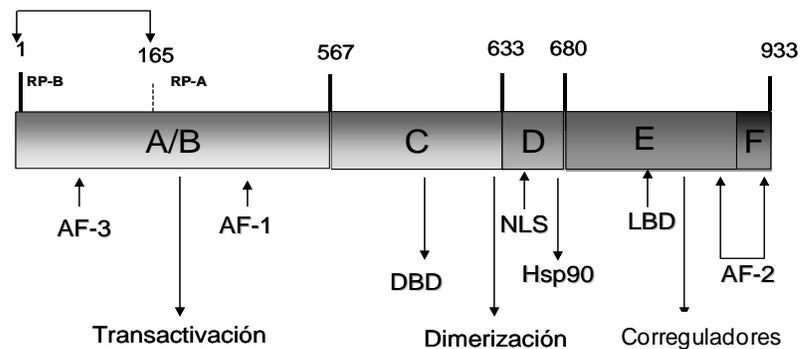


**Fig. 11. Estructura del gen del RP humano.** A) Se esquematiza el RP del humano (hRP). La secuencia de aminoácidos del hRP está dividida en 4 dominios: el dominio amino terminal señalado en color gris oscuro, el dominio de unión al DNA señalado en color blanco, el dominio bisagra señalado en color negro y el dominio de unión al ligando (LBD) señalado en color gris claro. Las funciones de cada uno de estos dominios se describen en el texto. Los límites de los exones están indicados con líneas verticales gruesas de color negro que corresponden a las posiciones de los aminoácidos, los cuales están señalados con números en la parte superior. B) Se esquematiza el gen del hRP que contiene dos regiones promotoras, 8 exones y 7 intrones, en donde los exones del 1 al 8 están señalados con la letra E mayúscula y el número correspondiente a cada exón. Los intrones están señalados como líneas interrumpidas entre cada exón. La región promotora 1 se encuentra ubicada de la posición  $-711$  a  $+31$  y la 2 en la posición  $+464$  a  $+1105$ . Se señalan las dos posiciones de inicio de la traducción (ATG) y la de término (TGA) (Misrahi et al., 1993).

En los mamíferos, específicamente en el humano, el gen del RP está localizado en el cromosoma 11p22-23. El tamaño de éste es de aproximadamente 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Fig. 11) (Misrahi et al., 1993), su RNAm es de 3014 pb (Theveny et al., 1987).

Estructuralmente, las isoformas del RP están compuestas por cuatro dominios que llevan a cabo las siguientes funciones (Fig. 12):

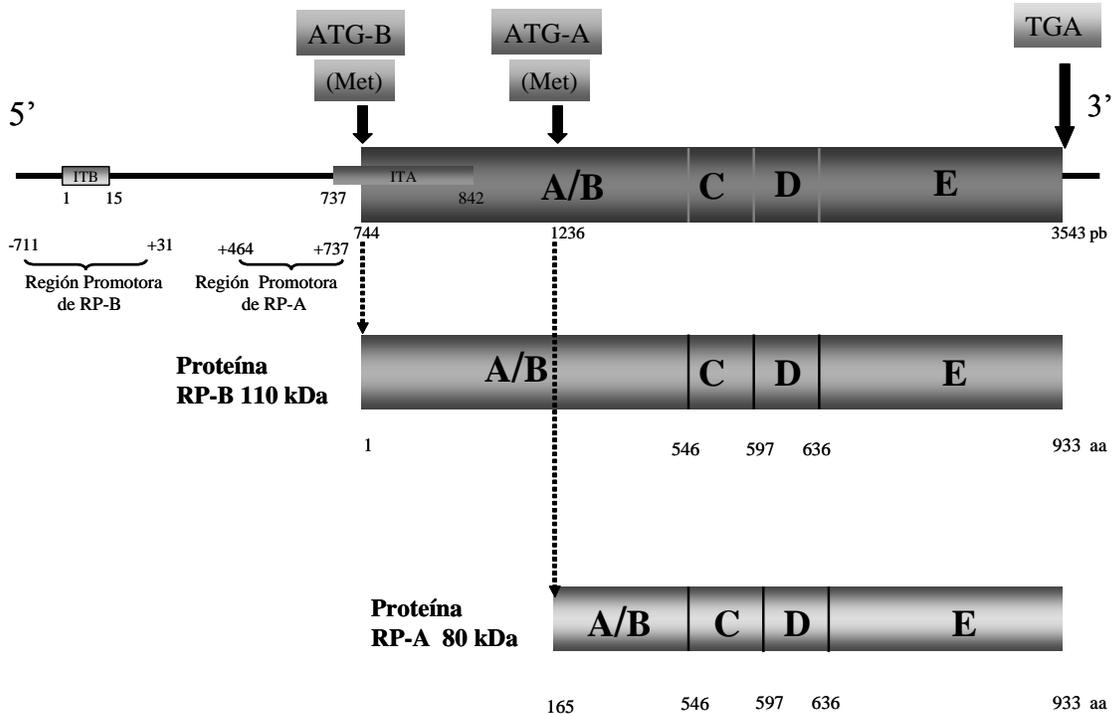
1. **Dominio NH<sub>2</sub> terminal (A/B):** Se codifica a partir del exón 1 (2380 pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco ya que contiene funciones de transactivación.
2. **Dominio de unión al DNA (C):** Se codifica a partir de los exones 2 (152 pb) y 3 (117 pb). Participa en la dimerización con otro receptor y en la unión al DNA a través de la presencia de dedos de Zinc.
3. **Dominio bisagra (D):** Se codifica a partir del exón 4 (306 pb). Participa en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas de choque térmico como Hsp90 y en la localización nuclear, ya que contiene la secuencia del péptido señal de localización nuclear (NLS).
4. **Dominio de unión al ligando (E):** Se codifica a partir de los exones 5 (145pb), 6 (131pb), 7 (158pb) y 8 (153 pb). Participa en la interacción con el ligando y en la regulación de la transcripción, ya que contiene una función de transactivación.



**Fig. 12 Esquema representativo de los dominios del RP.** A-E dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroideas. AF: función de activación, DBD: dominio de unión al DNA, LBD: dominio de unión al ligando; NLS: Sitios de localización nuclear.

### 3.4.3. Isoformas del RP

El RP presenta dos isoformas, una larga denominada RP-B (114 kDa en humano) y una truncada llamada RP-A (94 kDa en humano). RP-A es la forma truncada de RP-B, ya que no contiene 164 aminoácidos en la región amino terminal que si contiene RP-B (Fig. 13). Ambas isoformas se han identificado en diversas especies de roedores, primates y aves (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo; 2000), con excepción del conejo, en el cual solo se ha detectado RP-B (Loosfelt et al., 1986).



**Fig. 13. Esquema representativo de las isoformas del RP.** ITB: Sitio de inicio de la transcripción del RP-B; ITA: Sitio de inicio de la transcripción del RP-A; ATG-B: Codón de inicio de la traducción del RP-B; ATG-A Codón de inicio de la traducción del RP-A; TGA: Codón de terminación de la traducción del RP; A-E: Dominios funcionales del RP.

En el ser humano y en la rata ambas isoformas del RP son codificadas por el mismo gen, pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas, una distal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-B) y otra proximal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-A, que dan lugar a diferentes mRNA (Kastner et al., 1990, Kraus et al., 1993) (Fig. 13).

Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad para la P y los elementos de respuesta a P (ERP) (Christensen et al., 1991). El RP tiene la capacidad de unirse al DNA en sus tres especies diméricas: dos homodímeros (AA o BB) y un heterodímero (AB). Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros de RP y cuando éstos interactúan con agonistas y antagonistas (Leonhardt et al., 1998).

Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroides (Vegeto et al., 1993; Tung et al., 1993; Sartorius et al., 1994; Clemm et al., 1995). Lo anterior se debe a que RP-A tiene mayor afinidad por correpresores como SMRT, mientras que RP-B es más afín por coactivadores como SRC-1 (Giangrande et al., 1999).

Se ha determinado que las diferencias en la actividad transcripcional de las isoformas del RP se deben a distintos factores:

1. RP-A carece de los primeros 164 aminoácidos presentes en la isoforma B (Graham et al., 1995).

2. La existencia de tres regiones con funciones de activación (AF1, AF2 y AF3). AF1 y AF2 están presentes en ambas isoformas, mientras que AF3 solamente se encuentra en el RP-B (Giangrande et al., 1997) (Figs. 12 y 13).
3. La presencia de una región con función inhibidora localizada en la región adyacente a AF que sólo es funcional en RP-A. Estudios recientes han demostrado que esta región bloquea la activación de la transcripción mediada por AF1 y AF2, pero no por AF3, presente en RP-B (Huse et al., 1998; Wen et al., 1994).
4. Los homodímeros son más estables que los heterodímeros. En cuanto a la actividad, los homodímeros B:B son mejores activadores de la transcripción que los heterodímeros B:A, mientras que los homodímeros A:A son los que presentan la menor actividad transcripcional (Leonhardt et al., 1998).
5. El RP humano es fosforilado al menos en catorce residuos, seis de estos sitios sólo se encuentran en el RP-B mientras que los otros ocho los comparten ambas isoformas (Knotts et al., 2001). La diferente distribución y regulación de estos sitios de fosforilación en las isoformas del RP puede conferirles diferentes estados conformacionales, que los pueden hacer más o menos afines por las secuencias blanco y regular la transcripción de un gen.
6. RP-A presenta mayor afinidad por el correpresor SMRT mientras que RP-B tiene mayor afinidad por el coactivador SRC-1. Por otro lado, RP-A es incapaz de reclutar eficientemente a los coactivadores transcripcionales como la proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides-1 (GRIP-1) y SRC-1 (Giangrande et al., 1999).

Estas observaciones llevan a sugerir que una alteración en la expresión o actividad de las isoformas del RP puede tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la P. La tasa de expresión de las dos isoformas varía en diferentes órganos y tejidos blanco (Ing et al., 1993, Graham y Clarke, 1997; Camacho-Arroyo, 2003), lo que sugiere que la expresión diferencial puede ser crítica para la respuesta celular a la P (Camacho-Arroyo et al., 1998).

