

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CCR5, APOLIPOPROTEÍNA E  
Y RANTES EN UN GRUPO DE MUJERES CON  
ACTIVIDAD SEXUAL REMUNERADA

Por

M. en C. EDA GUADALUPE RAMIREZ VALLES

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Junio, 2009

PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CCR5, APOLIPOPROTEÍNA E  
Y RANTES EN UN GRUPO DE MUJERES CON  
ACTIVIDAD SEXUAL REMUNERADA

Aprobación de la Tesis:

---

DRA. ANA MARIA RIVAS ESTILLA  
Director de Tesis

---

DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ  
Co-Director

---

DR. COSME ALVARADO ESQUIVEL  
Co-Director

---

DR. RICARDO M. CERDA FLORES

---

DRA. LIDIA GPE. RIVERA MORALES

---

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## AGRADECIMIENTOS

A la *DRA. ANA MARÍA RIVAS ESTILLA*, ... No hay palabras que expresen mi profundo agradecimiento por ... *Su amistad, sus enseñanzas, el respaldo incondicional, la oportunidad de equivocarme, su dedicación, su confianza, su paciencia* ... Y muchas cosas más que me permitieron alcanzar una de las metas importantes en mi vida profesional y crecer como persona. Con especial cariño y admiración... *Gracias*.

Al *DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ*, por el apoyo que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.

Al *DR. COSME ALVARADO ESQUIVEL*, por su confianza y su apoyo para realizar el presente trabajo.

Al *DR. RICARDO CERDA FLORES*, por su paciencia, su asesoría, su apoyo incondicional y las críticas constructivas en el aspecto estadístico del presente trabajo.

A la *DRA. LIDIA GPE. RIVERA MORALES* por su invaluable ayuda.

A la *DRA. ROCIO ORTIZ* por sus enseñanzas y su confianza en mi desempeño.

A *CLAUDIA, CESAR, CAROLINA, CLARITA y JUANY* por su ayuda incondicional en el desarrollo de este estudio, así como su confianza y apoyo durante los períodos críticos que se presentaron al realizar esta Tesis. Gracias, muchas gracias por todo.

A *MARCO, FÁTIMA, CHUY Y DULCE*, por su tiempo, esfuerzo y dedicación en el desarrollo de este trabajo, su aportación es invaluable.

Al *Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP)* por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Doctorado.

A la *Universidad Juárez del Estado de Durango* por el apoyo y facilidades para el cumplimiento de una etapa más en mi formación académica.

Al *Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado* y al *Sindicato Nacional de Trabajadores del ISSSTE Sección XV*, quienes en forma conjunta me brindaron también apoyo y facilidades para lograr una formación académica y profesional más completa.

Gracias *M.C. Martha Elia Muñoz Martínez, M.C. Ma. Del Socorro Vázquez Mendieta* y *M.C. Roberto Moreno Sarmiento*, por todas las facilidades y el apoyo que me brindaron durante la realización de mis estudios de posgrado.

Gracias *Dr. Francisco Javier Cardoso Nevárez* y *T.L. Alma Lidia Peinado Cabrera* por su lucha en la defensa de los derechos y prestaciones de los trabajadores, sin ello, no hubiese podido lograr esta meta profesional.

Gracias *Hilda, Silvia, Teresa* y *Mónica*, por su apoyo incondicional. Nunca terminaré de agradecerles queridas Tías y prima.

Gracias *Aida*.

## DEDICATORIA

*Con amor*

*A Dios*

*A mis sobrinos Ernesto, Jorgito y Felipe*

*A mis hermanos Sandra, Jorge y Jessica*

*Pero en especial a mis Padres*

*José Luis y Guadalupe*

# INDICE GENERAL

Contenido	Pág.
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Marcadores Moleculares	6
2.1.1 RANTES	6
2.1.2 Correceptor CCR5	8
2.1.3 Apolipoproteína E	11
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Área Física	17
5.2 Sujetos Incluidos en el Estudio	17
5.2.1 Grupo problema	17
5.2.2 Grupo control	18
5.3 Número de Pacientes, Base de Datos y Confidencialidad	18
5.4 Material Biológico	19
5.5 Reactivos	19
5.6 Equipo	21
5.7 Programas de Análisis Computacional	21
5.8 Métodos	
5.8.1 Datos Demográficos e Historia Clínica	22
5.8.2 Estudios Serológicos y Moleculares	22
5.8.2.1 Estudios Serológicos	23
5.8.2.2 Estudios Moleculares	
5.8.2.2.1 Análisis Cualitativo del VHC	24
• Extracción de ARN viral	24

