



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFEECTO DE LA PROGESTERONA
SOBRE EL CONTENIDO DE LOS
CORRECEPTORES CCR5 Y CXCR4 EN
CÉLULAS MONONUCLEARES DE
SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES
VIH POSITIVOS

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JORGE ALEJANDRO ZAMORA
CHÁVEZ



MÉXICO, D. F.

2009



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. en C. AIDA NAVAS PEREZ

VOCAL: Dr. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SECRETARIO: Dra. ALIESHA ARACELI GONZALEZ ARENAS

1er. SUPLENTE: E.B.C. EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS

2° SUPLENTE: Dr. CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 107 EDIFICIO "F",
FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.**

ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. EDITH ARACELI CABRERA MÚÑOZ

SUSTENTANTE: JORGE ALEJANDRO ZAMORA CHÁVEZ

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) y de la cátedra Fernando Orozco Díaz otorgada por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la Sección 024 de la AAPAUNAM.

Dedicatorias.

A mis padres, Adolfo y Ángeles, por alentarme y apoyarme en todo lo que he hecho. A mis hermanas Diana y Guadalupe por ayudarme en todo lo que pudieron, aun en lo mas mínimo. A todos ellos gracias, ya que sin ellos nunca hubiera logrado lo que hasta ahora he hecho así como tampoco hubiera llegado a ser lo que soy, porque siempre formarán parte de mi y de mis logros.

A todos los del laboratorio 107: Aliesha, Tania, Marco, Tania (2), Valeria, por todos los momentos divertidos que pasamos y por los consejos que me dieron y a la Sra. Geno por ayudarnos a todos ya que sin ella el laboratorio seria un desorden. A Edith, muchas gracias por todo lo que me has enseñado, realmente sin tu guía y ayuda nunca hubiera podido lograr lo que hice, me enseñaste muchas cosas sobre como trabajar en el laboratorio. Gracias por todos los consejos y críticas me han ayudado muchísimo, eres la profesora consentida de licenciatura.

Agradezco ampliamente al Dr. Ignacio Camacho Arroyo por todos sus consejos y por el gran apoyo que me ha brindado durante mi estancia en el laboratorio.

Cristina y Carlos, gracias por acompañarme en este largo camino que recorrimos, por todo el apoyo y ayuda que me dieron cuando lo necesite y por todos esos momentos que pasamos, ya que sin ustedes mi estancia en la universidad no hubiera sido la misma.

Gracias a mi jurado; la Maestra Aida Navas, Dra. Aliesha González y al Dr. Ignacio Camacho por las observaciones realizadas a este trabajo.

"Hay quien se pasa la vida entera leyendo sin conseguir nunca ir más allá de la lectura, se quedan pegados a la página, no entienden que las palabras son sólo piedras puestas atravesando la corriente de un río, si están allí es para que podamos llegar a la otra margen, la otra margen es lo que importa"

*José Saramago
(Premio nobel de literatura 1998)*

Índice.

| | |
|---|----|
| 1. Abreviaturas | 1 |
| 2. Resumen | 2 |
| 3. Introducción | 3 |
| 4. Antecedentes generales | 5 |
| 4.1. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) | 5 |
| 4.1.1. Características del VIH | 5 |
| 4.2. Ciclo replicativo del VIH | 9 |
| 4.3. Patogénesis del VIH | 12 |
| 4.4. Correceptores del VIH: CCR5 y CXCR4 | 14 |
| 4.4.1. CCR5 | 15 |
| 4.4.2. CXCR4 | 17 |
| 4.5. Estructura y función de la progesterona (P) | 18 |
| 4.6. Mecanismos de acción de la progesterona | 21 |
| 4.6.1. Características del receptor a P (RP) | 23 |
| 4.6.2. Isoformas del RP | 25 |
| 4.7. Papel de la progesterona en la infección por VIH | 27 |
| 4.7.1. Efectos de la progesterona sobre el contenido de CCR5 y CXCR4 | 28 |
| 5. Planteamiento del problema | 29 |
| 6. Hipótesis | 29 |
| 7. Objetivos generales | 30 |
| 7.1. Objetivos particulares | 30 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 8. | Metodología | 31 |
| 8.1. | Criterios de inclusión para el estudio | 31 |
| 8.2. | Criterios de exclusión para el estudio | 31 |
| 8.3. | Toma de muestra y separación PBMCs en gradiente de Ficoll | 31 |
| 8.4. | Cultivo celular | 32 |
| 8.5. | Determinación del contenido de CCR5 y CXCR4 | 33 |
| 8.5.1. | Extracción de proteínas totales | 33 |
| 8.5.2. | Western Blot | 33 |
| 9. | Resultados | 35 |
| 10. | Discusión | 42 |
| 11. | Conclusiones | 44 |
| 12. | Referencias | 45 |
| 13. | Anexos | 51 |

1. Abreviaturas.

- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- AMP:** monofosfato de adenina.
- AMPc:** monofosfato de adenina cíclico.
- CCR5:** receptor de β -quimiocinas.
- CD4:** grupo de diferenciación 4.
- CTL:** linfocito T citotóxico.
- CXCR4:** receptor de α -quimiocinas.
- env:** gen de envoltura viral.
- ERP:** elementos de respuesta a progesterona.
- FSH:** hormona estimulante de los folículos.
- gag:** gen de grupo de antígeno viral.
- gp:** glicoproteína viral.
- gp120:** glicoproteína viral de 120 KDa.
- gp41:** glicoproteína viral de 41 KDa.
- HRE:** elementos de respuesta hormonal.
- LBD:** dominio de unión al ligando.
- LH:** hormona leutinizante.
- LTR:** secuencias terminales largas repetidas.
- MHC I:** complejo principal de histocompatibilidad tipo I.
- RNA_m:** ácido ribonucleico mensajero.
- P:** progesterona.
- PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica.
- pol:** gen de polimerasa viral.
- RNA:** ácido ribonucleico.
- RP:** receptor a progesterona.
- RT:** transcriptasa reversa.
- SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
- VIH:** virus de inmunodeficiencia humana.

2. Resumen.

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) constituye la principal causa de muerte en adultos en el mundo. Existen diversos factores tanto biológicos como sociales que participan en el grado y susceptibilidad a la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Un factor importante en la regulación de la infección y patogénesis del VIH es la expresión en la membrana celular del receptor CD4 y de los correceptores CCR5 y CXCR4, los cuales son indispensables para la fusión de la envoltura viral y la membrana de la célula hospedera. Estudios en mujeres sanas han demostrado que las hormonas sexuales como la progesterona (P) pueden modular la expresión de los correceptores del VIH. También se ha observado que las mujeres infectadas con VIH presentan un mejor pronóstico en etapas tempranas de la infección en comparación con los hombres, sin embargo, esta relación se invierte en etapas tardías. Hasta el momento, únicamente se han realizado estudios en mujeres sanas, por lo que se desconoce el papel de la P en mujeres infectadas con VIH. En el presente estudio se determinó el efecto de la P y de su receptor intracelular sobre el contenido de los correceptores CCR5 y CXCR4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes VIH positivas por medio de la técnica de Western Blot. En PBMCs se observó una disminución en el contenido de CCR5 después del tratamiento con P (10 y 100 nM), mientras que el contenido de CXCR4 se incrementó con P. El tratamiento conjunto de P y RU486 (antagonista del receptor a P) no revirtió los efectos de la P. Los resultados indican que la P regula el contenido de CCR5 y CXCR4 en PBMCs de pacientes VIH positivas, lo cual es importante en la susceptibilidad y el desarrollo de la infección por VIH.

3. Introducción.

La infección provocada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) continúa siendo uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Hasta el 2007 este virus ha sido el responsable de 25 millones de muertes en el mundo entero (ONUSIDA, 2008). Actualmente, en todas las regiones del mundo se han detectado casos de personas infectadas con VIH (Figura 1).

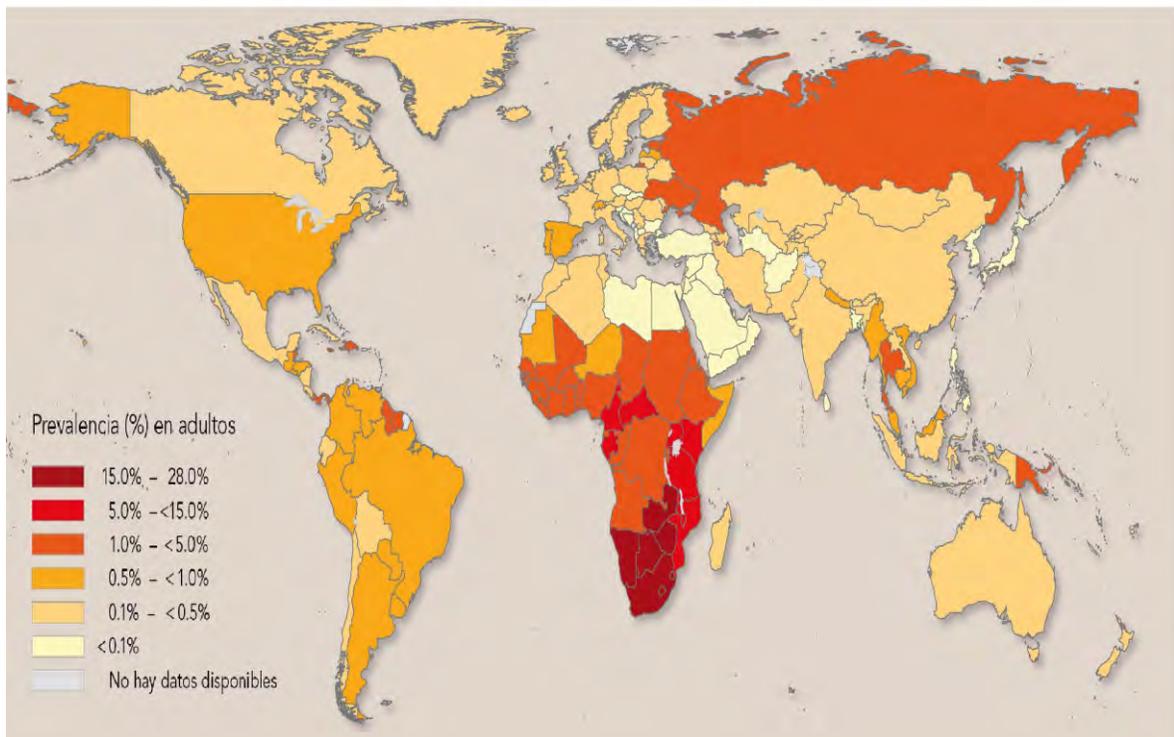


Figura 1. Estatus de propagación mundial del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), así como el grado de infección en cada uno de ellos. Las zonas más oscuras representan países con un mayor porcentaje de infección mientras que las zonas más claras aquellos con un menor porcentaje (ONUSIDA, 2008).

En América Latina la estimación de personas que viven con VIH en el 2007 fue de 1.7 millones (ONUSIDA, 2008), y de acuerdo con las estimaciones más recientes del Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CENSIDA), en México, los casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) acumulados hasta el 2009 son 131,000 de los cuales 108,000 son hombres y sólo 23,000 son mujeres (CENSIDA, 2009).

Estos niveles generales de infección han tenido un comportamiento constante en la última década. La principal manera de transmisión del VIH, en América Latina, es la vía sexual y en menor grado por el uso de drogas intravenosas.

Además de los aspectos sociales e individuales, que marcan una diferencia de género, existen factores biológicos, entre los que se encuentran el factor hormonal, que puede participar en la susceptibilidad a la infección por VIH. Existe evidencia que indica que la progesterona (P) regula el contenido de los correceptores al VIH (CCR5 y CXCR4) en tejido reproductivo y en sangre periférica de sujetos sanos.