### **3.5. Papel de la P en la infección por VIH.**

En las mujeres la variación en los niveles hormonales durante el ciclo menstrual tiene efectos sobre las propiedades y el número de células del sistema inmune, secreción de citosinas y quimiocinas, producción de anticuerpos y en el proceso de presentación de antígenos (Asin et al., 2008), lo cual puede influir en la respuesta a diversas infecciones, entre ellas el VIH.

Datos epidemiológicos sugieren la existencia de diferencias en los niveles de carga viral y en la cuenta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> relacionadas con el género. Se ha observado que las mujeres presentan un mejor pronóstico en etapas tempranas de la infección comparado con los hombres, aunque una vez establecida la infección este comportamiento se revierte, presentándose una mayor progresión hacia SIDA en mujeres respecto a los hombres (Farzadegan et al., 1998; Collazos et al., 2007; Sterling et al., 2005).

#### **3.5.1. Efecto de la P sobre el contenido de CCR5 y CXCR4**

Existe evidencia que indica la existencia de regulación tanto de CCR5 como de CXCR4 por hormonas sexuales en tejido reproductivo y en sangre periférica de sujetos sanos (Patterson et al., 1998; Vassialiadou et al., 1999; Yeaman et al. 2003; Chao et al., 2006; Prakash et al., 2002; Ruíz et al., 2010; Díaz et al., 2007; Larid et al., 2011). Los datos reportados acerca de la regulación de CCR5 y

CXCR4 por hormonas sexuales y anticonceptivos orales son contradictorios y dependen del tejido, el estado de activación inmune y la concentración hormonal.

Se ha reportado que en biopsias de endometrio obtenidas de mujeres sanas, la expresión del RNAm de CXCR4 fue mayor en la fase proliferativa del ciclo menstrual, cuando los niveles de P son menores (0.15-1.4 ng/ml), comparada con la fase secretora, cuando los niveles de P son altos (1.6-23 ng/ml) (Larid et al., 2011). Además, en líneas celulares endometriales, la expresión del RNAm de CXCR4 fue regulada negativamente por P (Ruíz et al., 2010). Por otro lado, la regulación positiva de CCR5 en la placenta se ha asociado a un incremento en la transmisión vertical del VIH-1, de madres a hijos (Díaz et al., 2007).

En células epiteliales de útero de mujeres sanas, la expresión del receptor CD4 y de los correceptores CCR5 y CXCR4 fue diferente durante las etapas del ciclo menstrual. Durante la fase secretora del ciclo menstrual, el número de células positivas a CXCR4 fue mayor que en la fase proliferativa del ciclo menstrual en tanto que CCR5 se comportó de manera opuesta, es decir, el número de células positivas a CCR5 es mayor durante la fase proliferativa y menor durante la fase secretora (Patterson B et al., 1998; Yaeman GR et al., 2003). Por otro lado, *in vitro* se ha observado que la P (10  $\mu$ M) disminuyó la expresión de CCR5 y CXCR4 en PBMCs de mujeres sanas (35% y 42%, respectivamente). Además P (10  $\mu$ M) ocasionó una inhibición en la infección de linfocitos T por virus tanto T-trópicos como M-trópicos (Vassiliadou et al., 1999)

Hasta el momento, los datos reportados sobre la regulación de CCR5 y CXCR4 por P se han realizado únicamente en mujeres sanas, por lo que se desconoce si existe un efecto similar en mujeres VIH positivas y expuestas no infectadas (ENI).

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se desconoce el papel de la P en la regulación de la expresión de los correceptores del VIH (CCR5/CXCR4) en células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectadas con VIH, así como los mecanismos de acción de dicha hormona en estas células.

#### **V. HIPÓTESIS**

1. Si la P participa en la regulación de los correceptores CCR5 y CXCR4 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectadas con VIH (PT) y ENI, entonces la administración de la hormona modificará su expresión.
2. Ya que los efectos de la P sobre la expresión de CCR5 y CXCR4 de PBMC de mujeres sanas se han observado a tiempos mayores o iguales a 24 horas, dichos efectos podrían estar mediados por su receptor intracelular (RP); de ser así, el uso de un antagonista del RP (RU486) revertirá los efectos de la hormona sobre la expresión de los correceptores al VIH.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1. General**

Estudiar el papel de la P y de su receptor intracelular en la regulación de los correceptores CXCR4 y CCR5 en células mononucleares de sangre periférica en PT y ENI.

### **6.2. Objetivos particulares**

1. Determinar los niveles de estradiol (E) y P en mujeres SN, PT y ENI durante la fase proliferativa del ciclo menstrual.
2. Estudiar la expresión de las isoformas del RP (RP-A y RP-B), CXCR4 y CCR5 en células mononucleares de sangre periférica de mujeres SN, PT y ENI durante la fase proliferativa.
3. Conocer el efecto de la P sobre la expresión de CXCR4 y CCR5 en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica de mujeres SN, PT y ENI.
4. Determinar si el RP participa en la regulación de la expresión de CXCR4 y CCR5 en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica de mujeres SN, PT y ENI.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de pacientes seropositivas con progresión típica (PT) y de ENI que acudieron al Departamento de Infectología en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todas las participantes en el estudio cumplieron con los criterios de inclusión requeridos para el estudio.

***Criterios de inclusión para el estudio.*** Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

*Mujeres infectadas con VIH y ENI:* Edad de 18 a 40 años y presencia de al menos 4 ciclos menstruales regulares.

Progresores típicos: Cuenta de  $CD4^+$   $< 400/mm^3$  o disminución del 20% en 6 meses y menos de 5 años de diagnóstico y HAART, sin administración de bloqueadores de CCR5.

Expuestos no infectados (ENI): Al menos 3 contactos sexuales sin protección con pareja (s) infectadas con VIH 1 año antes del estudio a la fecha.

***Criterios de exclusión para el estudio.*** Los donadores cumplieron con los siguientes criterios de exclusión:

*Mujeres Infectadas con VIH y ENI:* Administración de hormonas sexuales (anticonceptivos hormonales) en el último año, gonadectomía o administración de medicina herbolaria. En el caso de los ENI haber presentado contactos sexuales con protección (condón).

En todos los casos se determinó la fase del ciclo menstrual mediante la medición de los niveles de E y P por inmunoensayo. Las muestras fueron tomadas durante la fase menstrual del ciclo y se aislaron PBMCs.

### **7.1. Toma de muestra y separación de PBMCs en gradiente de Ficoll.**

Se colectó una muestra de 20 ml de sangre venosa de donadoras seronegativas (SN), PT, así como de ENI. Las muestras de sangre fueron tomadas durante la fase menstrual. La muestra permaneció a temperatura ambiente en un tubo con EDTA para la separación de suero y de las PBMCs en un gradiente de Ficoll.

Los sueros se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y las PBMCs de los donadores SN, PT y ENI, se almacenaron en medio de congelación (suero fetal bobino, SBF, suplementado con dimetilsulfóxido, DMSO, al 10%) a la misma temperatura.

### **7.2. Determinación de concentraciones hormonales**

Se determinaron los niveles de estradiol y progesterona de donadores SN, PT y ENI mediante el método de radioinmunoensayo (RIA). Se utilizó un kit COATA-COUNT (Diagnostics products corporation, Los Angeles, EU) para la determinación de los niveles de E y P.

En este ensayo se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpos contra E o P, a los cuales se les agregaron 100  $\mu\text{l}$  de los calibradores para realizar una curva estándar o 100  $\mu\text{l}$  de la muestra más 1 ml de P marcada radiactivamente con  $^{125}\text{I}$ . Las muestras se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora en baño maría y posteriormente se decantaron. Se dejaron secar por aproximadamente 15 minutos y se llevaron a un contador de radiactividad  $\gamma$ , donde se leyó cada muestra por espacio de 1 minuto. Cada muestra se analizó por triplicado.

### 7.3. Cultivo celular.

Se realizó el conteo de PBMCs en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) para obtener  $5 \times 10^6$  células/ml y se colocaron en medio de estimulación (RPMI-rojo fenol suplementado con suero bovino fetal al 10%, fitohema-aglutinina A-L, PHA-L, e interleucina 2, IL-2). Las células se incubaron en botellas de cultivo de  $72 \text{cm}^3$  a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y humedad durante 48 horas.

Posterior a la incubación con el medio de estimulación se realizaron 3 lavados con DPBS y se agregó medio RPMI sin rojo fenol y suplementado con SBF libre de hormonas al 10%; las células se incubaron durante 24 horas en las condiciones ya mencionadas.

Para estudiar los efectos de la P sobre el contenido de los correceptores CCR5 y CXCR4 se utilizaron los siguientes compuestos: Vehículo de las hormonas (V): ciclodextrina (0.02%) en agua estéril; P (10 y 100 nM) acoplada a ciclodextrina y el antagonista de P, RU486 (1  $\mu\text{M}$ ). Los cultivos se dividieron en los siguientes grupos:

1. Vehículo de la hormona, 24 h.
2. P, 24 h.
3. RU, 24 h.
4. P + RU, 24 h.

Una vez concluidos los tratamientos, las células fueron colectadas con DPBS a  $4^\circ\text{C}$  y centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el botón celular obtenido se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ .

## **7.4. Determinación del contenido de CCR5, CXCR4 y RP.**

### **7.4.1. Extracción de proteínas totales**

Las células se colocaron en buffer de lisis TDG con un coctel de inhibidores de proteasas (10 mM Tris-HCl, 1 mM ditioneitol, 30% glicerol, 1% Triton X-100, 15 mM azida de sodio, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 4 µg/ml leupeptina, 22 µg/ml aprotinina, 1 mM PMSF) a 4°C.

Las muestras fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 45 min, a 4°C y se separó el sobrenadante. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### **7.4.2. Western Blot**

Las proteínas obtenidas de las células (120 µg) se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% a 80 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparó con buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto-etanol 5%) en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 min. para depositarse en los geles antes mencionados. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 60 mA, durante 2 horas en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas se bloquearon por 20 minutos a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 10% en TRIS buffer salino 1X (TBS).

Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti RP (2 µg/ml) (NeoMarkers RB-1492-P, Fremont, CA), anti CXCR4 (5 µg/ml) (IgG-HRP Fusin H-118, Santa-Cruz sc-9046), anti CCR5 (1 µg/ml) (IgG-HRP CKR5, Santa-Cruz sc-17833). Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween (TBS (pH=7.4) +Tween al 0.1%) 3 veces por 5 minutos. Las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes anti-

conejo (IgG-HRP, Santa-Cruz sc-2749) o anti-cabra (IgG-HRP, Santa-Cruz sc-2033) conjugado a peroxidasa, ambos en una dilución de 1:10 000. Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol más un activador son sustrato de la peróxidasa acoplada al anticuerpo secundario, que cuando reacciona genera una señal de quimioluminiscencia, la cual es detectada por placas autoradiográficas.

Para normalizar las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada, se realizó la determinación de  $\alpha$ -tubulina (0.2  $\mu$ g/ml) (Sigma T9026, Saint Louis, MO) conjugado a peroxidasa, en una dilución 1:5000, por medio de la técnica de western blot como se describió previamente.

## **7.5. Determinación de la expresión de CCR5 y CXCR4**

### **7.5.1. Extracción de RNA total.**

Concluido el tiempo de incubación con los tratamientos antes mencionados, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS. Una vez obtenido el botón celular se extrajo el RNA total mediante un kit de extracción (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen). El botón del RNA se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua libre de RNAsas y las muestras se guardaron a -70°C hasta su análisis.

### ***Oligonucleótidos***

Los siguientes pares de oligonucleótidos fueron diseñados con el programa Clone Manager y sintetizados por Invitrogen para la detección de los correceptores CCR5 y CXCR4 así como para el control de carga RNAr 18S:

Oligo	Secuencia
Oligo CCR5 Sense	5'-GGGTGGAACAAGATGGATTATCAAGTGTCA-3'
Oligo CCR5 Antisense	5'-GAAAATGAGAGCTGCAGGTGTAATGAAGAC-3'
Oligo CXCR4 Sense	5'-CCACCAACAGTCAGAGGCCAAGGGAAGCTGT-3'
Oligo CXCR4 Antisense	5'-TCTGTGTTAGCTGGAGTGAAAACCTTGAAG-3'
Oligo RNAr 18S sentido	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'
Oligo RNAr 18S antisentido	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'

### 7.5.2. RT-PCR

Las muestras de RNA total obtenidas se utilizaron para la síntesis de cDNA por retrotranscripción, seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Brevemente, en tubos libres de nucleasas se agregaron 5 µg de RNA total, 1 µl de Oligo-dT (Invitrogen) (diluido 1:5, 500 µg/ml) y 1 µl de dNTPs (10 mM). La reacción se incubó a 65°C por 5 min e inmediatamente se pasó a hielo. Se agregaron 2 µl de DTT (0.1 M), 4 µl buffer de reacción 5X (Invitrogen) y 1 µl de RNasa out (Invitrogen). La reacción se incubó a 42°C durante 2 min y posteriormente se agregó 1 µl (200 U) de la enzima retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV RT) (Invitrogen). Finalmente, la reacción se incubó a 37°C durante 50 min y posteriormente se inactivó a 70°C por 15 min.

Utilizando 10 µl de producto de RT, se prepararon reacciones para la amplificación de CCR5 y CXCR4. En tubos libres de nucleasas se agregaron 5 µl de buffer de reacción 10X (Invitrogen), 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 20X (ROCHE), 1 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), 0.25 µl de AmpliTaq Gold-Polimerasa (ROCHE) (5 U/µL), 1.5 µl de dNTPs (10 mM), 3.3 µl de oligonucleótido sentido (15 µM) y 3.3 µl de oligonucleótido antisentido (15 µM). En la misma PCR se asignó un control negativo de reacción sin cDNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystem) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 10 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 59 °C o 61°C (T<sub>m</sub>) para CCR5 o CXCR4, respectivamente y 1 min a 72°C. Por último, 10 min a 72°C. Las

muestras se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. Para la detección de los correceptores se cargaron 25 µl del producto de la PCR en buffer de carga (6X) para DNA (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol) en un gel de agarosa al 2% (0.3 x 10<sup>4</sup>- mg/mL de bromuro de etidio) y las muestras se separaron a 90 V por 1.5 horas.

### **7.6. Análisis de resultados**

Tanto las placas obtenidas del Western blot, como las fotografías del RNAm, fueron sometidas a un análisis densitométrico utilizando el equipo Scan Primax 600p (Colorado, EU) y el programa Chemiimager 4400 para cuantificar la expresión de RP-A, RP-B, CXCR4, CCR5, RNAr 18S y  $\alpha$ -tubulina, de acuerdo a la intensidad de cada banda. Para cada experimento los datos obtenidos de las proteínas o el RNA mensajero de interés se corrigieron con los de  $\alpha$ -tubulina o RNAr 18S, respectivamente.

Las concentraciones de E y P obtenidas del RIA se promediaron y se realizó el análisis estadístico para comparar entre los grupos.

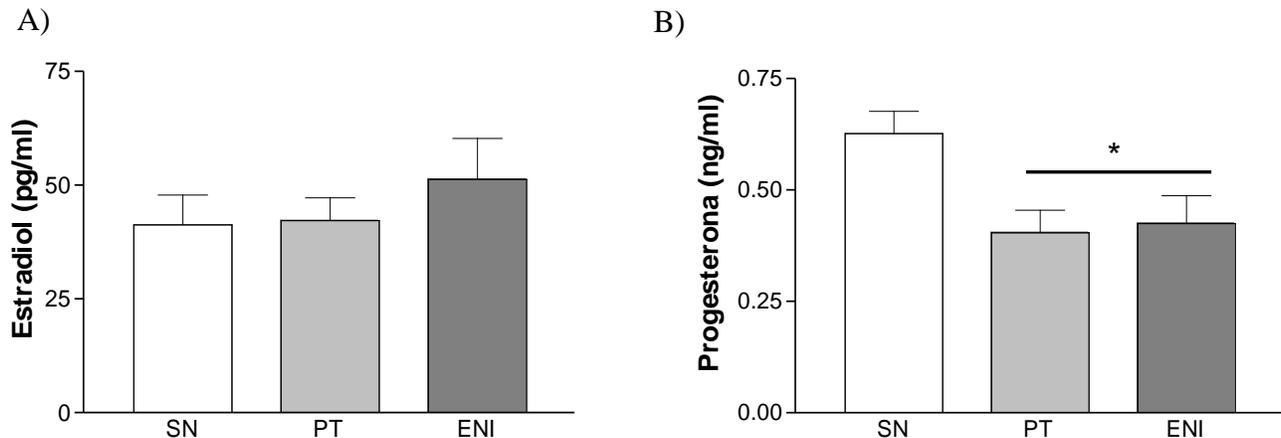
Los datos obtenidos de las concentraciones de E y P, así como las lecturas densitométricas del RNA y la proteína fueron analizadas utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, C.A. U.S.A.), para calcular los valores de probabilidad. Se consideró una  $p < 0.05$  para establecer las diferencias significativas. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SE.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. Niveles hormonales en mujeres seronegativas, progresoras típicas y expuestas no infectadas.

Una vez tomada la muestra de sangre a las donadoras, se separó el paquete celular y el plasma por centrifugación. Posteriormente se determinaron los niveles de E y P para verificar la fase del ciclo menstrual de las donadoras. Se determinó que todas las donadoras se encontraron en fase folicular tomando sólo cuando los niveles de E entre 20 y 200 pg/ml y P entre 0.15-1.4 ng/ml.

En la figura 14 se muestran las gráficas de los niveles hormonales de E y P de donadoras SN, PT y ENI en fase folicular del ciclo menstrual. En los resultados obtenidos se observó que no existen diferencias entre los grupos en los niveles de E (Fig. 14 A), mientras que los niveles de P fueron significativamente menores en PT y ENI respecto a SN (Fig. 14 B).

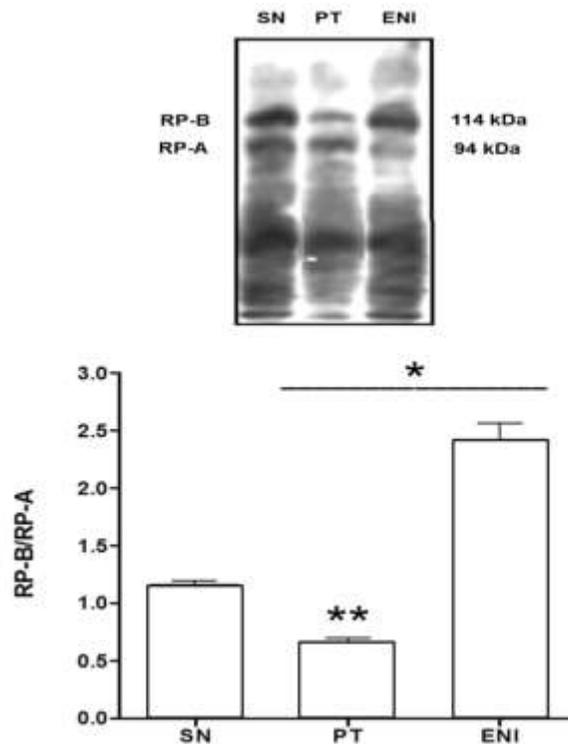


**Fig. 14. Niveles de E y P de individuos seronegativos (SN), progresores típicos (PT) y expuestos no infectados (ENI) en fase proliferativa del ciclo menstrual.** Las hormonas fueron detectadas mediante RIA. SN n = 20; PT n=17; ENI n= 8. \*p<0.05 vs SN.

## 8.2. Contenido basal de las isoformas del RP en mujeres seronegativas, progresoras típicas y expuestas no infectadas.

Para determinar la presencia del RP y analizar las isoformas presentes en PBMCs, se tomó una muestra sanguínea (8 ml), a las diferentes donadoras y las PBMCs fueron separadas y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se extrajeron las proteínas totales y se realizó la inmunodetección de las isoformas del RP por medio de la técnica de Western Blot, como se mencionó en la metodología.

En la siguiente figura (Fig.15) se muestra un western blot representativo de las muestras analizadas donde se localizaron dos bandas, una banda de 114 KDa correspondiente a RP-B y otra banda de 94 kDa que corresponde a RP-A.