	• Reacción de Retrotranscripción Asociada a Reacción en Cadena de la Polimerasa	25
5.8.2.2.2	Análisis de Polimorfismos de los Genes que Codifican para RANTES, el Correceptor CCR5 y la Apolipoproteína E	29
	• Extracción de ADN genómico por la técnica de TSNT	30
	• Reacción en Cadena de la Polimerasa	31
	• Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción	34
5.8.3	Análisis Estadístico	36
6.	RESULTADOS	37
6.1	Sujetos Incluidos en el Estudio	37
6.2	Características Demográficas de los Sujetos Incluidos en el Estudio	38
6.3	Factores de Riesgo	39
6.4	Prevalencia de Infección por VIH-1	42
6.5	Prevalencia de Infección por VHC	43
6.6	Polimorfismos de los Genes que Codifican para Rantes, el Correceptor CCR5 y la Apolipoproteína E	46
6.6.1	Polimorfismos del Gen que Codifica para RANTES	46
6.6.1.1	Frecuencia de SNPs de RANTES en los subgrupos de estudio	46
6.6.1.2	Asociación de alelos, genotipos y haplotipos de RANTES -28G/C In 1.1T/C 3'222T/C con la susceptibilidad a la infección por VIH-1	49
6.6.1.3	Asociación de alelos, genotipos y haplotipos de RANTES -28G/C In 1.1T/C 3'222T/C con la susceptibilidad a la infección por VHC	54
6.6.2	Polimorfismos del Gen que Codifica para el Correceptor CCR5	55
6.6.2.1	Frecuencia del polimorfismo $\Delta 32$ del gen que codifica para CCR5	55

6.6.2.2	Asociación de alelos y genotipos del polimorfismo $\Delta 32$ del gen que codifica para CCR5 con la susceptibilidad a la infección por VIH-1	57
6.6.2.3	Asociación de alelos y genotipos del polimorfismo $\Delta 32$ del gen que codifica para CCR5 con la susceptibilidad a la infección por VHC	58
6.6.3	Polimorfismos del Gen que Codifica para la Apolipoproteína E	59
6.6.3.1	Frecuencia de los polimorfismos del gen que codifica para la Apolipoproteína E	59
6.6.3.2	Asociación de alelos y genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E con la infección por VIH-1	61
6.6.3.3	Asociación de alelos y genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E con la infección por VHC	62
6.7	Patrón de Expresión de RANTES y <i>Apo E</i>	63
6.7.1	Patrón de expresión de RANTES	63
6.7.2	Patrón de expresión de <i>Apo E</i>	66
7.	DISCUSIÓN	69
8.	CONCLUSIONES	81
9.	BIBLIOGRAFÍA	85



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Pág.</b>
<b>Tabla I</b>	INFORMACIÓN GENERAL DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS EN LA PRIMERA AMPLIFICACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DEL VHC	27
<b>Tabla II</b>	INFORMACIÓN GENERAL DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS EN LA SEGUNDA AMPLIFICACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DEL VHC	29
<b>Tabla III</b>	CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS OLIGONUCLÉOTIDOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN QUE CODIFICA PARA CCR5, DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA APOLIPOPROTEINA E Y DEL GEN QUE CODIFICA PARA RANTES	32
<b>Tabla IV</b>	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN ESPERADOS DE LA DIGESTIÓN, CON LA ENZIMA <i>Hha I</i> , DEL PRODUCTO DE LA AMPLIFICACION DEL GEN <i>Apo E</i>	35
<b>Tabla V</b>	CONDICIONES DE LAS REACCIONES DE DIGESTIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS SNPs RANTES -28, In 1.1 Y 3'222	36
<b>Tabla VI</b>	NÚMERO DE MUJERES QUE INTEGRARON CADA GRUPO DE ESTUDIO, EDAD, Y RANGO DE EDAD RESPECTIVO	37
<b>Tabla VII</b>	PRINCIPALES CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS DE LOS SUBGRUPOS DE ESTUDIO	39
<b>Tabla VIII</b>	PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y POR VHC, ENCONTRADOS EN LOS SUBGRUPOS DE ESTUDIO	40
<b>Tabla IX</b>	ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL MÁS FRECUENTES EN LOS SUBGRUPOS DE ESTUDIO	41 42