Hasta el momento se desconoce el efecto de la P sobre la expresión de los correceptores CCR5 y CXCR4 durante la infección por VIH. Por tal motivo, en este proyecto se estudió el efecto de la P sobre el contenido de los correceptores CCR5 y CXCR4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes VIH positivas por la técnica de Western Blot.

4. Antecedentes generales.

4.1. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

4.1.1. Características del VIH.

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH), (Figura 2), es un lentivirus perteneciente a la familia de los retrovirus con un diámetro de 70 nm. La parte externa del virus, conocida como envoltura viral, está formada por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula hospedera y que el virus la adquiere cuando pasa a través de la membrana celular. Esta envoltura puede contener proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) 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 dos glicoproteínas, una transmembranal de 41 KDa (gp41) y la otra de superficie de membrana de 120 KDa (gp120). Debajo de la envoltura está localizada 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, la proteína p7 (nucleocápside) y tres enzimas, p51 (transcriptasa reversa), p11 (proteasa) y p32 (integrasa) (Alcamí, 2004)

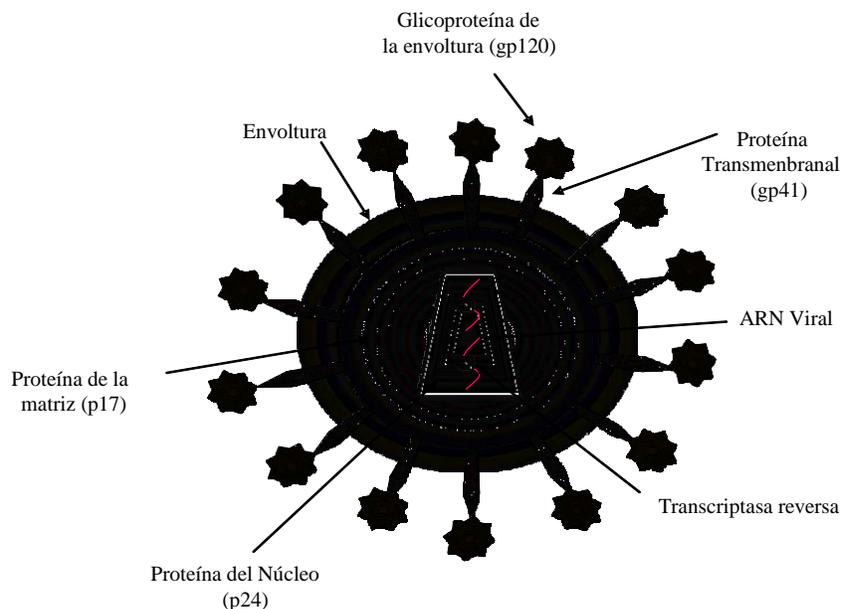


Figura 2. Estructura general del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

El genoma del VIH, de un tamaño aproximado de 9.8 Kb (Figura 3), contiene 9 genes que codifican a 16 proteínas (Tabla 1), estos genes pueden ser clasificados en tres grupos de acuerdo a su función:

- a) Genes estructurales; Gag, Pol y Env.
- b) Genes reguladores; Tat y Rev.
- c) Genes accesorios; Vpu, Vpr, Vif y Nef.

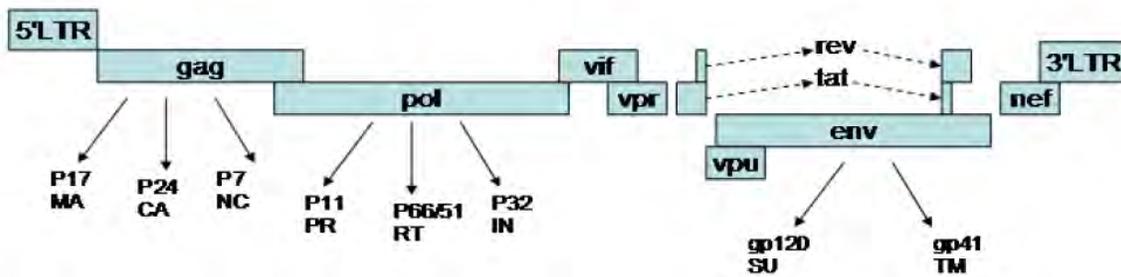


Figura 3. Genoma del VIH. Representación de la organización de los genes del VIH-1 así como su corte y empalme transcripcional (líneas punteadas) (Costin, 2007).

Genes estructurales:

- *Gag* codifica para proteínas de la cápside p17, p24 y p7, las cuales reclutan a la transcriptasa reversa, proteasa e integrasa, productos del gen *pol*.
- *Env* codifica para la proteína de envoltura, *env*, la cual es sintetizada como una proteína en el retículo endoplásmico y posteriormente es glicosilada en el aparato de Golgi, en la célula hospedera (Sierra et al., 2005). Una vez glicosilada, *env* es cortada por una proteasa viral dando origen a las glicoproteínas de membrana; *gp120* y *gp41* (Costin, 2007).

| Gen | Proteína | Función |
|------------|----------------------|--|
| <i>env</i> | gp160 | Poliproteína precursora de gp12 y gp41. |
| | gp120 | Proteína de envoltura viral. Interacción con el receptor CD4 y correceptores. |
| | gp41 | Fusión de membranas. |
| <i>gag</i> | p55 | Poliproteína precursora de proteínas estructurales (p24, p17, p7, p6). |
| | p24 | Proteína estructural de cápside. |
| | p17 | Proteína estructural de matriz. |
| | p7 | Proteína estructural de nucleocápside. |
| <i>pol</i> | Trascriptasa reversa | Transcripción reversa. |
| | Integrasa | Integración el genoma viral. |
| | Proteasa | Procesamiento postraduccional de proteínas. |
| <i>tat</i> | Tat | Elongador del ARNm. Transactivador. Inducción de apoptosis de la célula hospedera. |
| <i>rev</i> | Rev | Regulador del transporte y procesamiento del ARNm. |
| <i>nef</i> | Nef | Incremento de la infectividad viral. Incremento de la retrotranscripción. Regulación negativa de CD4 y MHC I. Inducción de apoptosis en CTL. |
| <i>vif</i> | Vif | Incremento de infectividad viral. |
| <i>Vpr</i> | Vpr | Transactivador viral. Transporte del complejo de preintegración al núcleo. Detención del ciclo celular. Inducción de apoptosis de la célula hospedera. |
| <i>vpu</i> | Vpu | Secuestro de CD4 en el retículo endoplásmico. Incremento en la generación de viriones. |

Tabla 1. Proteínas del VIH (Modificado de Alcamí, 2004).

La glicoproteína extramembranal *gp120* tiene como función principal el reconocimiento del receptor principal CD4 y de los correceptores CCR5 y CXCR4, localizados en la membrana de las células blanco (Deng et al., 1996). Por otro lado *gp41* es una glicoproteína integral de membrana, responsable de la fusión de las membranas viral y celular mediante una región denominada dominio de fusión, localizado en su extremo N-terminal (Levy, 1993).

- *Pol* codifica para las enzimas; transcriptasa reversa (p66), proteasa (p11), e integrasa (p32), esenciales para la replicación del virus (Frankel et al., 1998).

Genes reguladores.

- *Tat* codifica para una proteína involucrada en la regulación de la transcripción del genoma viral mediante la interacción con regiones promotoras denominadas LTR.
- *Rev* regula la expresión de genes necesarios para el virus en la transición en la expresión de proteínas de etapas tempranas a fases tardías de la infección (Strebel, 2003).

Genes accesorios.

- *Nef* codifica para una proteína con capacidad de inhibir la expresión del receptor CD4, que evita la interacción con otros virus e impide la superinfección viral. También inhibe la expresión de MHC I en la superficie de la célula, lo que interfiere con la respuesta inmunológica.

- *Vpr* codifica para una proteína que actúa como factor de transporte nucleó-citoplasmático, facilitando la transferencia del DNA viral del citoplasma al núcleo celular (Le Rouzic et al., 2005). Además, *Vpr* mantiene a la célula en fase G2 del ciclo celular, previniendo la entrada a mitosis.
- *Vpu* codifica para una proteína que regula la síntesis y secuestro de CD4 en el retículo endoplásmico de la célula hospedera, además de contribuir a la liberación de viriones mediante la inducción de apoptosis de la célula hospedera (Bour et al., 2003).
- *Vif* codifica para una proteína que promueve la maduración de los viriones. Se ha observado que un virus con delección de *Vif* genera viriones sin la capacidad de infectar nuevas células (Costin, 2007; Frankel et al., 1998).

4.2. Ciclo replicativo del VIH.

El ciclo replicativo del VIH, (Figura 4) inicia con el contacto entre la proteína viral gp120 (dominio VI) y el receptor CD4 de la célula hospedera, presente en linfocitos T CD4⁺, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans (Caratola, 1999). Sin embargo, la unión requiere de la intervención de moléculas denominadas correceptores (CCR5 y CXCR4), que son importantes para que se lleve a cabo el proceso de fusión entre las membranas celular y viral (Yábar, 2003).

La unión entre gp120 y 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). Una vez llevada a cabo la interacción

gp120/correceptor, el extremo amino terminal del péptido de fusión de la proteína gp41 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 (Costin, 2007).

CCR5 es utilizado principalmente 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 etapas tardías de la infección. Cabe mencionar que existe un tercer tipo de virus que puede interactuar con ambos correceptores (VIH R5X4) (Alcamí, 2004)

La fusión de membranas provoca la pérdida de la membrana viral y la liberación de la nucleocápside en el interior de la célula, la cual libera factores celulares y proteínas virales como son *Gag*, *Nef*, *Vif*, *proteasa*, *integrasa*, *transcriptasa reversa* y *las dos hebras de RNA*, las cuales son esenciales para la replicación del virus (Frankel et al., 1998).

Una vez liberado el contenido viral, el genoma del VIH es retrotranscrito a DNA por la transcriptasa reversa viral y posteriormente es trasladado al núcleo de la célula hospedera por medio de la integrasa del virus. El DNA viral es transcrito por medio de la RNA polimerasa celular produciendo hebras de RNA que dan origen a proteínas precursoras virales las cuales son llevadas al citoplasma donde son cortadas por la proteasa viral 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 (Simon et al., 2006, Caratola, 1999).