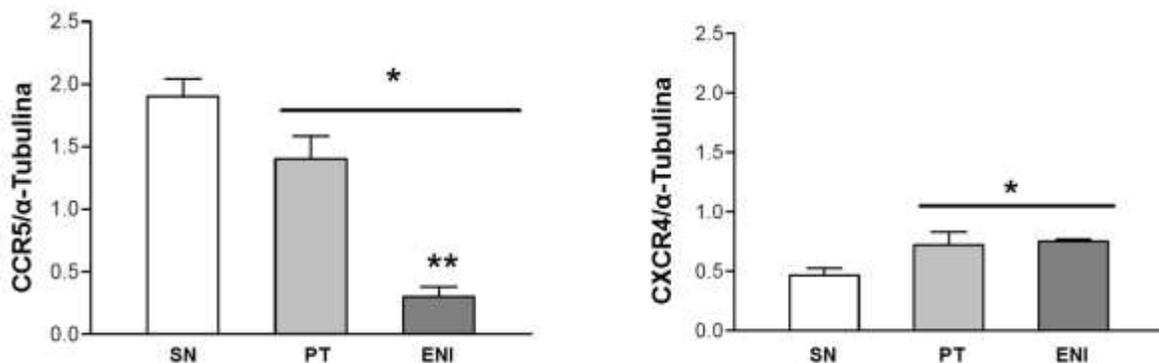
**Fig. 15. Detección por Western blot de las isoformas del RP en PBMC de SN, PT y ENI, sin tratamientos.** Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico. SN: n=5; PT: n=7; ENI: n=4. \* $p < 0.05$  vs SN; \*\* $p < 0.05$  vs ENI.

Como se puede observar en la figura 15, las isoformas del RP se expresan de manera diferencial entre los grupos, siendo RP-A la isoforma más abundante en las PT (RP-B:RP-A,  $0.66 \pm 0.03$ ), mientras que RP-B es la isoforma predominante tanto en SN como en ENI. Cabe mencionar que esta diferencia en la tasa del contenido de RP-B:RP-A es mayor en las ENI ( $2.41 \pm 0.15$ ) respecto a las SN ( $1.14 \pm 0.01$ ).

### 8.3. Contenido basal de los correceptores CCR5 y CXCR4

Para determinar el contenido basal de los correceptores en PBMCs de SN, PT y ENI, se tomó una muestra sanguínea (8 ml) durante los primeros tres días del ciclo menstrual, a las diferentes donadoras y las PBMCs fueron separadas y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se extrajeron proteínas totales y se realizó la inmunodetección de los correceptores CCR5 y CXCR4 por medio de la técnica de Western Blot, como se mencionó en la metodología.

Se determinó el contenido basal al nivel de la proteína de los correceptores CCR5 y CXCR4 de los diferentes grupos de estudio, siendo los ENI quienes presentaron el menor contenido de CCR5 (Fig. 16). Se observó que el contenido de CCR5 fue menor en PT y ENI ( $1.04 \pm 0.18$  y  $0.29 \pm 0.08$ , respectivamente) respecto a SN ( $1.99 \pm 0.12$ ), mientras que el contenido de CXCR4 fue mayor en PT ( $0.86 \pm 0.01$ ) y ENI ( $0.74 \pm 0.01$ ) respecto a SN ( $0.52 \pm 0.06$ ).



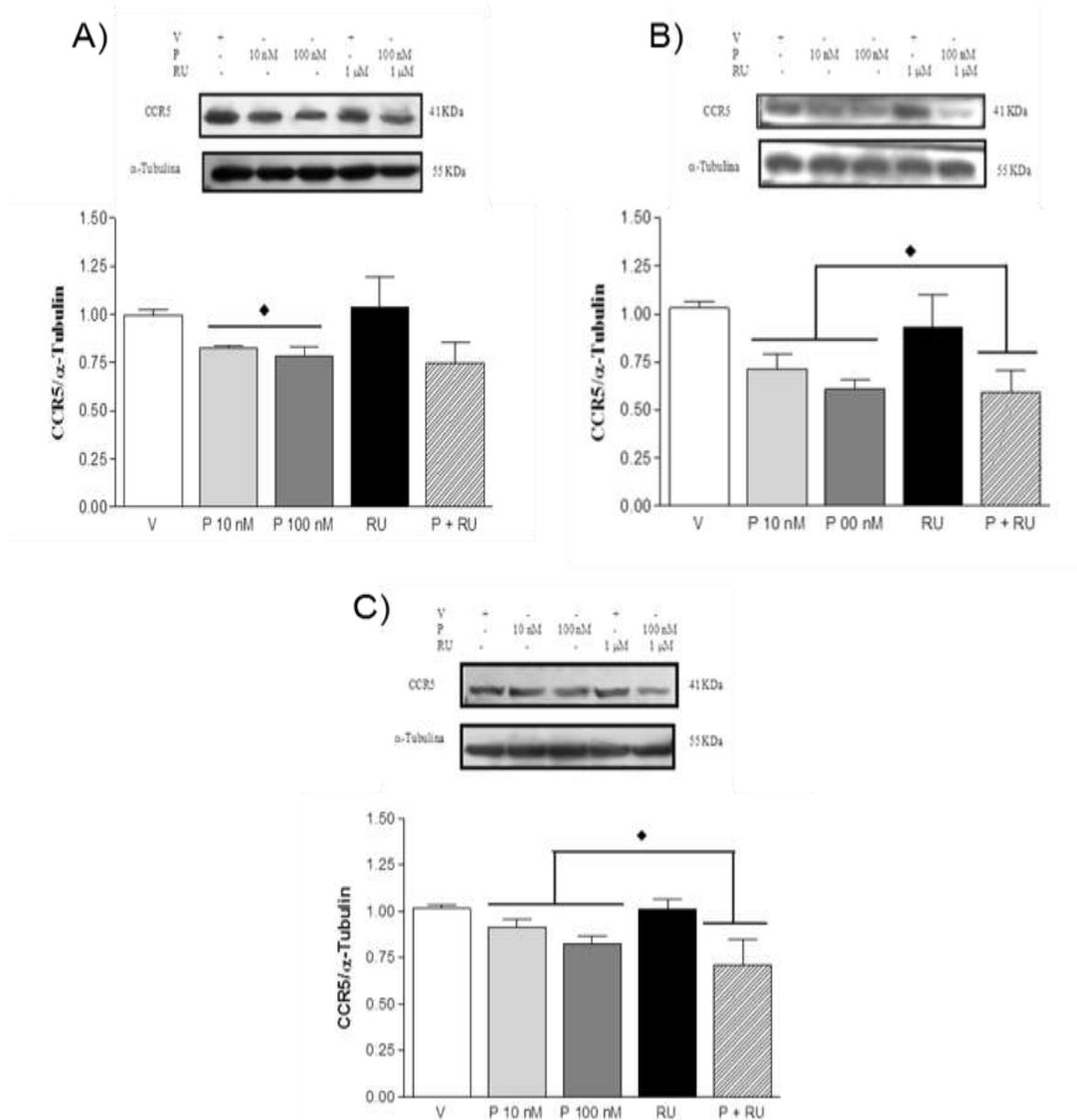
**Fig. 16. Detección del contenido basal de los correceptores CCR5 y CXCR4 mediante la técnica de western blot.** SN n=8; PT n=8; ENI n= 5. \* $p < 0.05$  vs SN; \*\* $p < 0.05$  vs PT.

#### 8.4. Efecto de la P sobre el contenido de los correceptores CCR5 y CXCR4

Para determinar los efectos de la P sobre la regulación de los correceptores CCR5 y CXCR4 en PBMC, se cultivaron PBMC, como se mencionó en la metodología y recibieron los siguientes tratamientos: vehículo de las hormonas (V, Ciclodextrina, 0.02%), P (10 y 100 nM), RU486 (1  $\mu$ M) o con P y RU486; Las células fueron colectadas 24 horas y después se extrajeron proteínas totales. Mediante la técnica de Western blot se identificaron los correceptores CCR5 y CXCR4 de PBMC de donadores seronegativos a VIH, PT y ENI.

En las figuras 17 se muestra un blot representativo de cinco experimentos independientes, donde se localizó una banda de 41 kDa que corresponde a CCR5, y otra de 55 kDa correspondiente a  $\alpha$ -tubulina, así como la gráfica correspondiente de células colectadas 24 horas después de los tratamientos.