<b>Tabla X</b>	PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIH-1 Y POR VHC EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO	
<b>Tabla XI</b>	FACTORES DE RIESGO PRESENTES EN LAS MUJERES QUE PARTICIPARON EN EL ESTUDIO Y A QUIENES SE LES DETECTO INFECCIÓN POR VHC	45
<b>Tabla XII</b>	OR ESTIMADO PARA LOS FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA ADQUISICIÓN DE INFECCIÓN POR VHC EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	46
<b>Tabla XIII</b>	DISTRIBUCIÓN DE ALELOS Y GENOTIPOS DE RANTES -28G/C, IN1.1T/C Y 3'222T/C EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS ANALIZADAS	48
<b>Tabla XIV</b>	DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS DE RANTES -28G/C, IN1.1T/C Y 3'222T/C Y EL ODDS RATIO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS ANALIZADAS	50
<b>Tabla XV</b>	DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE RANTES -28, IN1.1 Y 3'222 Y EL ODDS RATIO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS ANALIZADAS	52
<b>Tabla XVI</b>	VALORES DE ODDS RATIO OBTENIDOS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE RANTES -28, IN1.1 Y 3'222 CON A LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS ANALIZADAS	53
<b>Tabla XVII</b>	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE RANTES -28, IN1.1 Y 3'222 Y ODDS RATIO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VHC, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS	55
<b>Tabla XVIII</b>	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE CCR5 Y EL OR ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VIH-1 EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS Y SEXOSERVIDORAS Y MUJERES DEL NORESTE DE MÉXICO	58
	VALORES DE ODDS RATIO OBTENIDOS DE LA	58

<b>Tabla XIX</b>	ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE CCR5 +/Δ32 CON LA INFECCIÓN POR VIH-1 EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS Y SEXOSERVIDORAS	
<b>Tabla XX</b>	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE CCR5 Y EL RESPECTIVO OR ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VHC EN MUJERES ESTUDIADAS	59
<b>Tabla XXI</b>	FRECUENCIA DE GENOTIPOS Y ALELOS DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA APOLIPOPROTEÍNA E ENCONTRADA EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.	60
<b>Tabla XXII</b>	ODDS RATIO OBTENIDOS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL GEN QUE CODIFICA PARA APO E CON LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS Y SEXOSERVIDORAS	61
<b>Tabla XXIII</b>	ODDS RATIO OBTENIDOS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL GEN QUE CODIFICA PARA APO E CON LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS Y SEXOSERVIDORAS	62
<b>Tabla XXIV</b>	PRINCIPALES PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE RANTES EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS	63
<b>Tabla XXV</b>	RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RANTES, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS	64
<b>Tabla XXVI</b>	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE LOS HAPLOTIPOS MÁS FRECUENTES DE RANTES -28 / IN1.1 / 3'222 ENCONTRADOS EN MUJERES ESTUDIADAS	65
<b>Tabla XXVII</b>	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE LOS HAPLOTIPOS MÁS FRECUENTES DE RANTES -28 / IN1.1 / 3'222 ENCONTRADOS EN UN GRUPO DE MUJERES VIH-1 POS	65
<b>Tabla XXVIII</b>	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE RANTES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE INFECCIÓN POR VHC, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS	66
		67

**Tabla XXIX** PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE APO E EN LOS SUBGRUPOS DE MUJERES DEL NORESTE DE MÉXICO QUE CONFORMARON LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. SE DESCRIBE DICHA EXPRESIÓN EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE INFECCIÓN POR VHC

**Tabla XXX** PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE LOS GENOTIPOS DE APO E ENCONTRADOS EN UN GRUPO DE MUJERES VIH-1 POS

68

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b>	ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE VHC. EN EL ÁREA DE LA 1ª PCR SE APRECIAN LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE 223 pb. EN EL ÁREA DE LA 2ª RCP, SE OBSERVAN SEGMENTOS DE 193 pb.	28
<b>Figura 2.</b>	FRECUENCIA DE LOS GENOTIPOS DE CCR5 EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS	56
<b>Figura 3.</b>	FRECUENCIAS ALÉLICAS DE CCR5 EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS	57

## ABREVIATURAS

$\mu$ l	Microlitros
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
cADN	Ácido Desoxirribonucleico complementario
dNTPs	Desoxirribonucleósidos Trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracético
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril Sulfato de Sodio
SNPs	Polimorfismo de un solo nucleotido
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TDNT	Solución de lisis tritón-SDS
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia adquirida tipo 1
WB	Western blot

## RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo Leon  
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular  
Facultad de Medicina, UANL.