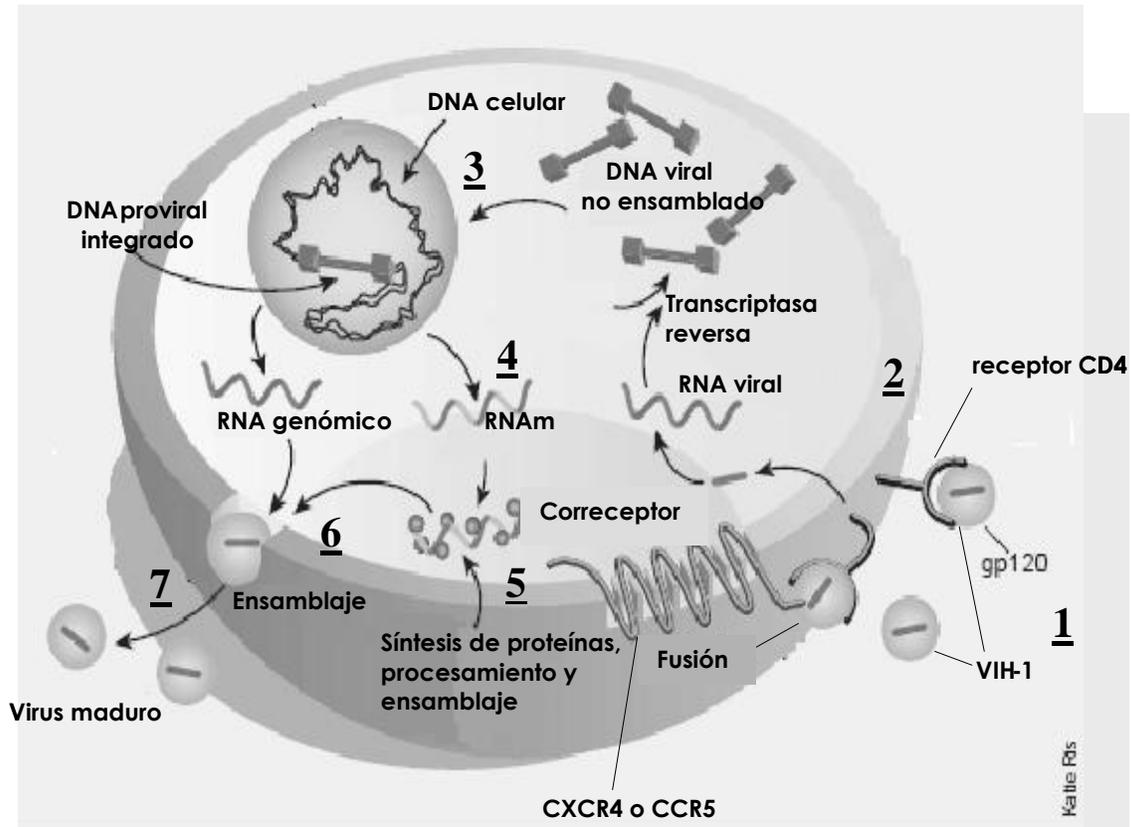


Figura 4. Esquema representativo del ciclo replicativo del VIH. El ciclo replicativo del VIH se divide en 7 etapas; 1) Acoplamiento de las proteínas de la envoltura viral (gp 120 y gp 41) con un receptor principal (CD4) y un correceptor (CCR5 o CXCR4) y fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula hospedera; 2) Transcripción inversa: Las cadenas sencillas de RNA viral son transcritas a cadenas dobles de DNA mediante la enzima transcriptasa reversa; 3) Integración del DNA viral al genoma hospedero por la integrasa; 4) Transcripción: La célula infectada transcribe al mismo tiempo el DNAv y DNA propio; 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 (Modificado de Fauci, 2003).

4.3. Patogénesis del VIH.

El SIDA constituye la principal causa infecciosa de muerte en adultos de todo el mundo. De acuerdo a las estimaciones más recientes del Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CENSIDA), hasta el 2009 en México, existen alrededor de 131 mil personas adultas con SIDA. Del total de pacientes con SIDA aproximadamente el 83% son hombres y el 17% 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, 2009).

Dicho padecimiento se caracteriza por el deterioro de la respuesta inmune a diversos patógenos debido a una disminución progresiva de células CD4⁺. La historia natural de la enfermedad, sin tratamiento, se divide en tres etapas (Caralota., 1999) (Figura 5):

- 1) Infección aguda o primaria (Figura 5a): fase de viremia donde se produce síndrome de mononucleosis severa. Se presenta una inmunosupresión pasajera (debida a una disminución de linfocitos T CD4⁺). 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% desarrollan 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⁺ llevando al virus a un estado de latencia.

- 2) Fase de latencia (Figura 5b): ocurre un decremento gradual y progresivo en la cuenta de linfocitos T CD4⁺, además de una disminución 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 ser incluso de años.

- 3) Enfermedad clínicamente aparente (SIDA) (Figura 5c): ocurre un incremento en la replicación de partículas virales y una disminución drástica de linfocitos T CD4⁺ llegando a un conteo igual o menor a 200 células/cm³ de sangre. 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).

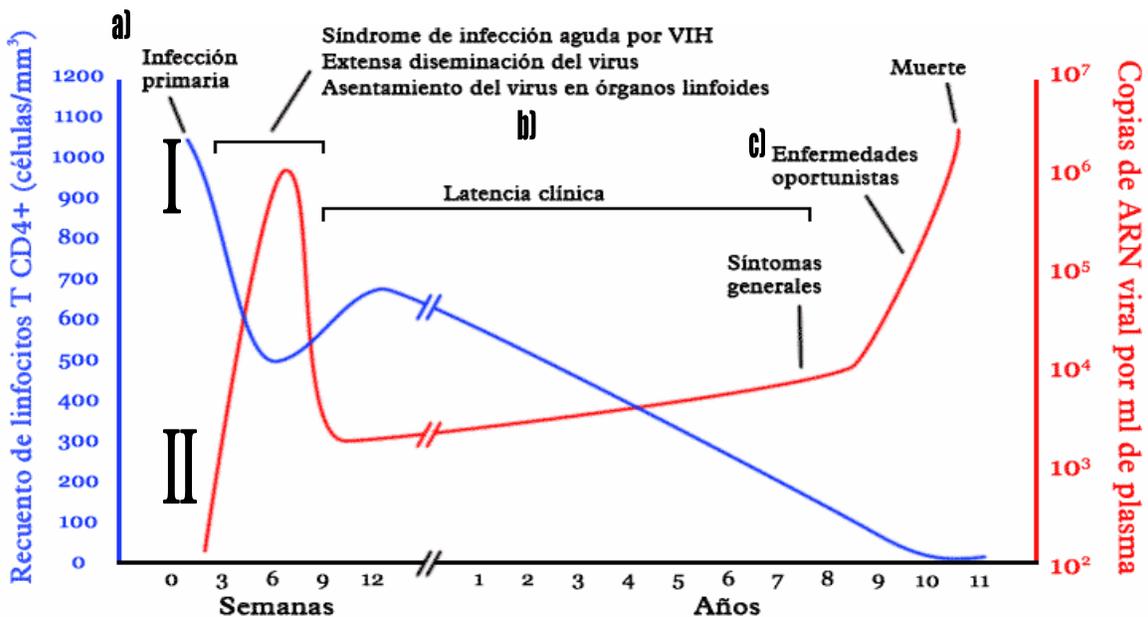


Figura 5. Curso de la infección por VIH-1. La infección por VIH está compuesta por tres etapas: a) Infección primaria en donde existe un decaimiento abrupto de linfocitos T CD4⁺ y un incremento en la replicación del virus. b) Etapa de latencia, en donde se presenta un decremento constante y gradual de los linfocitos T CD4⁺ y se presenta una disminución en la replicación del VIH pero sin detenerse. c) SIDA, se presenta una depleción de linfocitos T CD4⁺ igual o menor a 200 células/cm³ de sangre y un incremento en la replicación viral, se desarrollan enfermedades oportunistas e incluso la muerte. I: recuento de linfocitos T CD4⁺, II: copias de RNA viral por mL de plasma (Paranjape, 2005).

Se han descrito factores intrínsecos del virus y factores del hospedero que regulan la patogénesis y la infección por VIH; por ejemplo: la actividad del genoma viral integrado al DNA de la célula hospedera se ve influenciada por el metabolismo, vida media de la célula hospedera y la actividad de la proteína viral *Tat*. Estos factores son más evidentes en los linfocitos T CD4⁺, sumado a esto, los linfocitos T CD4⁺ componen el 65-80% de las células linfocíticas en sangre periférica, (Sudharshan et al., 2008), por lo que la infección y replicación del virus en estas células son más abundantes que en otro tipo de células del organismo. Otro factor que regula la patogénesis del VIH es la delección de 32 pb en el gen que codifica a CCR5 (CCR5 Δ 32). Esta delección 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 latinoamericanos (Martinson et al., 1997).

4.4. Correceptores del VIH: CCR5 y CXCR4

Los correceptores CCR5 y CXCR4 están presentes en diferentes tipos de células en el organismo, por lo que la cantidad o distribución de éstos en las células determina el tropismo que presenta el VIH, permitiendo no sólo la infección de los linfocitos T CD4⁺, sino también la infección de células importantes en la presentación de antígeno 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 en reservorios aun frente a tratamientos antirretrovirales (Stevenson, 2003).

Además de su papel como correceptores, CCR5 y CXCR4 actúan como receptores a quimiocinas, las cuales son proteínas de aproximadamente 70-90 aminoácidos que tienen función quimioatrayente sobre células linfocíticas, regulando su activación y traslado al sitio de inflamación, también tienen un papel

importante en los procesos alérgicos, infecciones, enfermedades autoinmunes, angiogénesis, desarrollo tumoral y hematopoyético (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 α -quimiocinas, en las cuales las dos primeras cisteínas están separadas por un solo residuo, y las CC o β -quimiocinas, las cuales presentan las cisteínas en posición adyacente (Berger, 1999).

Los receptores a quimiocinas, compuestos por 340-370 aminoácidos, presentan 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.

4.4.1. CCR5.

CCR5 es un receptor de las β -quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β 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, así como en leucocitos de sangre periférica como en linfocitos T de memoria, efectoros, monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras. CCR5 se codificó en el cromosoma 4 y está constituido por 352 aminoácidos (Figura 6A).