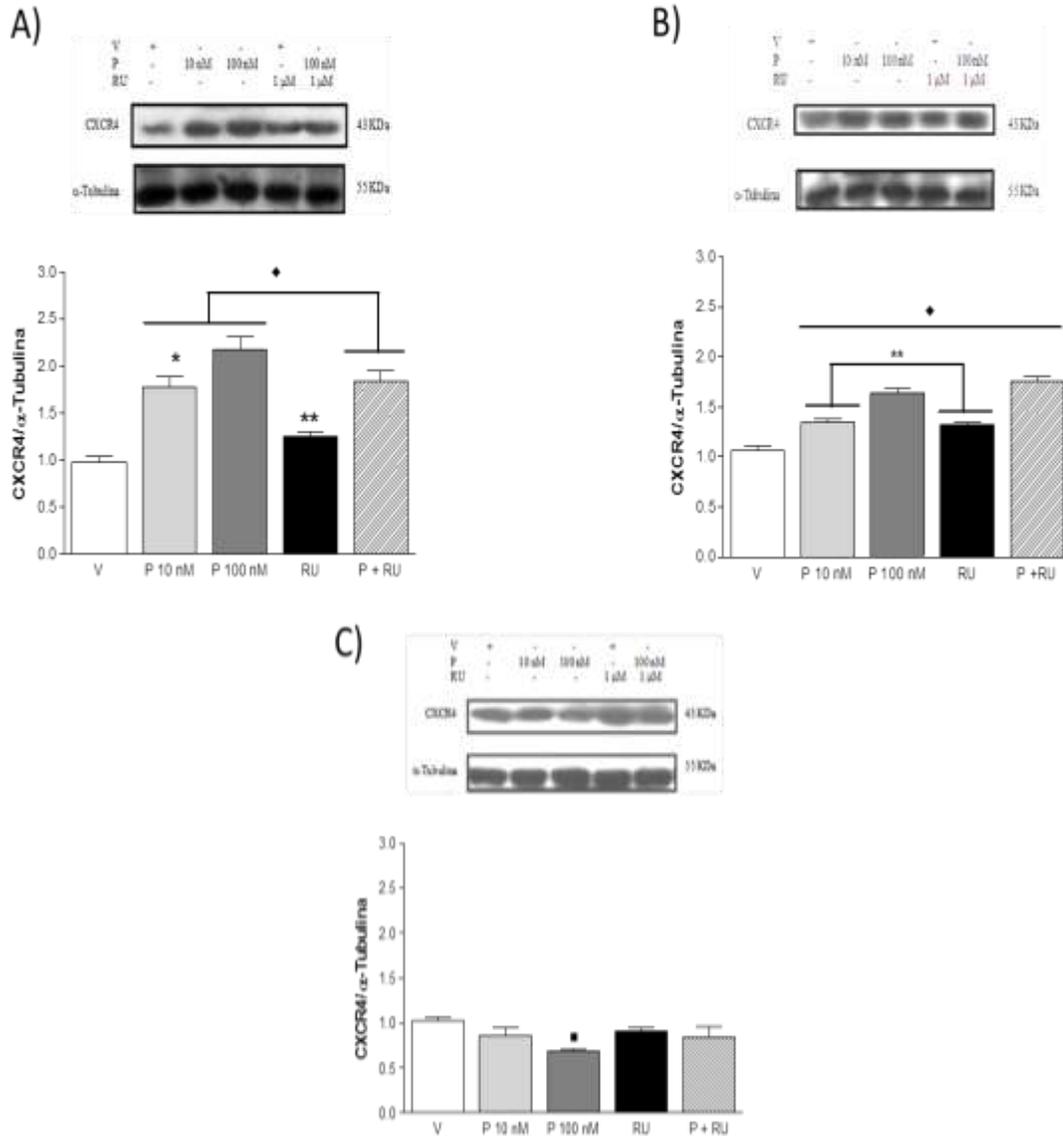
La P disminuyó significativamente el contenido de CCR5 en PBMC de los tres grupos (SN, PT y ENI) desde la dosis de 10 nM ( $0.818 \pm 0.03$ ,  $0.071 \pm 0.04$  y  $0.91 \pm 0.04$ , respectivamente), y el efecto se mantuvo con la dosis de 100 nM de la hormona ( $0.78 \pm 0.04$ ,  $0.60 \pm 0.06$  y  $0.082 \pm 0.04$ , respectivamente) (Fig. 16). La disminución en el contenido de CCR5 en los PT fue mayor (41.7%) respecto a los individuos SN y ENI (28.44% y 18.81% respectivamente) con la dosis de 100 nM de P (Fig. 16 A y C). Por otro lado, el contenido de CCR5 no se modificó de manera significativa con el tratamiento único del antagonista del RP, RU486, en ninguno de los tres grupos (SN, PT y ENI), aunque el tratamiento conjunto de P+RU disminuyó de manera significativa el contenido de este correceptor.



**Fig. 17. Regulación del contenido de CCR5 en PBMC, de mujeres SN, PT y ENI por P.** Las células fueron tratadas con vehículo (V): ciclodextrina (0.02%), 24 h y P (10 y 100 nM), 24 h. Las proteínas fueron detectadas por western blot, se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la tubulina. Las células fueron colectadas a las 24 horas del tratamiento. SN: n=8; PT: n=5; PT: n=4. ♦ p<0.05 vs V.

En la figura siguiente (Fig. 18) se muestra un blot representativo de cinco experimentos independientes, donde se localizó una banda de 43 kDa que corresponde a CXCR4 y otra de 55 kDa correspondiente α-tubulina, así como la

gráfica correspondiente de células colectadas 24 horas después de los tratamientos.



**Fig. 18. Efecto de la P sobre el contenido de CXCR4 en PBMC, de SN, PT y ENI.** Las células fueron tratadas con Vehículo (V): ciclodextrina (0.02%) en agua estéril, P (10 y 100 nM), RU486 (1 μM) y tratamiento conjunto de P y RU486. Las proteínas fueron detectadas por western blot, se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la tubulina. Las células fueron colectadas a las 24 horas del tratamiento. SN: V, P10, P100 n=8; RU, P+RU n=3. ♦ p<0.05 vs V; \* p<0.05 P100 nM, RU; \*\*p<0.05 vs P 100 nM y P+RU; ■p<0.05 vs V y RU.

El tratamiento con P incrementó de manera significativa, el contenido de CXCR4 tanto en SN como en PT (Fig. 18 A y B) respecto al tratamiento con

vehículo ( $0.99 \pm 0.03$  y  $1.06 \pm 0.04$ , respectivamente). Tanto en el grupo de SN como en el de PT dicho efecto se observó a partir de la dosis de 10 nM de P ( $1.77 \pm 0.11$  y  $1.34 \pm 0.03$ ) y el incremento fue mayor con la dosis de 100 nM ( $2.17 \pm 0.12$  y  $1.64 \pm 0.03$ ). Cabe mencionar que el incremento en el contenido del correceptor CXCR4 inducido por P fue mayor en los SN que en los PT desde la dosis de 10 nM (78.8% y 26.4 %) y este efecto fue observado a la dosis de 100 nM de la hormona (118% y 64.0%) (Fig. 18 A y B).

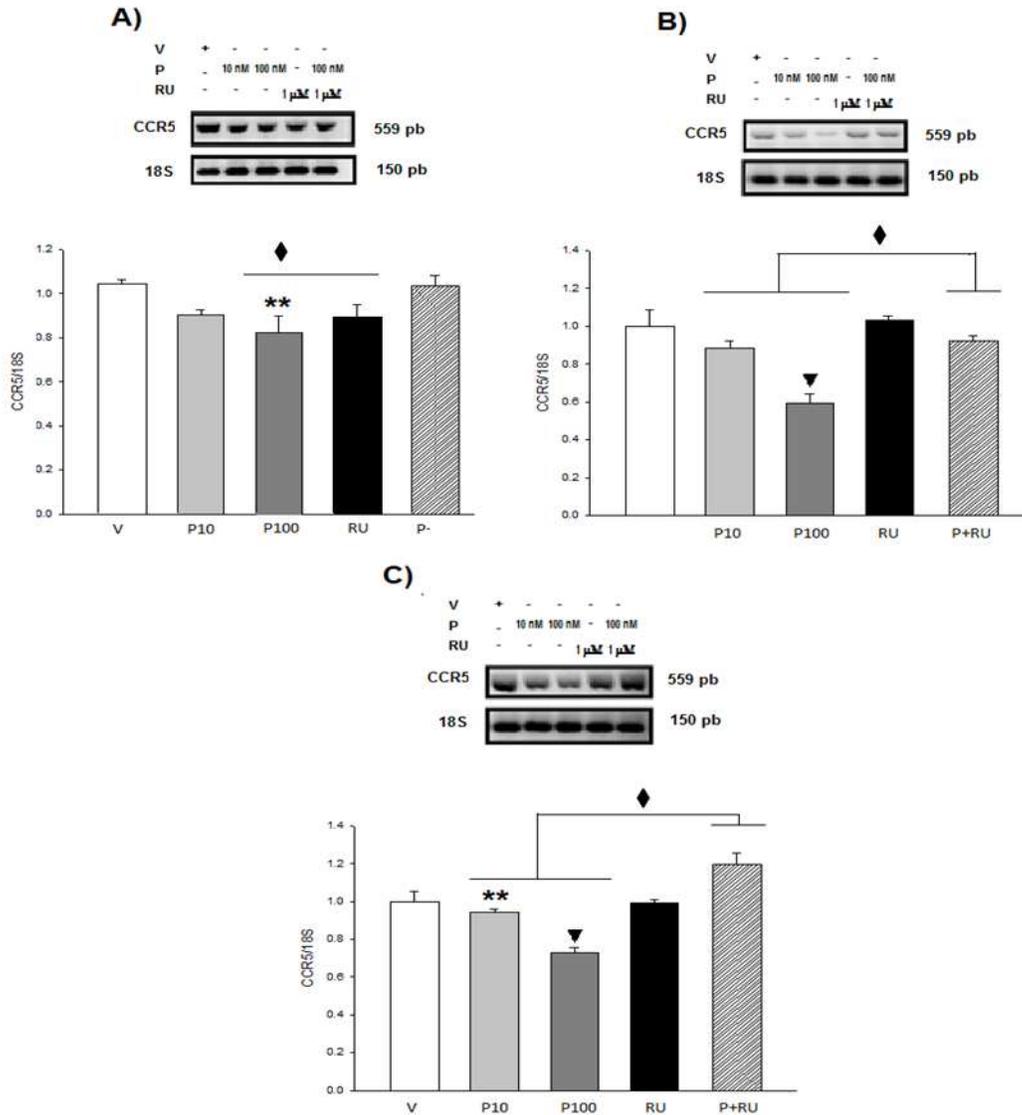
Por otro lado, el tratamiento con el antagonista de P (RU486) tuvo un efecto positivo sobre el contenido de CXCR4 tanto en SN como en PT ( $1.24 \pm 0.04$  y  $1.32 \pm 0.02$ , respectivamente) respecto al vehículo (Figs. 18 A y B). El efecto del tratamiento conjunto de RU486 + P fue similar al obtenido con P, es decir que no se observó un efecto antagónico del RU486 sobre P (Figs. 18 A y B)

A diferencia de los resultados obtenidos en los casos anteriores, en ENI, la P en una dosis de 100 nM disminuyó el contenido de CXCR4 ( $0.68 \pm 0.01$ ) respecto al vehículo ( $1.03 \pm 0.03$ ), mientras que RU486 no tuvo efecto sobre el contenido del correceptor. El tratamiento conjunto de P y RU486 muestra una tendencia a revertir el efecto de la P (Fig. 18 C).

### **8.5. Efecto de la P sobre la expresión de los correceptores CCR5 y CXCR4.**

Para determinar los efectos de la P sobre la regulación de la expresión de los correceptores CCR5 y CXCR4, se cultivaron PBMCs como se mencionó en la metodología y recibieron los siguientes tratamiento: vehículo de las hormonas (V, Ciclodextrina, 0.02%), P (10 y 100 nM), RU486 (1  $\mu$ M) o con P y RU486; Las células fueron colectadas 12 horas después de los tratamientos y se extrajo el RNA total. Mediante la técnica de RT-PCR se identificaron los correceptores CXCR4 y CCR5 de PBMC de donadoras SN, PT y ENI.