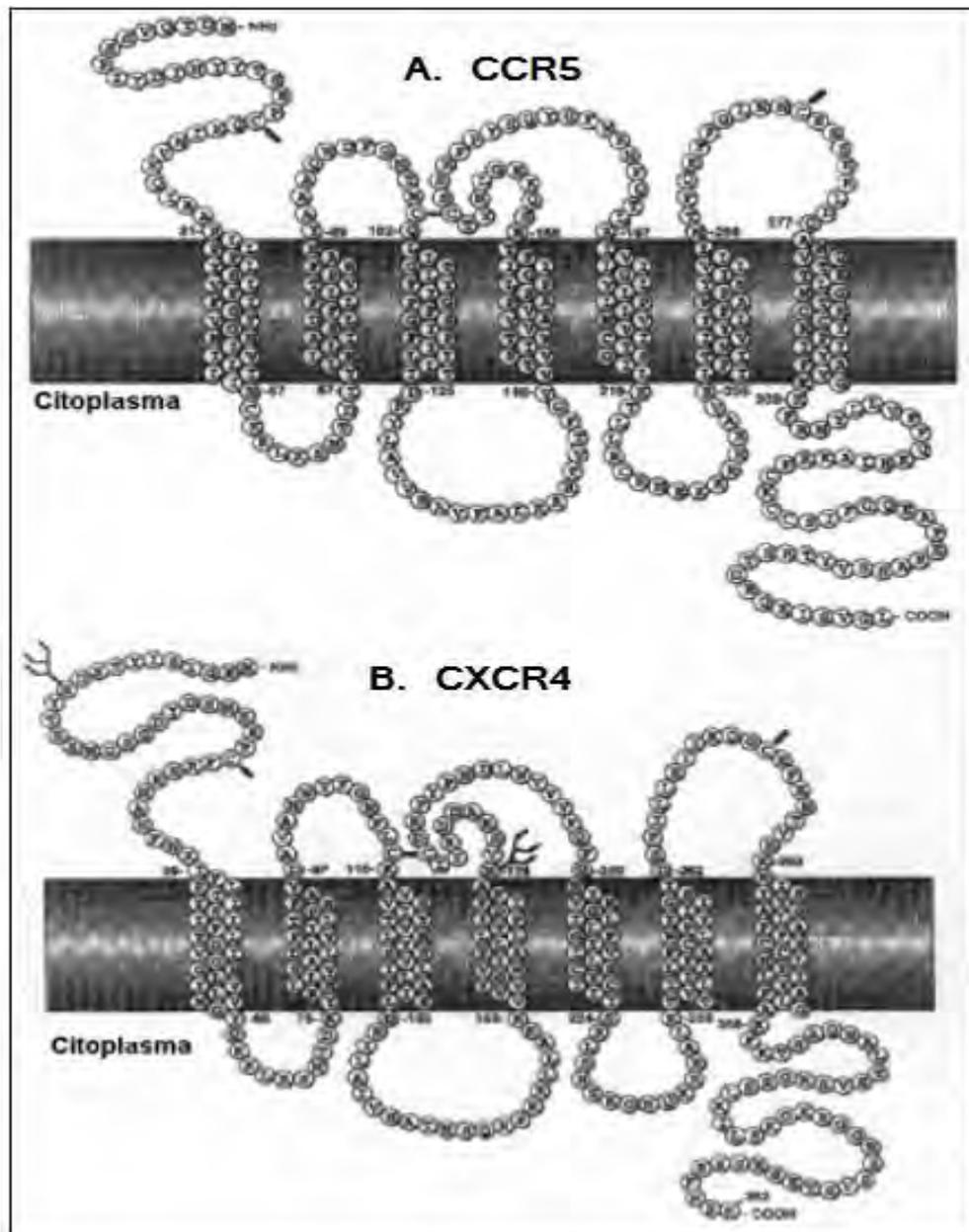


Figura 6. Estructura de los correceptores al VIH. A) Representa la secuencia de aminoácidos que componen a CCR5. B) Representa la secuencia de aminoácidos de CXCR4. Se pueden observar los siete dominios transmembranales característicos de los receptores a quimiocinas (Modificada de Oppermann, 2004, Doranz 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 sulfato, lo cual le confiere cargas negativas que facilitan la interacción ligando-receptor (Oppermann, 2004). Estas cargas negativas también 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, las cuales pueden conferir resistencia o disminución de la susceptibilidad de la infección por el VIH. La delección de 32 pares de bases ($\Delta 32$) en el segundo dominio extracelular del receptor CCR5 resulta en la codificación de 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).

4.4.2. CXCR4.

CXCR4 es un receptor de α -quimiocinas, cuyo ligando es SDF-1 (factor 1 derivado de células del estroma). CXCR4, también conocido como Fusina, tiene como funciones principales la activación de células primarias de líneas leucocíticas, también participa en organogénesis, hematopoyesis y en la inmunoregulación (Doranz et al., 1999).

Este receptor a quimiocinas es uno de los correceptores principales que utilizan 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⁺ (Bleul et al., 1996).

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 (Figura 6B) con un peso aproximado de 43 KDa (Lapham et al., 2004), y está codificada en el cromosoma 2 (Patersen et al., 2006)

Existen condiciones genéticas que alteran la infectividad del VIH y que están relacionadas con la interacción CXCR4/SDF-1, como son: la mutación SDF-1 3'a que ocasiona el incremento en la producción de SDF-1 que compite con el VIH por la unión con CXCR4. Personas que son homocigotas 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)

4.5. Estructura y función de progesterona (P)

La progesterona (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; Figura 7). La P se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo del ovario, durante el ciclo menstrual (Hsue et al., 1984; Hutchison et al., 1986); otros órganos donde también se ha demostrado su síntesis son la corteza suprarrenal, 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 hormona estimulante de los folículos (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina (Graham et al., 1997).

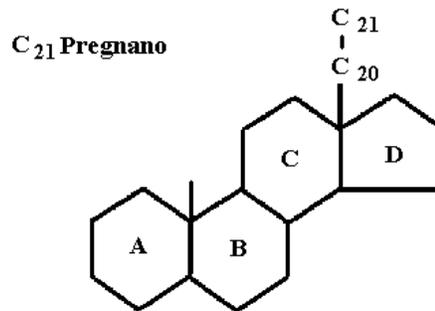


Figura 7. Estructura del pregnano. Las letras indican cada uno de los anillos de la estructura principal de las hormonas esteroides (Gore-Langton et al., 1988).

La síntesis de P se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona mediante la pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 y posteriormente la transformación de la pregnenolona a P tras la oxidación del grupo alcohol en el C-3 y la migración del doble enlace del anillo A al anillo B (Figura 8). Estos procesos son llevados a cabo por medio de distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

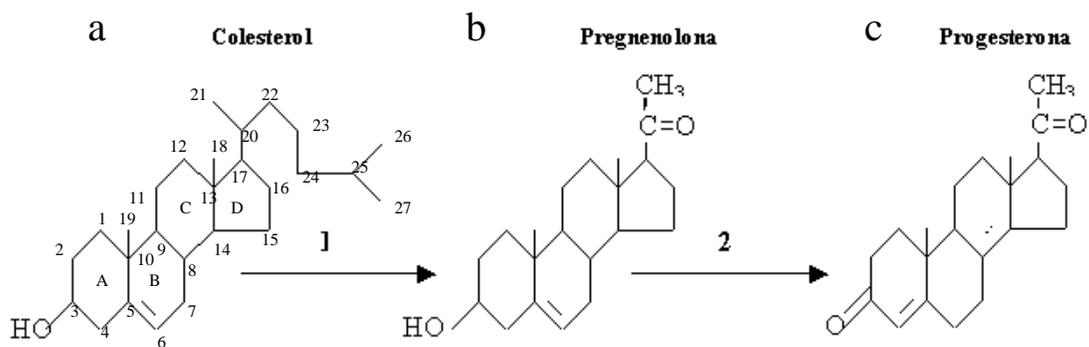


Figura 8. Biosíntesis de la P. La biotransformación de colesterol a P implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Estructura del colesterol. b) estructura del la pregnenolona. c) Estructura de la progesterona. 1) 20,22 esteroide liasa; 2) 3 β -OH-esteroide deshidrogenasa (Gore-Langton et al., 1988).

Una vez que la P y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

La reducción en el carbono 20 da lugar a la formación de 20α y 20β dihidroprogesterona (con actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la de P); posteriormente se reduce el anillo A en los carbonos 3 y 5 dando lugar a la formación de ocho pregnandiolos o pregnantrioles.

La reducción a pregnandiolos permite la conjugación para formar glucurónidos, que al ser de carácter hidrofílicos, facilitan su excreción por la orina (Figura 9).

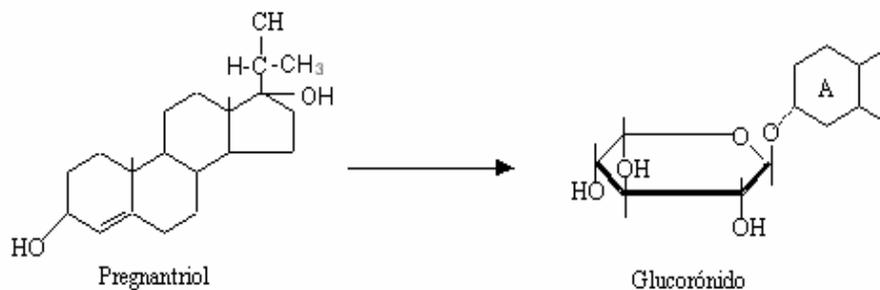


Figura 9. Conjugación del pregnantriol con el ácido glucurónico (Renwick, 1790).

La P participa en un amplio rango de funciones biológicas en diferentes tejidos, entre los que se encuentran el útero y 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., 1995; Camacho-Arroyo et al., 1999; González et al., 1998; Vongher y Frye, 1999). Además, se ha descrito que la P está implicada en la regulación de la masa ósea, involución del timo, regulación del ciclo celular, así como en la regulación de la respuesta inmune, teniendo efectos sobre la migración y 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).

4.6. Mecanismos de acción de la progesterona.

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 con el RP, el cual dimeriza e interactúa con elementos de respuesta a P (ERP) ubicados en la región promotora de los genes blanco (Camacho-Arroyo, 2003).y así regula la transcripción de genes específicos. En ausencia del ligando el RP forma complejos con proteínas chaperonas, entre ellas las proteínas de choque térmico (40, 70 y 90), ficobilinas (FKBP51 y KKBP52) y p23 (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006). Una vez que la P se une al RP éste presenta cambios conformacionales que le permiten disociarse 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 a progesterona (PRE). Los PRE 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 PRE, 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.

El mecanismo no genómico involucra la acción de la P sobre la membrana plasmática, 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, interacción con receptores membranales específicos e interacción con

receptores a neurotransmisores como el GABA_A (Figura 10) (Camacho-Arroyo, 2003).

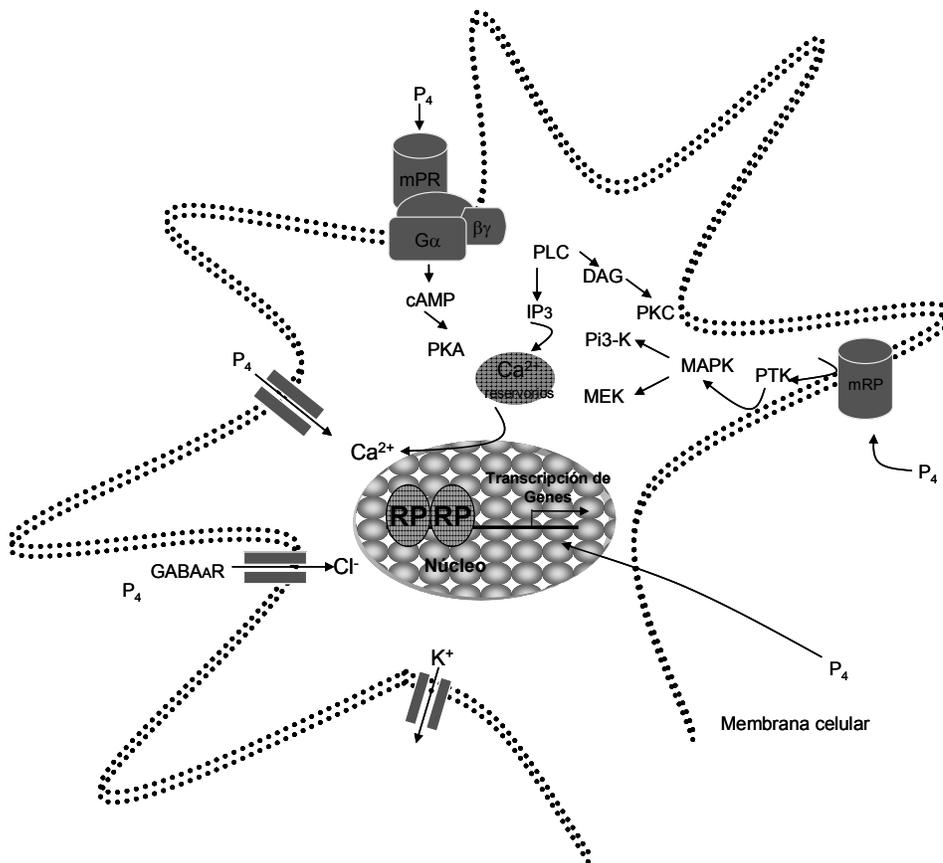


Figura 10. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P. Los efectos de la P ocurren por 2 diferentes mecanismos celulares: 1) en la membrana, incluyen receptores membranales y canales, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares; 2) 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 a hormonas, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA. G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G; PKA: Proteína Cinasa A; RGABA_A: Receptor a GABA tipo A; RP: Receptor a P; PLC: Fosfolipasa C; IP3: Inositol Trifosfato; DAG: Diacil glicerol; PKC: Proteína Cinasa C; PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato; PTK: Proteína de Tirosina Cinasa; MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno; MEK: Cinasa de MAPK; Cl⁻: Cloro; Ca²⁺: Calcio; K⁺: Potasio (Tomada de Camacho-Arroyo, 2003).