En las figura siguiente (Fig. 19) se muestra una imagen representativa de cinco experimentos independientes de SN y PT y cuatro de ENI, donde se localizó una banda de 559 pb y otra de 150 pb que corresponden a CCR5 y al RNAr 18S, respectivamente, así como la gráfica del análisis densitométrico realizado.

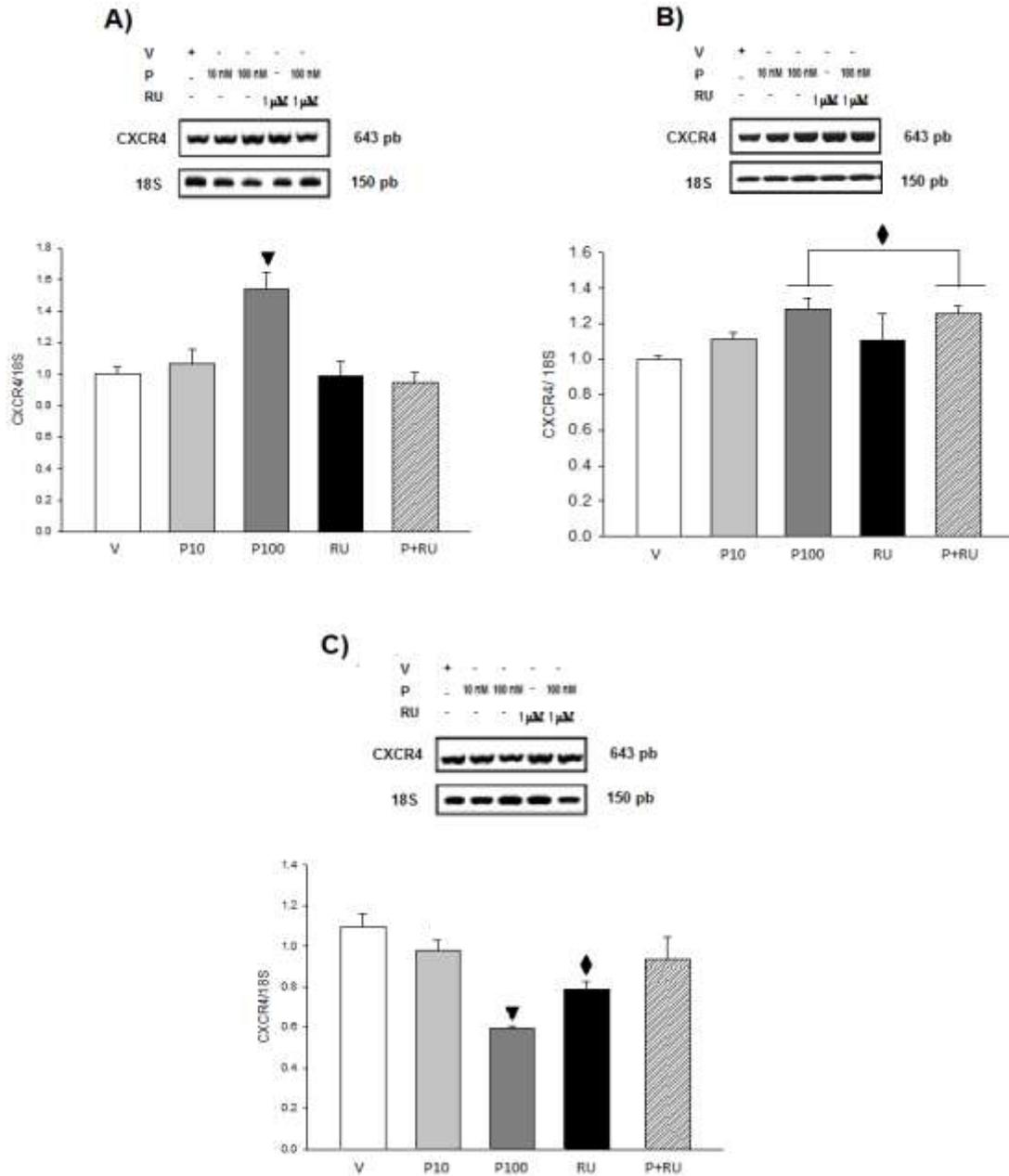


**Fig. 19. Expresión de CCR5 en PBMC de SN, PT y ENI.** Vehículo (V): ciclodextrina (0.02%) en agua estéril, P (10 y 100 nM), RU486 (RU) (1  $\mu$ M) y tratamiento conjunto de P (100 nM) y RU (1  $\mu$ M). El RNA mensajero detectado por RT-PCR, se cuantificó por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para 18S. Las células fueron colectadas a las 12 horas después de los tratamientos. SN y PT: n=5; ENI: n=4. ♦ vs V; \*\* p<0.05 vs V y P+RU; ▼p<0.05 vs todos los grupos.

Como se puede observar en la figura 19, en los tres grupos de estudio (SN, PT y ENI), la P disminuyó significativamente el contenido del RNAm del correceptor CCR5. En el caso de los PT y ENI el efecto de la P se observó desde la dosis de 10 nM ( $0.90\pm 0.01$  y  $0.94\pm 0.01$ , respectivamente), y el efecto se mantuvo con la dosis de 100 nM de la hormona ( $0.61\pm 0.04$  y  $0.72\pm 0.02$ , respectivamente) (Fig. 19 B y C), mientras que en los SN, sólo la dosis de 100 nM tuvo efecto sobre la expresión de CCR5 ( $0.82\pm 0.08$ ) (Fig. 19 A). Los PT fueron más susceptibles al tratamiento de P (100nM), mostrando una mayor disminución (40.62%) respecto a los individuos SN y ENI (21.24% y 31.10%, respectivamente); dichos efectos de la P se vieron reflejados al nivel de la proteína (Fig. 17).

Por otro lado, la expresión de CCR5 disminuyó significativamente con el tratamiento único del antagonista del RP, RU486, en los SN ( $0.89\pm 0.05$ ) en comparación con el vehículo ( $1.04\pm 0.01$ ), en un 14.5% (Fig 19 A), mientras que en los PT y ENI no se observó efecto con dicho tratamiento (Fig 19 B y C). A diferencia de lo que ocurre al nivel de la proteína (Fig. 17), el tratamiento conjunto de P+RU revirtió el efecto de la P en SN, PT y ENI, incrementando la expresión de CCR5 ( $1.033\pm 0.05$ ,  $1.94\pm 0.01$  y  $1.19\pm 0.06$ , respectivamente), en comparación a lo observado con el tratamiento único de P 100 nM ( $0.82\pm 0.08$ ,  $0.61\pm 0.04$  y  $0.72\pm 0.02$ , respectivamente) (Fig.19).

En la figura 20 se muestra una imagen representativa de cinco experimentos independientes de correspondientes a SN, PT y cuatro de ENI. Las células recibieron los tratamientos mencionados anteriormente y después fueron colectadas a las 12 horas. Se localizó una banda de 643 pb correspondiente a CXCR4 y otra de 150 pb al RNAr 18S, En la figura se muestran las bandas correspondientes a CXCR4 y la gráfica obtenida del análisis densitométrico.



**Fig. 20. Expresión de CXCR4 en PBMC.** Las PBMCs fueron tratadas con Vehículo (V): ciclodextrina (0.02%) en agua estéril, P (10 y 100 nM), RU486 (RU) (1 μM) y tratamiento conjunto de P (100 nM) y RU. El RNA mensajero detectado por RT-PCR, se cuantificó por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para 18S. Las células fueron colectadas a las 12 horas del tratamiento. SN y PT: n=5; ENI: n=4. ♦ p<0.05 vs V; \*\*p<0.05 V y P+RU; ▼p<5.05 vs todos los grupos.

Como se puede observar, tanto en SN como en PT (Fig. 20 A y B) el tratamiento con P a la dosis de 100 nM incrementó significativamente la expresión

del RNAm de CXCR4 ( $1.46\pm 0.08$  y  $1.28\pm 0.04$ ). Dicha regulación fue mayor en los SN que en los PT (42.6 y 28.97%, respectivamente), mientras que la expresión de CXCR4 no se modificó de manera significativa con el tratamiento único del antagonista del RP, RU486, en ninguno de los dos grupos (SN y PT). El efecto del tratamiento conjunto de RU486 + P fue contrario al obtenido con P en los SN (Fig. 20 A), es decir que se observó un efecto antagónico del RU486 sobre P ( $1.46\pm 0.08$  y  $0.91\pm 0.03$ ), mientras que en los PT no se observó que dicho antagonista revirtiera el efecto de la P (Fig. 20 B).

Al igual que en la proteína (Fig. 18) y de manera contraria a los SN y PT, el tratamiento con P a una dosis de 100 nM disminuyó significativamente la expresión de CXCR4 en los ENI ( $0.59\pm 0.01$ ) (Fig. 20 C), al igual que el tratamiento único de RU486 ( $0.78\pm 0.04$ ). El tratamiento conjunto de P y RU486 se observó un efecto contrario al de la P ( $0.59\pm 0.01$  y  $0.93\pm 0.01$ , respectivamente).

## IX. DISCUSIÓN

### 9.1. Niveles hormonales en sujetos SN, PT y ENI.

Hay una escasez de datos acerca de los niveles hormonales entre las mujeres infectadas con VIH. Los niveles hormonales pueden influir en la fertilidad y están relacionados con factores inmunológicos y virológicos del VIH. Todas las donadoras refirieron la presencia de ciclos menstruales regulares con un rango de 25-32 días.

Estudios realizados en mujeres infectadas con VIH muestran que la longitud del ciclo menstrual y la duración del sangrado menstrual no son significativamente diferentes en mujeres SN y PT, lo que sugiere que la mayoría de mujeres infectadas por el VIH poseen ciclos ovulatorios y menstruales normales y tiene intacto el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Ellerbrock et al., 1996). En estudios realizados por Cu-Uvin y col. (2000), no se reportaron diferencias significativas de los niveles hormonales tanto de E como de P entre mujeres SN y PT.