4.6.1. Características del Receptor a P (RP)

El RP pertenece a la familia de receptores a hormonas esteroideas; cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner et al., 1990). Este receptor presenta dos isoformas: una larga denominada B y una corta denominada A (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Ambas isoformas se generan a partir del mismo gen pero son reguladas por distintas regiones promotoras (Figura 11). 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 (Figura 11B) (Misrahi et al., 1993) que genera un ARNm de 3014 pb (Theveny et al., 1987).

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

- 1) Dominio NH₂ 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 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.

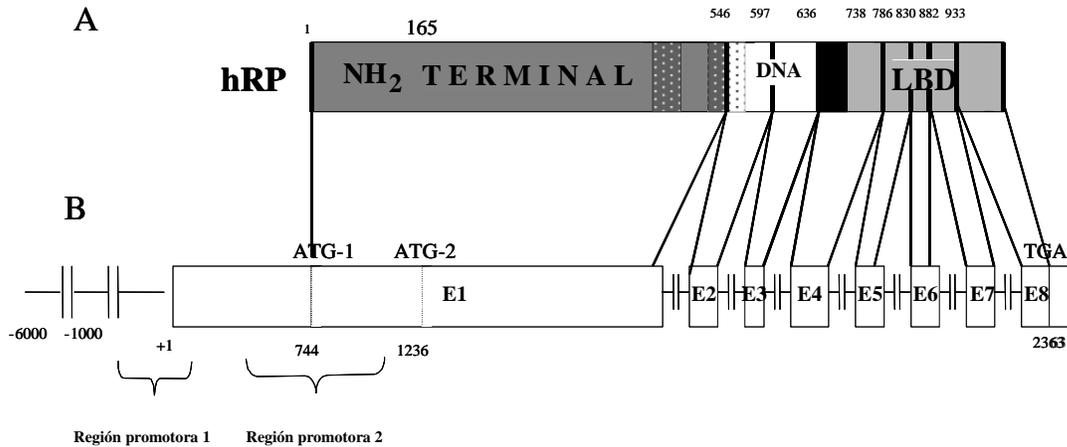


Figura 11. Estructura del gen del RP humano. A) Se esquematiza el RP del humano (hRP). La secuencia de aminoácidos del hRP está dividida en 4 dominios: el dominio amino terminal señalado en color gris oscuro, el dominio de unión al DNA señalado en color blanco, el dominio bisagra señalado en color negro 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).

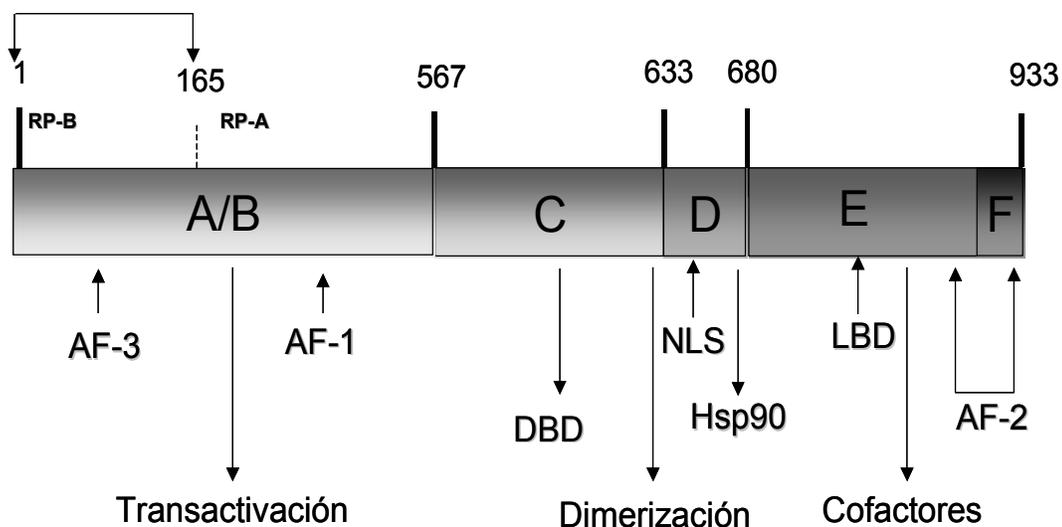


Figura 12 Esquema representativo de los dominios del RP. A-E dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. AF: función de activación, DBD: dominio de unión al DNA, LBD: dominio de unión al ligando; NLS: Sitios de localización nuclear.

4.6.2. 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 no contiene 164 aminoácidos en la región amino terminal, que están presentes en RP-B (Figura 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 la isoforma B (Loosfelt et al., 1986).

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 (de -711 a +31 que corresponde a la secuencia promotora de RP-B) y otra proximal (de +464 a +737 que corresponde a la secuencia promotora de RP-A), que dan lugar a diferentes mRNA (Kastner et al., 1990, Kraus et al., 1993) (Figura 13).

Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad para la P y los ERP (Christensen et al., 1991). El RP tiene la capacidad de unirse al

DNA en sus tres especies diméricas: AA, AB, BB. Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros y cuando estos interactúan con agonistas y antagonistas (Leonhardt et al., 1998).

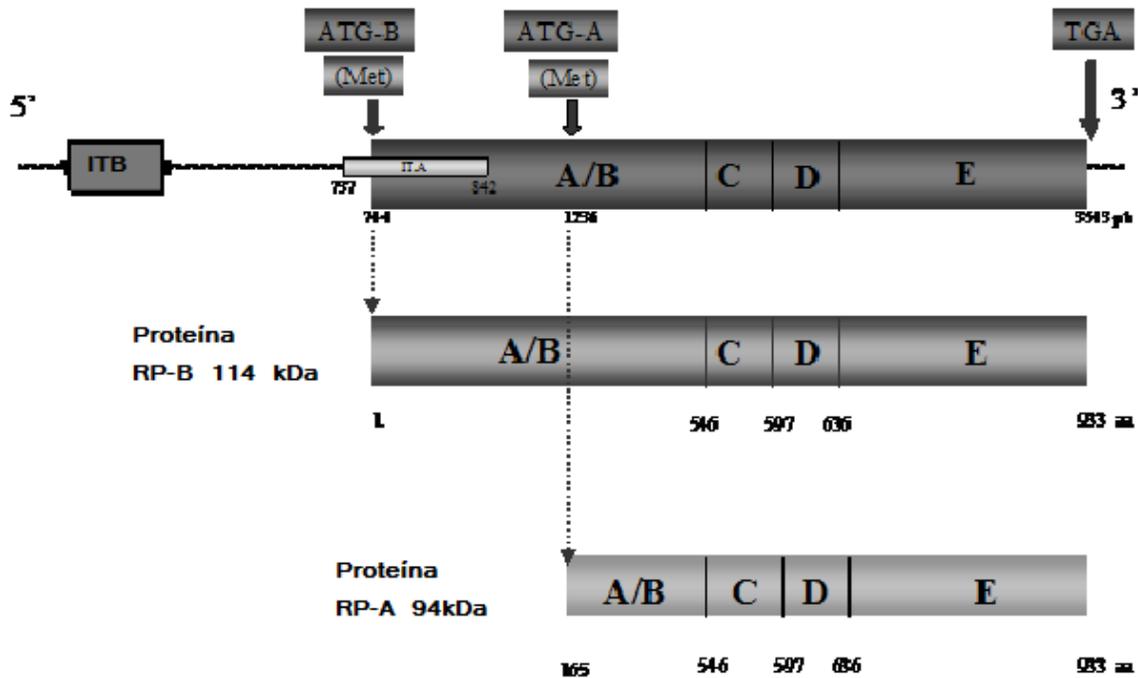


Figura 13 Esquema representativo de las isoformas del RP. ITB: Sitio de inicio de la transcripción del RP-B; ITA: Sitio de inicio de la transcripción del RP-A; ATG-B: Codón de inicio de la traducción del RP-B; ATG-A Codón de inicio de la traducción del RP-A; TGA: Codón de paro de la traducción del RP;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

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 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 de la transcripción como SMRT y RP-B por coactivadores transcripcionales como SRC-1 (Giangrande et al., 1999).

Estas observaciones sugieren 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).

4.7. Papel de la progesterona 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 citocinas 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 la producida por el VIH.

Datos epidemiológicos sugieren la existencia de diferencias en los niveles de carga viral y en la cuenta de linfocitos T CD4⁺ 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).

4.7.1. 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; Vassiliadou et al., 1999; Yeaman et al. 2003; Chao et al., 2006; Prakash et al., 2002). Los datos reportados acerca de la regulación de CCR5 y CXCR4 por hormonas sexuales y anticonceptivos orales son contradictorios y dependen del tejido, estado de activación inmune y concentración hormonal.

En células epiteliales de útero de mujeres sanas, la expresión del receptor CD4 y de los correceptores CCR5 y CXCR4 se modificó durante las diferentes etapas del ciclo menstrual. Durante la fase secretora del ciclo menstrual, cuando los niveles de P son altos (1.6-23 ng/mL), el número de células positivas a CXCR4 fue mayor que en la fase proliferativa del ciclo menstrual cuando los niveles de P son menores (0.15-1.4 ng/mL) en tanto que CCR5 se comportó de manera opuesta, es decir, el número de células positivas a CCR5 fue 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 μ M) disminuyó la expresión de CCR5 y CXCR4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de mujeres sanas (35% y 42%, respectivamente). Además cultivos de PBMCs tratados con P (10 μ M) y expuestos a cepas HIV-1_{MN} y HIV-1_{JR-CSF} durante 15 días, que corresponden a virus tipo T-trópico y M-trópico respectivamente, presentaron una disminución en la detección de la proteína viral p24 lo cual sugiere que la P tienen un efecto de inhibición en la infección por VIH en PBMCs, *in vitro* (Vassiliadou et al., 1999)

Hasta el momento, los datos reportados de la regulación de los correceptores al VIH por P se han realizado únicamente en mujeres sanas, por lo que desconoce si

existe un efecto en la regulación de CCR5 y CXCR4, por P en mujeres VIH positivas.

5. Planteamiento del problema.

Se desconoce el papel de la P en la regulación del contenido de los correceptores al VIH (CCR5 y CXCR4) en células de mononucleares de sangre periférica de pacientes infectadas con VIH.

6. Hipótesis.

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

7. Objetivos generales.

Estudiar el papel de la P y de su receptor en la regulación del contenido de los correceptores CCR5 y CXCR4 en PBMCs de pacientes infectadas con VIH-1.

7.1. Objetivos particulares

1. Conocer el efecto de la P sobre el contenido de CXCR4 y CCR5 en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica de mujeres infectadas con VIH mediante la técnica de Western Blot.

2. Determinar si el RP regula el contenido de CXCR4 y CCR5 en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica de pacientes VIH positivas.

8. Metodología

Se analizaron muestras de pacientes seropositivas que acuden al Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán entre Mayo del 2007 y Septiembre del 2009.

8.1. Criterios de inclusión para el estudio.

Las donadoras cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

Mujeres infectadas con VIH: Edad de 25 a 45 años y presencia de al menos 4 ciclos menstruales regulares.

8.2. Criterios de exclusión para el estudio.

Las donadoras que presentaron los siguientes criterios quedaron fuera del estudio:

Mujeres Infectadas con VIH: Administración de hormonas sexuales (anticonceptivos hormonales) en el último año, gonadectomía o administración de medicina herbolaria.