De acuerdo a los datos obtenidos en nuestro laboratorio, los niveles séricos de E no presentan diferencias significativas entre los diferentes grupos durante la fase folicular temprana del ciclo menstrual, aunque los niveles séricos de P son menores en PT y ENI comparados con SN (Fig. 12), aunque estos niveles no salen del rango normal reportado. A la fecha no existen datos acerca de los niveles hormonales de ENI.

Los efectos de la P pueden estar mediados a través de su receptor intracelular denominado RP. Dicho receptor presenta dos isoformas (RP-A y RP-B). La detección del RP en PBMCs ha sido controversial, ya que algunos autores no han localizado al RP en las PBMCs (Schust et al., 1996), mientras que otros reportan la presencia de éste a nivel del RNAm. En la presente tesis se detectaron las dos isoformas del RP, las cuales, se expresaron de manera diferencial entre los grupos de estudio, siendo RP-B la isoforma predominante en SN y ENI y RP-A

en PT. Hasta el momento no existen reportes en la literatura acerca de la expresión de ambas isoformas en PBMCs de individuos infectados con VIH ni de ENI. De manera interesante, las muestras de ENI expresan en gran medida RP-B respecto a SN, la expresión de esta isoforma podría ser de interés en la protección mediada por P ante la infección por VIH, aunque faltan experimentos para comprobar dicho papel.

## **9.2. Contenido basal de CCR5 y CXCR4 en SN, PT y ENI**

El contenido basal de los correceptores al VIH puede ser determinante en la susceptibilidad a la infección provocada por dicho virus; es por ello que el conocer dicho contenido es de gran interés.

Las PT y ENI presentaron menor contenido de CCR5 en comparación con las SN. Esta diferencia fue mayor en las ENI. En tanto que el contenido de CXCR4 fue mayor en PT y ENI respecto a las SN. La etapa de infección, grado de activación de las PBMCs y uso de tratamiento antirretroviral (en el caso de las PT), pueden influir en la expresión de CCR5 y CXCR4 respecto a las SN (Ostrowski et al., 1998; Brito et al., 2008; Shwete et al., 2008; Nicholson et al., 2001). Durante la infección primaria se ha observado un mayor porcentaje de expresión de CCR5 en células CD4<sup>+</sup> de individuos infectados con VIH respecto a individuos sanos, mientras que CXCR4 se encuentra en mayor medida en linfocitos TCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> T, así como en monocitos CD14<sup>+</sup> (Ostrowski et al., 1998). Además, se ha reportado que pacientes que reciben terapia antirretroviral altamente activa (HAART) poseen mayor contenido de CXCR4 en relación a individuos SN. Brito y cols. 2008, han reportado que la expresión de CCR5 es mayor en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, se observa un menor contenido de estas células, mientras que aquellos pacientes que no han recibido HAART mostraron menor expresión de CCR5 (Brito et al., 2008). Cabe mencionar que en dicho estudio no se toma en cuenta la posible expresión de CCR5 en macrófagos ni en monocitos. En el caso de individuos ENI (sin la mutación CCR5 $\Delta$ 32) no existen reportes previos que comparen el contenido de CCR5 y CXCR4 respecto a SN. Ya que la infección vía

sexual es la principal vía de transmisión del VIH y siendo CCR5 la principal vía de entrada del VIH por la vía sexual, la baja expresión de CCR5 en sí misma, constituiría una protección ante el VIH en las ENI.

### **9.3. Regulación de los correceptores CXCR4 y CCR5 por P en PBMC de mujeres seropositivas al VIH, progresores típicos y expuestos no infectados.**

De manera similar con lo reportado por Vassialiadou y col. (1999), el contenido de CCR5 es regulado de manera negativa por P en individuos sanos (28.4%). En PT, cabe mencionar que el contenido de CCR5 disminuye hasta un 41.7% comparado con las células tratadas con vehículo. En ENI, la P también disminuye el contenido de CCR5, aunque este efecto sólo es significativo con la dosis más alta de P (100 nM). El tratamiento con el antagonista de P, RU486, no tuvo efecto sobre el contenido del correceptor, aunque se observó un decremento del 30.6% del CCR5 con el tratamiento conjunto de P+RU. Dicho efecto presenta una tendencia a ser mayor, inclusive al observado con el tratamiento con P 100 nM. Cabe mencionar que recientemente se ha descrito la presencia de receptores de P en la membrana de linfocitos T, los cuales podrían estar involucrados en esta regulación de CCR5 y CXCR4 por esta hormona, aunque se requieren de más experimentos para concluir acerca del mecanismo de acción de la P.

A diferencia de lo reportado por Vassialiadou y col. (1999) para CXCR4 in vitro, la P parece tener un efecto positivo en la regulación del correceptor, tanto a nivel de la proteína como al nivel del RNAm. Cabe mencionar que las dosis utilizadas en ese estudio in vitro son mayores ( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  M) a las utilizadas en el presente experimento ( $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^7$  M). Además, existen datos en los cuales se observó que la P tuvo un efecto positivo sobre el contenido de CXCR4 durante la fase proliferativa comparado con la fase secretora del ciclo menstrual; la P (50 ng/ml) incrementó el contenido del RNAm de CXCR4 en PBMC (Yeaman et al., 2003; Patterson et al., 1998). Por lo tanto, el efecto de la P sobre el contenido de CXCR4 podría depender de las concentraciones presentes. En el caso de

CXCR4, la muestra obtenida del ENI se comportó de manera contraria a lo presentado en SN y PT, disminuyendo su contenido hasta un 18.8% respecto al control. Hasta el momento no se han reportado datos que expliquen la presencia de ENI en México y cabe mencionar que la mayor parte de ENI son mujeres. En mastocitos se ha observado que la sobreexpresión diferencial de las isoformas del RP modifican la migración de estas células en respuesta a CXCL12, ligando específico de CXCR4, después del tratamiento con P (1nM - 1  $\mu$ M) (Belot et al., 2007). Además, se ha observado una correlación entre el estatus del RP y la presencia nuclear de CXCR4 en tumores de cáncer de mama negativos a RP, de tal manera que la ausencia de RP en este tipo de tumores incrementa de manera significativa el contenido de CXCR4 en núcleo (Woo et al., 2008).

De manera interesante se observó que el tratamiento con RU486 incrementó de manera significativa el contenido de CXCR4 tanto en SN como en PT y no tuvo efecto en los ENI. Además, el contenido de CXCR4 se incrementó de manera significativa con el tratamiento conjunto de P+RU, por lo que el RU486 no antagoniza el efecto de la P.

Se ha reportado en diversos tipos celulares, que el RU486 puede actuar como un antagonista o un agonista parcial dependiendo de la estructura del promotor y el contexto celular de los genes que responden a P, por ejemplo la tasa de correguladores del RP, como SRC y SMRT. RU486 puede presentar afinidad por otros receptores a hormonas, como el receptor a glucocorticoides (RG). Okutsu y cols. (2004) encontraron que RU486 (1 $\mu$ M) incrementó significativamente el contenido de CXCR4 en PBMCs de sujetos sanos en respuesta a estrés físico agudo (Okutsu et al., 2004). Además, RG puede regular de manera positiva a CXCR4 en eosinófilos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Wang et al., 1998; Nagase et al., 2000), por lo que en el presente trabajo no se puede descartar la participación del RG en el efecto del RU486. La utilización de RNA de interferencia específicos para el RP, así como el estudio de los correguladores del RP, como SRC y SMRT, podría dar

mayor información acerca del mecanismo por el cual actúa la P sobre la regulación de ambos correceptores al VIH.

## **X. CONCLUSIONES**

Los resultados mostrados en la presente tesis indican que la P podría tener un papel dual en la infección por VIH. Durante las fases tempranas de la infección, cuando la principal vía de entrada del VIH es mediante CCR5, la P es un factor protector ante la infección, mientras que en etapas más avanzadas, cuando el tropismo viral es principalmente dirigido a CXCR4, la P podría ser un factor que incrementa la progresión de la enfermedad causada por el VIH. Además, la P podría contribuir a la resistencia al VIH en las mujeres ENI aunada a la baja expresión basal de CCR5 en este grupo.

## **XI. PERSPECTIVAS**

1. Determinar el papel del RP mediante RNA de interferencia para RP y un agonista específico de RP, R5020.
2. Determinar la tasa de correguladores SRC y SMRT en las PBMC de SN, PT y ENI.

**XII. REFERENCIAS**

- <http://www.salud.gob.mx/conasida>
- Alcamí J. 2004. Avances en la inmunopatología de la infección por VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22 (8): 486-496.
- Agrawa L Lu X, Qingwen J, VanHorn-Ali Z, Nicolescu IV, McDermott DH, Murphy PM, Alkhatib G. 2004. Role for CCR5 $\Delta$ 32 Protein in Resistance to R5, R5X4, and X4 Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Primary CD4<sup>+</sup> Cells. *J Virol.* 78(5): 2277–2287.
- Belot MP, Abdennebi-Najar L, Gaudin F, Lieberherr M, Godot V, Taïeb J, Emilie D, Machelon V. 2007. Progesterone reduces the migration of mast cells toward the chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 with an accompanying decrease in CXCR4 receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292:E1410-1417.
- Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. 1997. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem.* 272(49):30603-30606.
- Brito A, Rigato PO, Almeida A, Fernandes SS, Gonzalez CR, Fonseca LA. 2008. Chemokine receptors expression on T cells and response to HAART among chronic HIV-1-infected subjects. *Curr HIV Res.* 6:539-543
- Camacho-Arroyo I, Pasapera A, Pérez-Palacios G, Cerbón M A.. 1995. Progesterone and its metabolitos in central nervous system function. *Rev Invest Clin.* 47: 329-240.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón M A. 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9: 3993-3996.
- Camacho-Arroyo I. 2003. Progesterone receptor isoforms and progesterone actions in the brain. In Gayathri A (ed) *Recent Research Developments in Life Sciences. Research Signpost. Kerala.* pp.221-242.
- Camacho-Arroyo I, Rodríguez-Dorantes M. 2006. Transcriptional activity regulates by progesterone receptor isoforms. . In Gayathri A (ed) *Recent Research Developments in Life Sciences. Research Signpost. Kerala.* pp.25-38.
- Calarota S A. 1999. Modulation of HIV Immune Responses in Natural Infection and after Genetic Immunization, MTC, Karolinska Institute, Sweden.