8.3. Toma de muestra y separación de PBMCs en gradiente de Ficoll Hypaque.

Se tomó una muestra de 20 mL en un tubo con EDTA de sangre venosa de donadoras seronegativas (SN, como grupo control) e infectadas con VIH. La muestra se centrifugó a 3,500 rpm por 15 minutos a una temperatura de 20°C. Se retiró el plasma y se agregaron 2 mL de PBS para resuspender el paquete celular. En un tubo con 5 mL de Ficoll Hypaque se adicionó la suspensión del paquete celular y se centrifugó a 1,500 rpm por 30 minutos para obtener las PBMCs. Por ultimo se realizó un lavado con PBS y se centrifugó a 1,500 rpm por 10 minutos.

8.4. Cultivo celular.

Se realizó el conteo de PBMCs en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) para obtener 5×10^6 células y se colocaron en medio de estimulación (RPMI-rojo fenol suplementado con suero bovino fetal al 10%, PHA-L (20 u/mL) e IL-2 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células se incubaron en botellas de cultivo de 72 cm^3 a 37°C, 5% CO_2 y humedad durante 48 horas.

Posterior a la incubación con el medio de estimulación se realizaron 3 lavados con PBS 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), antagonista de la P, el RU486 (1 μM) y el tratamiento conjunto P (100 nM) + RU486 (1 mM). Los cultivos se dividieron en los siguientes grupos:

- 1) Vehículo de la hormona 24h.
- 2) P 10 nM, 24 h.
- 3) P 100 nM, 24 h.
- 4) RU486 1 μM , 24 h.
- 5) P 100 nM + RU486 1 μM , 24 h.

Una vez concluidos los tratamientos, las células fueron colectadas con PBS en frío y centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el botón celular obtenido se almacenó a -70°C , para su posterior uso.

8.5. Determinación del contenido CCR5 de y CXCR4.

8.5.1. Extracción de proteínas totales.

Las células se colocaron en buffer de lisis con una mezcla de inhibidores de proteasas (10 mM Tris-HCl, 1 mM ditioneitol, 30% glicerol, 1% Triton X-100, 15 mM azida de sodio, 1 mM 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).

8.5.2. Western Blot.

Las proteínas obtenidas de las células (50 µg) se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% 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 20 volts, durante 2 h en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas se bloquearon por 2 h a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 3% y albúmina bovina sérica al 1% en TBS 1X.

Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti CXCR4 (IgG-HRP CD184, Chemicon AB-1847) en una dilución 1:250 o anti CCR5 (IgG-HRP CKR5, Santa-Cruz sc-17833) en una dilución 1:500. 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 1:15 000 por 45 min. 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 y 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 α -tubulina por medio de la técnica de western blot como se describió previamente.

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico utilizando un aparato Scan Primax 600p (Colorado) y el programa KODAK 1D Image Análisis Software para cuantificar la expresión de las isoformas del RP y α -tubulina, de acuerdo a la intensidad de cada banda.

A los datos obtenidos se les aplicó una prueba de U de Mann-Whitney. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para calcular los valores de probabilidad.

9. Resultados.

En el presente trabajo se estudió el papel de la P sobre la regulación del contenido de los correceptores al VIH (CCR5 y CXCR4) en PBMCs de pacientes infectadas con VIH.

Para determinar el efecto de P sobre la regulación del contenido de CCR5 y CXCR4 en PBMCs de pacientes VIH positivas, se cultivaron las PBMCs como se indicó previamente en la metodología y posteriormente recibieron los siguientes tratamientos: vehículo de hormonas (V, 0.02%); P (10 y 100 nM) y P (100 nM) + RU486 (1 μ M) por 24 h. Las células fueron colectadas al término de los tratamientos y se extrajo la proteína total. Por medio de la técnica de Western Blot se identificaron los correceptores CCR5 y CXCR4.

En la figura 14 se muestra un blot representativo, donde se detectó una banda de 41 KDa correspondiente al correceptor CCR5 en PBMCs de donadoras seronegativas, después de 24 h de cada tratamiento. Se detectó otra banda de 55 KDa correspondiente a α - tubulina utilizada como control de carga. También se muestra la gráfica correspondiente al efecto de los distintos tratamientos sobre la regulación del contenido de CCR5 en PBMCs de donadoras seronegativas.

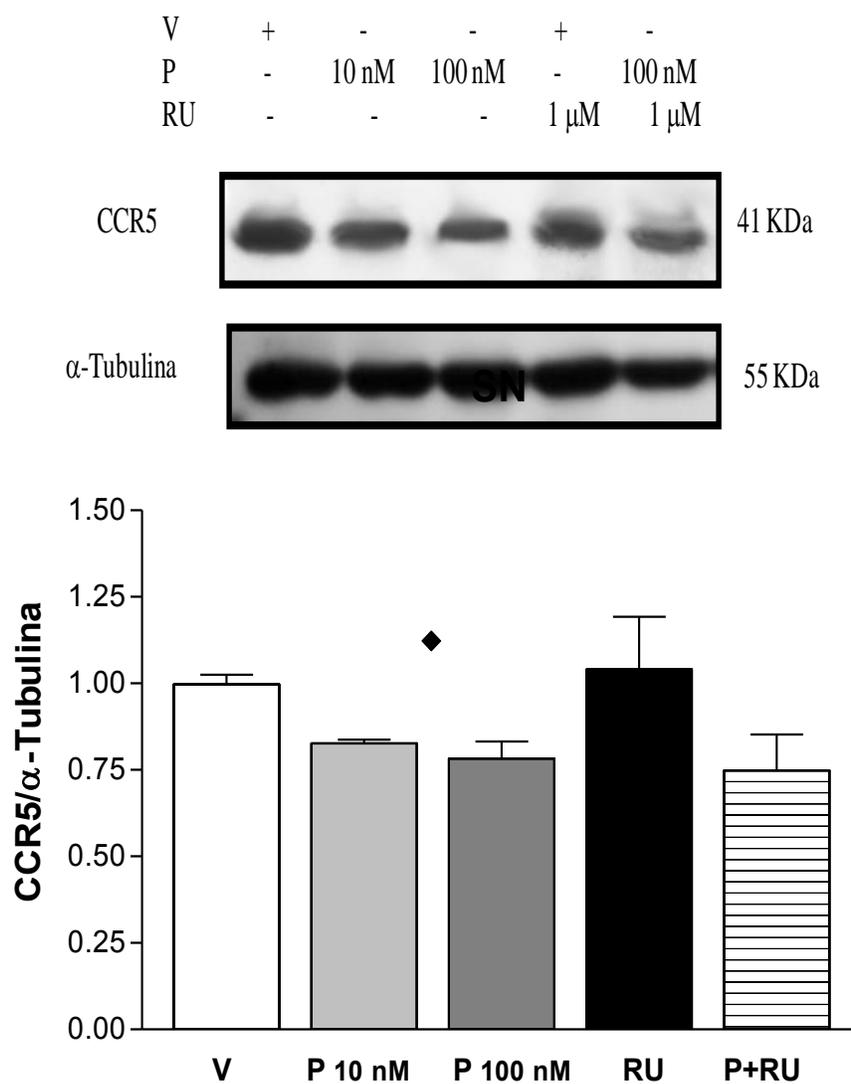


Figura 14. Efecto de P sobre el contenido de CCR5 en PBMCs de donadoras seronegativas tratadas con V, El correceptor detectado por la técnica de Western Blot fue sometido a un análisis densitométrico y los valores obtenidos fueron corregidos respecto al análisis obtenido para α -tubulina. V, P10 y 100 nM n=8; RU486 y P+RU486 n=3. \blacklozenge p<0.05 vs V.

Paralelo al experimento anterior, se realizó la detección del correceptor CCR5 en PBMCs de pacientes VIH positivas, para la determinación del efecto de P sobre la regulación de su contenido. En la figura 15 se muestra un blot representativo así como la gráfica del efecto de los tratamientos de V, P (10 y 100 nM), el antagonista de P, RU486 (1 μ M) y el tratamiento conjunto P (100 nM) + RU486 (1

μM) sobre el contenido del correceptor CCR5 en muestras de PBMCs de pacientes infectadas con VIH.

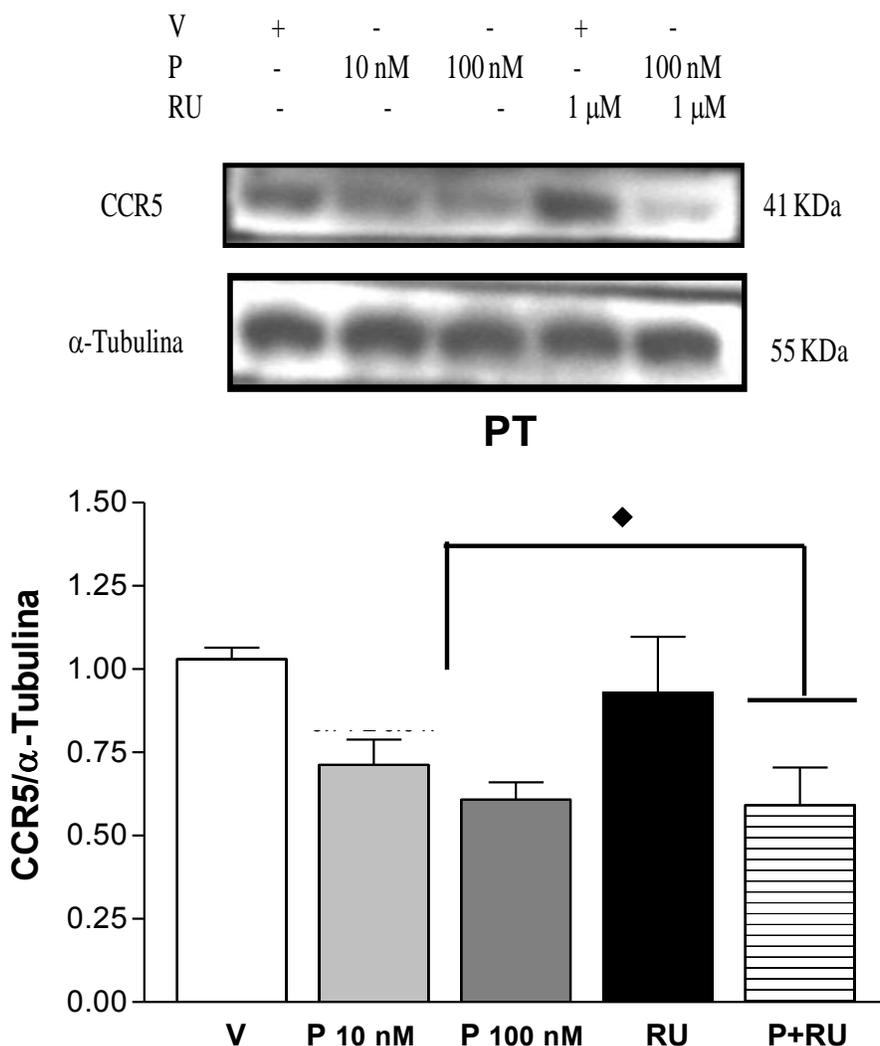


Figura 15. Análisis del efecto de P sobre el contenido de CCR5 en PBMCs de pacientes infectadas con VIH. Las células fueron tratadas por 24 h con V, P (10 y 100 nM), RU486 (1 μM) y P (100 nM) + RU486 (1 μM). El análisis fue corregido respecto a los datos obtenidos del análisis del control de carga α-tubulina. V, P10 y 100 nM n=8; RU486 y P+RU486 n=3. ♦p<0.05 vs V

La P reguló significativamente, de manera negativa, el contenido de CCR5 en PBMCs tanto en donadoras seronegativas como en pacientes VIH positivas desde la dosis de 10 nM (0.818 ± 0.03 , 0.071 ± 0.04 , respectivamente) y este efecto se mantuvo en ambos grupos con la dosis de 100 nM de la hormona (0.78 ± 0.04 , 0.60 ± 0.06 , respectivamente). La disminución del contenido de CCR5 por P en PBMCs fue mayor en pacientes VIH positivas que en pacientes seronegativas (41.7% y 28.44%, respectivamente).

Por otra parte, el RU486, no revirtió el efecto de la P, observándose una disminución en el contenido de CCR5 en ambos grupos (SN: 0.74 ± 0.1 ; VIH: 0.59 ± 0.11).

Una vez estudiada la regulación de CCR5 por P, se realizaron los estudios para determinar la regulación de CXCR4 por P en PBMCs de pacientes VIH positivas y de donadoras seronegativas. Para lo cual se cultivaron las PBMCs como se indicó previamente en la metodología. Posteriormente las PBMCs fueron tratadas con V, P (10 y 100 nM), RU486 (1 μ M) y el tratamiento conjunto de P (100 nM) y RU486 (1 μ M) por 24 h. Al término de cada tratamiento se extrajo la proteína total de las PBMCs y se determinó el contenido de CXCR4 por medio de la técnica de Western Blot.

En la figura 16 se muestra un blot representativo y la gráfica correspondiente al efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de CXCR4 en PBMCs de donadoras seronegativas colectadas 24 h después de cada tratamiento. Se realizaron ocho experimentos independientes de los grupos V 0.02%, P 10 y 100 nM y tres experimentos independientes con tratamiento con el antagonista de P, RU486 (1 μ M) y el tratamiento conjunto P (100 nM) + RU486 (1 μ M). Se detectó una banda de 43KDa correspondiente a CXCR4 y otra banda de 55 KDa perteneciente a α -tubulina utilizada como control de carga.

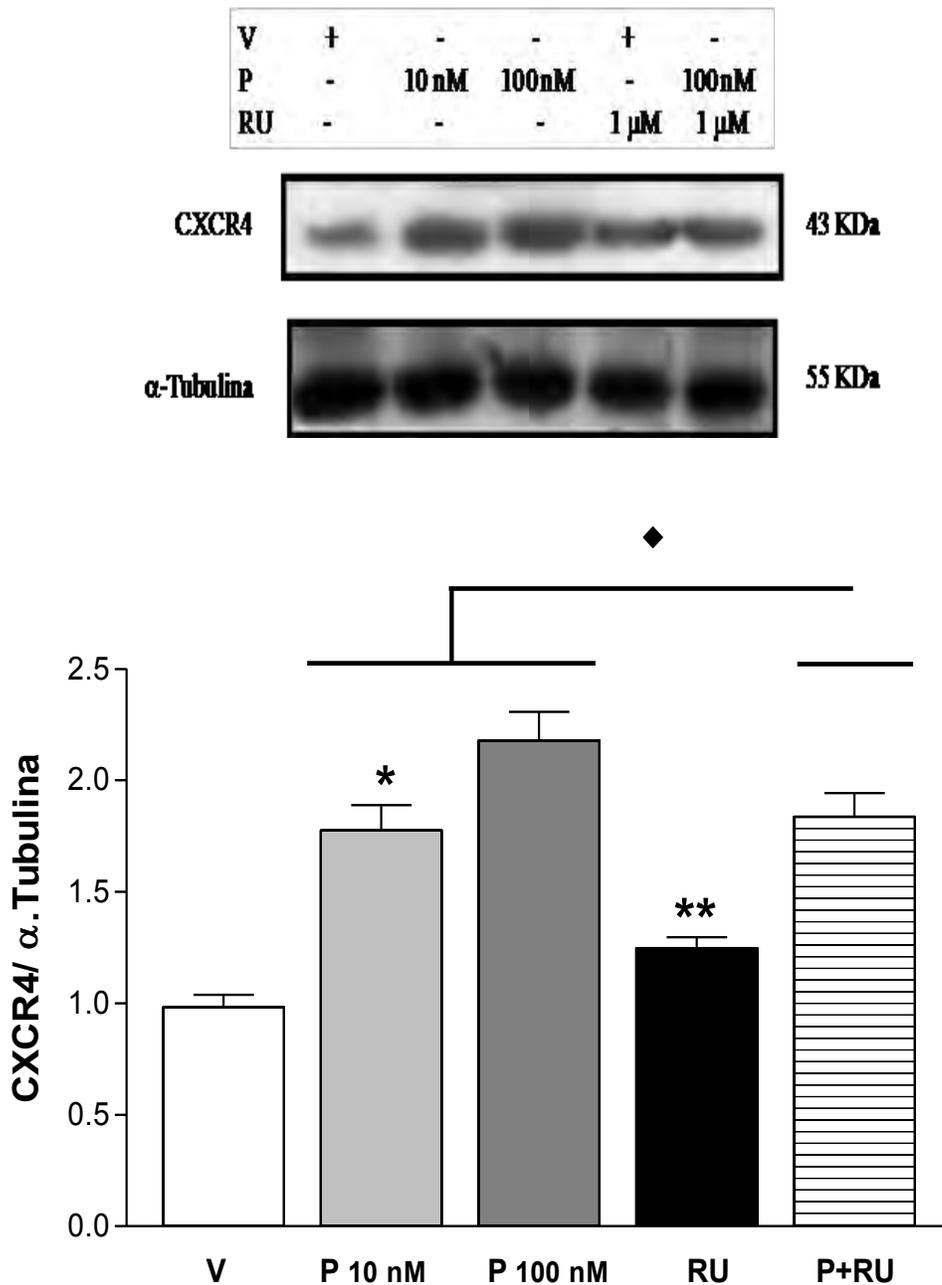


Figura 16. Efecto de la P y de su antagonista RU486 sobre el contenido del corresponsor CXCR4 en PBMCs de donadoras seronegativas (SN). Las PBMCs fueron tratadas por 24 h con V, P (10 y 100 nM), RU486 (1 μ M) y P + RU486 (1 μ M). Los datos fueron sometidos a un análisis densitométrico y los resultados fueron corregidos por los datos obtenidos del análisis del control de carga y se realizó un análisis estadístico. V, P10, P100 n=8; RU486, P+RU486 n=4. \blacklozenge p<0.05 vs V; *p<0.05 vs P100 nM, RU486; **p< 0.05 vs P 100nM y P + RU486.

Paralelo al experimento anterior se realizó la detección de CXCR4 en PBMCs tratadas con V (0.02%), P (10 y 100 nM), el antagonista de P, RU486 (1 μ M) y el tratamiento conjunto de P (100 nM) y RU486 (1 μ M) de pacientes VIH positivas.

En la figura 17 se muestra un blot representativo de la detección de CXCR4 (43 KDa) en los diferentes tratamientos al igual que la detección del control de carga, α -tubulina (55 KDa). También se muestra la gráfica de ocho experimentos independientes (V 0.02%, P 10 y P 100 nM) y tres experimentos independientes (RU486 1 μ M y el tratamiento conjunto de P 100 nM y RU486 1 μ M), donde se representa el efecto de los diferentes tratamientos sobre la regulación del contenido de CXCR4 en PBMCs de pacientes infectadas con VIH.

El tratamiento con P reguló de manera positiva el contenido de CXCR4 en PBMCs tanto de pacientes infectadas con VIH como de donadoras seronegativas al VIH, en comparación con el vehículo. En ambos grupos el efecto se observó desde la dosis de 10 nM de P (1.77 ± 0.11 y 1.34 ± 0.03) y se incrementó con la dosis de 100 nM de P (2.17 ± 0.12 y 1.64 ± 0.03). El incremento del contenido de CXCR4 en PBMCs inducido por el tratamiento con P a una dosis de 10 nM fue más notorio en donadoras seronegativas que en pacientes infectadas con VIH (78.8% y 26.4%, respectivamente) y este efecto fue incrementado por la dosis de 100nM de P en ambos grupos (64.0% y 118.0%, respectivamente).

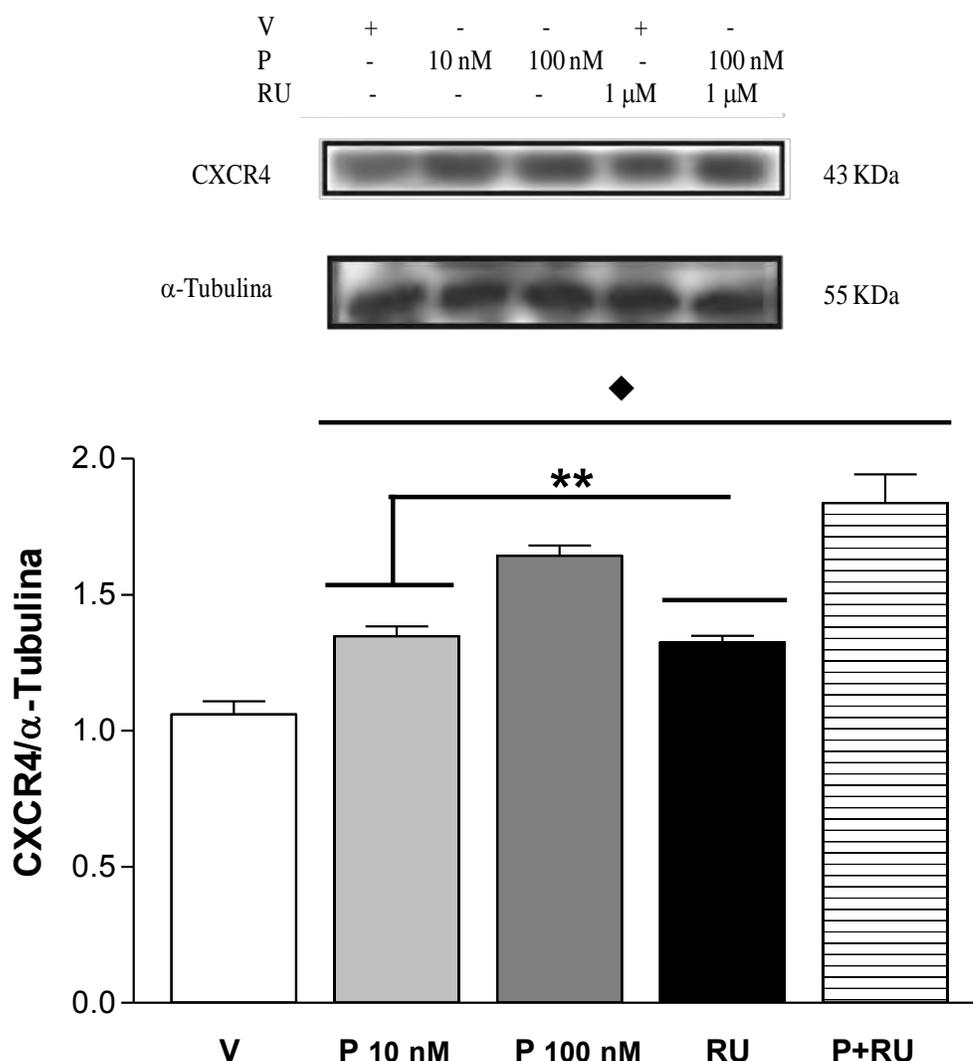


Figura 17. Regulación de CXCR4 en PBMCs de pacientes infectadas con VIH. Las células fueron tratadas con V, P (10 y 100 nM), RU486 (1 μ M) y el tratamiento conjunto de P (100 nM) y RU486 (1 μ M). Las proteínas fueron detectadas por Western Blot como se mencionó anteriormente. V, P10, P100 n=8; RU486, P+RU486 n=4. $\blacklozenge p < 0.05$ vs V; $**p < 0.05$ vs P 100nM y P + RU486.