- Caruza A, Samsomb M, Alonsoc JM, Alcamic J, Baleuxd F, Vireliziera JL, Parmentierb M, Arenzana-Seisdedos F. 1998. Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Letters* 426:271-278.
- Christensen K, Estes P A, Onate S A, Beck C A, DeMarzo A, Altman M, Liberman B A, St John J, Nordeen S K, Edwards D P. 1991. Characterisation and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol Endocrinol.* 5: 1755-1770.
- Clarke C. 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanism of action. In: *Molecular Aspects of Placental and Fetal Autacoids*. Rice G E, Brennecke S P (eds). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 27-54.
- Clemm D L, Macy B L, Santiso-Mere D, McDonnell D P. 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 53: 487-495.
- Cu-Uvin S, Wright DJ, Anderson D, Kovacs A, Watts DH, Cohn J, Landay A, Reichelderfer PS. 2000. Hormonal levels among HIV-1-seropositive women compared with high-risk HIV-seronegative women during the menstrual cycle. *J Womens Health Gend Based Med.* 8:857-863.
- Dalkin A C, Paul S J, Haisenleder D J, Ortolano G A, Yasin M, Marshall J C. 1992. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J Endocrinol.* 132: 39-45.
- Díaz Muñoz L, Serramía MJ, Fresno M, Muñoz-Fernández MA. 2007. Progesterone Inhibits HIV-1 Replication in Human Trophoblast Cells through Inhibition of Autocrine Tumor Necrosis Factor Secretion. *JID.* 195:1294-1302.
- Ellerbrock TV, Wright TC, Bush TJ, Dole P, Brudney K, Chiasson MA. 1996. Characteristics of menstruation in women infected with human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol;*87:1030–1034.
- Giangrande P, Pollio G, McDonnell D. 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem.* 272: 32889-32900.
- Giangrande P, McDonnell D. 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res.* 54: 291-313.

- González-Morán G, Camacho-Arroyo I, 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat Histol Embryol.* 27: 277-282.
- Gore-Langton R. 1988. Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 57: 187-198.
- Gorosope W C, Freeman M E. 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion in vitro. *Biol Reprod.* 32: 279-283.
- Graham J D, Yeates C, Balleine R L, Harvey S S, Milliken J S, Bilous A M, Clarke C L. 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 55: 5063-5068.
- Graham J, Clarke C. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519.
- Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. 2000 Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev In Clin.* 52: 686-691.
- Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S. 1998. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 12: 1334-1342.
- Hutchison J S, Nelson P B, Zeleznik A J. 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology.* 119: 1964-1971.
- Ing N H, Beekman J M, Kessler D J, Murphy M, Jayaraman K, Zendegui J G, Hogan M E, O'Malley B W, Tsai M J. 1993. In vivo transcription of a progesterone responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic Acids Res.* 21: 2789-9276.
- Januchowski R, Breborowicz AK, Ofori H, Jedrzejczak P, Pawelczyk L, Jagodzinski PP. 2004. Detection of a short CCR5 messenger RNA isoform in human spermatozoa. *J Androl.* 25(5):757-60.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9: 1603-1614.
- Knotts T, Orkiszewski R, Cook RG, Edwards D, Weigel N. 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 276: 8475-8483.

- Kogan M, Reppaport J. 2011. HIV-1: Relevance in the pathogenesis of VIH and potential for therapeutic intervention. *Retrovirol.* 8(25)
- Kraus W L, Katzenellenbogen B S. 1993a. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone end sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology.* 132: 2371-2396.
- Kraus W L, Montano M M, Katzenellenbogen B S. 1993b. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol.* 7: 1603-1616.
- Laird SM, Widdowson R, El-Sheikhi M, Hall AJ, Li TC. 2011. Expression of CXCL12 and CXCR4 in human endometrium; effects of CXCL12 on MMP production by human endometrial cells. *Hum Reprod.* 26(5):1144-11452.
- Leonhardt S A, Altmann M, Edwards D P. 1998. Agonist and antagonists induce homodimerization and mixed ligand heterodimerization of human progesterone receptors in vivo by a mammalian two-hybrid assay. *Mol Endocrinol.* 12: 1914-1930.
- Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E. 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 9045-9049.
- Misrahi M, Venebcie P Y, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E. 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem Biophys Acta.* 216: 298-292.
- Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci AS. 1997. Cloning and analysis of the promoter region of CCR5, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol.* 159(11):5441-5449.
- Mummididi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK. 1997. The Human CC Chemokine Receptor 5 (CCR5) Gene. *J Biol Chem.* 272(49); 30662–30671.
- Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Kawasaki H, Ohta K, Yamamoto K, Morita Y and Hirai K. 2000. Glucocorticoids preferentially upregulate functional CXCR4 expression in eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 106(6):1132-1139.
- Nicholson JK, Browning SW, Hengel RL, Lew E, Gallagher LE, Rimland D, McDougal JS. 2001. CCR5 and CXCR4 expression on memory and naive T cells in HIV-1 infection and response to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 27:105-115.
- Ostrowski MA, Justement SJ., Catanzaro A, Hallahan CA., Ehler LA., Mizell SB., et al. 1998. Expression of Chemokine Receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1- Infected and Uninfected Individuals. *J Immunol.* 161:3195–201.

- Paranjape R. 2005. Immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res.* 121: 240-255.
- Patterson B, Landay A, Anderson J, Brown C, Behbahani H, Jiyamapa D, Burki Z, Stanislawski D, Czerniewski M, García P. 1998. Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract. Implications for human immunodeficiency virus transmission. *American J Pathol.* 153 (2): 481-490
- Pérez-Palacios. 1985. Mecanismos de acción de hormonas esteroides en bioquímica e inmunología. Vol 2. Cap VI, Ed. Hicks, J y Díaz-Agaya J.C. UNAM. México. 346-370.
- Perrot-Appianat M, David-Ferreira J F. 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res.* 223: 1511-1519.
- Rotchild I. 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin C W, Milgromm E, Mauvais-Jarvis P (eds) *Progesterone and progestins.* Raven Press, New York, pp 219-229.
- Rowland-Jones. 2003. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol.* 3(4):343-348.
- Ruiz A, Salvo VA, Ruiz LA, Báez P, García M, Flores I. 2010. Basal and steroid hormone-regulated expression of CXCR4 in human endometrium and endometriosis. *Reprod Sci.* 17(10):894-903
- Sartorius C, Groshong S, Miller L, Powell R, Tung L, Takimoto G, Horwita K. 1994a. New T47-D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B and A receptors: only antiprogestin occupied B receptors are switched to transcriptional agonist by cAMP. *Cancer Res.* 54: 3868-3877.
- Sartorius C, Melvilla M, Hovland AI, Tung L, Takimoto G, Horwitz C. 1994b. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptor located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 10: 1174-1159.
- Schust DJ, Anderson DJ, Hill JA, 1996. Progesterone-induced immunosuppression is not mediated through the progesterone receptor. *Hum Reprod* 11(5):980-985.
- Shweta D, Mohammad K, Wealey C, Khan S, Wanchu A, Jameel S. 2008. Downregulation of CCR5 on activated CD4 T cells in HIV-infected Indians. *Indians J Clin Virology.* 43:25-31
- Shattcok R, Moore J. 2003. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nature Rev. Microbiol.* 1: 25-34.

- Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum Reprod.* 9: 1589-1595.
- Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E. 1987. Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature.* 329: 79-81.
- Topper Y, Freeman C. 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev.* 60: 1049-1106.
- Tung L, Mohamed M K, Hoeffler J P, Takimoto G S, Horowitz K B. 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol.* 7: 1256-1265.
- Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K. 1999. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology.* 140: 805-813.
- Vassialiadou N, Tucker L, Anderson D. 1999. Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells correlates with reduced HIV-1 infectability *In Vitro.* *J. Immunol.* 162: 7510-7518.
- Vongher J, Frye C. 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav.* 64: 777-785.
- Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T, Nagai Y and Matsushima K. 1998. IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol.* 64(5):642-649.
- Weisz J, Ward I L. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology.* 106: 306-316.
- Wegner SA, Ehrenberg PK, Chang G, Dayhoff DE, Sleeker AL, Michael NL. 1998. Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem.* 273(8):4754-4760.
- Wen D X, Xu Y F, Mais D E, Goldman M E, McDonnell D P. 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol.* 14: 8356-8364.

- Woo SU, Bae JW, Kim CH, Lee JB, Koo BW. 2007. A significant correlation between nuclear CXCR4 expression and axillary lymph node metastasis in hormonal receptor negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 15:281-285.
- Yábar C. 2003. Eventos moleculares, genéticos e inmunológicos durante la interacción VIH-hombre. *Rev Peru Med Exp Salud publica*. 20 (2): 107-115.
- Yeaman G, Howel A, Weldon S, Demian D, Collin J, O'Connell D, Asin S, Fanger M. 2003 Human immunodeficiency virus receptor and coreceptor expresión on human uterine epithelial cells: regulation of expression during the menstrual cycle and implications for human immunodeficiency virus infection. *Inmunol*. 109: 137-146.
- Zhu Y, Rice C, Pang Y, Pace M, Thomas P. 2003. Cloning, expression and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *PNAS*. 100:2231-2236.
- Zhu Y, Bond J, Thomas P. 2003. Identification, classification, and partial characterization of genes in human and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *PNAS*. 100:2237-2242.
- Zvain I H, Yen S S. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*. 140: 3843-3852.

### XIII. ANEXOS

- 13.1. **Cabrera-Muñoz E**, Escobedo G, Guzmán C, Camacho-Arroyo I. 2010. Role of progesterone in HIV and parasitic infections. *Open Neuroendocrin J.* 3:137-142.
- 13.2. **Cabrera-Muñoz E**, Zamora-Chávez J ,Fuentes-Romero L.L, Camacho-Arroyo I. 2012. Effects of progesterone on the content of CCR5 and CXCR4 coreceptors in PBMCs of seropositive and exposed but uninfected Mexican women to HIV-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 132:66-72.
- 13.3. **Cabrera-Muñoz E**, Hernández-Hernández OT, Camacho-Arroyo I. Role of progesterone and estradiol in VIH susceptibility and disease progression. *Mini Rev Med Chem.* En prensa.