Por otro lado el RU486 ocasionó un incremento en el contenido de CXCR4 en PBMCs tanto de donadoras seronegativas como en pacientes infectadas con VIH (1.24 \pm 0.04 y 1.32 \pm 0.02, respectivamente) respecto al vehículo. Por ultimo el RU486 (1 μ M) no revirtió el efecto de P, obteniendo resultados similares al tratamiento con P 100 nM, lo que indica que RU486 no tuvo algún efecto antagonico sobre la acción de P.

10. Discusión.

En el presente estudio se determinó el papel de la P sobre la regulación del contenido de CCR5 y CXCR4 en PBMCs de pacientes VIH positivas por la técnica de Western Blot. Los resultados obtenidos muestran que tanto CCR5 como CXCR4 son regulados por P en PBMCs de pacientes VIH positivas al igual que en PBMCs de donadoras sanas.

Como se ha descrito anteriormente, las hormonas sexuales tienen un papel importante en la regulación de la expresión y modulación de vías de señalización intracelulares al igual que en la regulación de células del sistema inmune (Edwards, 2005, Cu-Uvin et al., 2000). Recientemente se ha demostrado que la replicación de VIH es regulada en PBMCs por estradiol y P en concentraciones similares a las encontradas en el ciclo menstrual. PBMCs tratadas con estradiol (1 nM) por 48 h e infectadas posteriormente con VIH *in vitro*, incrementaron los niveles de replicación del virus en un 30%. Por otro lado el tratamiento de PBMCs con P (100 nM) e infectadas posteriormente con VIH *in vitro* redujo en un 20% la infección de estas células por el virus (Asin et al., 2008).

De acuerdo a lo reportado por Vassiliadou y cols. la P reguló de manera negativa el contenido de CCR5 en PBMCs tanto en mujeres infectadas con VIH como en donadoras sanas. El efecto se observó desde la concentración de 10 nM de P y el efecto fue mayor a la concentración de 100 nM de la hormona. Cabe mencionar que la disminución en la expresión de CCR5 por P se observó de manera más evidente en mujeres infectadas con VIH (41.7%) en comparación con mujeres seronegativas (28.4%).

El tratamiento con el antagonista de la P, RU486 no mostró ningún efecto en la expresión de CXCR4. El tratamiento con RU486 (1 μ M) no revirtió el efecto de la P (100 nM) sobre la regulación de CCR5, por lo que se puede sugerir que la P no

actúa en PBMCs para modular la expresión de los correceptores al VIH por medio del RP.

Por otro lado y en contraste a lo reportado por Vassiliadou y col. para CXCR4 *in vitro*, la P reguló positivamente el contenido de CXCR4 en PBMCs de donadoras seronegativas. El efecto positivo sobre el correceptor también se observó en PBMCs de mujeres infectadas con VIH. Este efecto ocurrió con ambas dosis de P (10 nM y 100 nM). Cabe mencionar que las concentraciones utilizadas en el trabajo de Vassiliadou y col. (1 y 10 μ M) fueron mayores a las utilizadas en este trabajo (10 y 100 nM). Por otra parte existen reportes que demuestran que la P tienen un efecto positivo sobre la expresión de CXCR4 durante la fase proliferativa en células epiteliales de útero de mujeres sanas, comparado con la fase secretora del ciclo menstrual (Yeaman et al., 2003). Estos resultados sugieren que los efectos de la P sobre el contenido de CXCR4 dependen de su concentración.

De forma interesante el tratamiento con RU486 incrementó el contenido de CXCR4 en PBMCs, tanto en mujeres VIH positivas como en donadoras seronegativas. Además RU486 (1 μ M) no antagonizó el efecto de la P. RU486 tiene afinidad con receptores a glucocorticoides, pudiendo actuar como antagonista o agonista parcial, dependiendo del contexto celular. Se ha reportado que los glucocorticoides tienen un efecto regulador sobre la expresión de CXCR4, incrementando su contenido en diferentes células tales como eosinófilos y linfocitos T CD4⁺.

La regulación que tiene la P sobre la expresión de los correceptores al VIH, pudiera estar relacionada con vías que tienen en común con CCR5 y CXCR4, como son; la activación de MAPK (vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos) y la activación de factores de transcripción como NF- κ B (Ling et al., 1999). Se ha reportado que en líneas celulares derivadas de cáncer de mama y de próstata, NF- κ B incrementa el contenido de CXCR4 y que la inhibición de este

factor de transcripción reduce el contenido de este correceptor (Helbig et al., 2003; Kukreja et al., 2005). Por otra parte se ha encontrado que la activación de MAPK tiene un papel importante en la regulación del incremento de la expresión de CCR5 y CXCR4 en varios tipos de células, como las derivadas de linfoma humano (Kim et al., 2006; Lei et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente datos epidemiológicos sugieren la existencia de diferencias en el desarrollo de la infección por VIH de acuerdo al género. Se ha observado que en etapas tempranas de la infección, cuando el virus utiliza principalmente el correceptor CCR5, las mujeres muestran un mejor pronóstico en comparación con los hombres, sin embargo, esta relación se invierte en etapas tardías, cuando el VIH utiliza principalmente el correceptor CXCR4. Esta diferencia pudiera deberse al efecto que presenta la P sobre la expresión de los correceptores CCR5 y CXCR4, la cual puede participar en la regulación de la infección por VIH y la razón por la cual la carga viral y la cuenta de linfocitos T CD4⁺ varían de acuerdo al género.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual la P regula la expresión de CCR5 y CXCR4 en PBMCs por lo que se requieren más estudios para poder elucidar dicho mecanismo.

11. Conclusiones.

- La P regula el contenido de CCR5 y CXCR4 en PBMCs de pacientes VIH positivas y de donadoras seronegativas.
- El efecto de la P sobre la regulación del contenido de CCR5 y CXCR4 es independiente del RP.

12. Referencias.

- <http://www.censida.salud.gob.mx>
- Alcamí J. 2004. Avances en la inmunopatología de la infección por VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22 (8): 486-496.
- Asin SN, Heimberg AM, Eszterhas SK, Rollenhagen C, Howell AL. 2008. Estradiol and progesterone regulate HIV type 1 replication in peripheral blood cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 24(5): 701-716.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: role in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 657:700.
- Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1925-1930.
- Bour S, Strebel K. 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect.* 5: 1029-1039.
- Calarota S A. 1999. Modulation of HIV Immune Responses in Natural Infection and after Genetic Immunization, MTC, Karolinska Institute, Sweden.
- 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, 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, 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.
- Camacho-Arroyo I. 2003. Progesterone receptor isoforms and progesterone actions in tha brain. In Gayathri A (ed) *Recent Research Developments in Life Sciences. Research Signpost. Kerala.* pp.221-242.
- 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.
 - Costin JM. 2007. Cytopathic Mechanism of HIV-1. *Viol J*. 4: 100.
 - 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*. 8:857-63.
 - 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.
 - Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, Peiper SC. 1999. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J Virol*. 73(4): 2752-2761.
 - Fauci AS. 2003. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med*. 9(7): 839-843.
 - Frankel AD, Young JAT. 1998. HIV-1. Fifteen proteins and a RNA. *Annu Rev Biochem*. 67: 1-25.
 - 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, Clarke C. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519.
 - 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.

- Helbig G, Christopherson II K, Nakshatri PB, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer H, Nakshatri H. 2003. NK-kB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 28(13): 21631-21638
- 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.
- 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.
- Kim H, Park H, Sul K, Chung H, Chung J. 2006. Induction of RANTES and CCR5 through NF-kB activation via MAPK pathway in aged rat gingival tissues. *Biotechnol Lett.* 28:17-23.
- 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.
- Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC. 2005. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by Stromal derived factor 1 α (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway dependen NF- κ B activation. *Cancer Res* 65(21): 9891-9898.
- Lazarini F, Casanova P, Tham TN, Clercq E, Arenzana-Seisdedos F, Belaux F, Dubois-Dalcq M. 2000. Differential signalling of the chemokine receptor CXCR4 by stromal cell-derived factor 1 and the HIV glycoprotein in rat neurons and astrocytes. *Eur J Neurosci.* 12: 117-125.

- Le Rouzic E, Benichou S. 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology*. 2: 11.
- Lei J, Wu C, Wang X, Wang H. 2005. P38 MAPK dependent and YY1 mediated chemokine receptors CCR5 and CXCR4 up regulation in U937 cell line infected by *Mycobacterium tuberculosis* or *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 329: 610-615.
- 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.
- Levy JA. 1993. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Infection. *Microbiol Rev*. 57 (1): 183-289.
- Ling K, Wang P, Zhao J, Wu Y, Cheng Z, Wu G, Hu W, Ma L, Pei G. 1999. Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: Functional five-transmembrane domain chemokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 7922-7927.
- 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.
- Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu Y, Cleeg J. 1997. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet*. 16: 100-103.
- 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.
- Oppermann M. 2004. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cel Signal*. 16: 1201-1210.
- Paranjape R. 2005. Inmunopathogenesis 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, Garcia 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-Applanat M, David-Ferreira J F. 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res.* 223: 1511-1519.
- Petersen DC, Glashoff RH, Shrestha S, Bergeron J, Laten A, Gold B, van Rensburg EJ, Dean M, Hayes VM. 2005. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 40(5): 521-526.
- Premack BA, Schall TJ. 1996. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat. Med.* 2(11): 1174-1178.
- 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.
- Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol.* 34: 233-244.
- Simon V, Ho DD, Karom QA. 2006. HIV/AIDS: epidemiology, pathogenesis, prevention an treatment. *Lancet.* 368: 589-504.
- Stevenson M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* 9(7): 853-860.
- Sudharshan S, Biswas J. 2008. Introduction and immunopathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *Indian J Ophthalmol.* 56: 357-362.
- Suresh P, Wanchu A. 2006. Chemokines and chemokine receptors in HIB infection: role in pathogenesis and therapeutics. *J Postgrad Med.* 52(3):210- 217.
- 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.

- 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 correlatos 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zwain I H, Yen S S. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*. 140: 3843-3852.

13. Anexos

a) TBS.

| | |
|-----------|--------|
| Tris-Base | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| *pH 7.5 | |

b) Solución de corrida.

| | |
|-----------|--------|
| Tris-Base | 25 mM |
| NaCl | 192 mM |
| SDS | 10% |

c) Solución de transferencia.

| | |
|-----------|-------|
| Tria-Base | 48 mM |
| Glicina | 39 mM |
| SDS | 0.37% |
| Metanol | 20% |

d) Solución de bloqueo.

| | |
|--------------------------|----|
| Leche desremada en polvo | 3% |
| Albúmina | 1% |
| *Preparar en TBS pH 7.5 | |

e) Buffer de lisis.

| | |
|------------|------------|
| DTT | 1 mM |
| Tris-HC | 10 mM |
| Glicerol | 30% |
| EDTA | 1 mM |
| Tritón | 1% |
| Leupeptina | 4 µg/mL |
| Aprotinina | 22.5 µg/mL |
| PMSF | 1 mM |
| Azida | 15 mM |

f) Buffer de carga.

| | |
|--------------------|-------|
| Tris-Base | 50 mM |
| SDS | 2% |
| B-Mercaptoetanol | 5% |
| Azul de Bromofenol | 0.1% |
| Glicerol | 10% |

g) Anticuerpos utilizados

Anticuerpo monoclonal anti CCR5 (IgG-HRP CKR5, Santa-Cruz sc-17833)

Anticuerpo monoclonal anti CXCR4 (IgG-HRP CD184, Chemicon AB-1847)

Anticuerpo anti-conejo (IgG-HRP, Santa-Cruz sc-2749)

Anticuerpo anti-cabra (IgG-HRP, Santa-Cruz sc-2033)