**Presenta: MC. Eda Guadalupe Ramirez Valles.**

#### **PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CCR5, APOLIPOPROTEÍNA E Y RANTES EN UN GRUPO DE MUJERES CON ACTIVIDAD SEXUAL REMUNERADA**

Aunque la infección con el VIH afecta significativamente al sistema inmune, se ha observado que hay individuos que no se infectan a pesar de una exposición reiterada a este virus, lo que supone una protección natural; por otra parte, también existe una gran variación en la evolución de la infección por VIH entre los individuos, así como en la mortalidad, lo que sugiere que, además de los factores inherentes al agente infeccioso, existen factores genéticos del hospedero que pueden llegar a condicionar la infección por el VIH. Entre los genes que se han asociado a la infección por VIH-1 se encuentra el que codifica para la quimiocina RANTES, el que codifica para CCR5, y el que codifica para la APO E. **Objetivo General:** Determinar la frecuencia genotípica de CCR5, Apolipoproteína E y RANTES y su patrón de expresión en un grupo de mujeres con actividad sexual remunerada. **Objetivos específicos:** 1) Determinar la prevalencia de VIH-1 en un grupo de sexoservidoras. 2) Evaluar si existe asociación entre los polimorfismos de los genes que codifican para CCR5, APO E y RANTES y la infección por VIH-1. 3) Determinar el patrón de expresión de Apo E y RANTES en el grupo de sexoservidoras y compararlo con el de personas sin actividad sexual remunerada VIH-1 negativas, y 4) Correlacionar la frecuencia genotípica y la expresión génica con la presencia de infección por VIH-1 en un grupo de personas expuestas al virus y con un grupo control de bajo riesgo de infección. **MÉTODOS:** Se buscó la presencia de anticuerpos contra VIH-1 en diferentes grupos de mujeres que aceptaron participar en el estudio: sexoservidoras (n=168), drogadictas (n=153), mujeres sanas (n=168) y mujeres VIH-1 positivo (n=168). Adicionalmente, para comparar la influencia de estos marcadores genéticos y de expresión en otra entidad infecciosa también se investigó si las pacientes estudiadas de cada grupo estaban infectadas con el VHC. Para ello se realizó la búsqueda de anticuerpos anti-VHC y el genoma del VHC (RNA-VHC), mediante RT-PCR. A cada una de las mujeres incluidas en los diferentes grupos de estudio se les extrajo DNA genómico para amplificar e identificar los polimorfismos de los genes que codifican para CCR5, para APO E y para RANTES mediante PCR y se detectaron mediante gel de agarosa al 2 %. Para el análisis de los genes *Apo E* y RANTES, se realizó digestión enzimática, con *Hha* (*Apo E*), y en el caso de RANTES con *Mbo* II para RANTES In 1.1, con *Mnl* I para RANTES -28 y con *Hph* I para RANTES 3'222. FALTA PONER COMO SE MIDIO LA EXPRESION DE RANTES Y APO E. **RESULTADOS:** La edad promedio en sexoservidoras fue de 31 años, en drogadictas de 27.3 años, en mujeres VIH-1 POS de 35 años y en mujeres sanas de 30 años. En las pacientes VIH-1 POS la coinfección con VHC fue de 5.9%. En sexoservidoras y en drogadictas la prevalencia de infección por VIH-1 fue de 0.6%. Con respecto a la prevalencia de infección por VHC en sexoservidoras fue de 1.2% y en drogadictas de 5.7%. %. Los factores de riesgo presentes en las mujeres VHC POS, fueron el uso de drogas inyectables, la promiscuidad sexual, la bisexualidad y las ETS. En nuestra población de estudio, no se encontró una asociación del alelo In1.1C con un efecto protector a la infección por VIH-1 descrito para población hispana. Se encontró al alelo RANTES 3'222T asociado con la resistencia a la infección por VIH-1, y el alelo RANTES -28G no presentó asociación con esta infección. Los niveles más altos de expresión de RANTES se encontraron en mujeres sanas, seguidas por las de sexoservidoras. La expresión de RANTES disminuye en presencia de infección por el VIH-1. Solo se encontró a la mutación  $\Delta$  32 de CCR5 asociada a la resistencia a la infección por VIH-1 en drogadictas. No se encontró asociación entre esta mutación y la infección por VHC. El alelo E4 prevaleció en las mujeres VIH-1 POS y el E3 mujeres sanas. Se asoció al alelo E4 con la susceptibilidad a la infección por VIH-1, y a E3 con un efecto protector. E4/E4 presentó una expresión mayor que E3/E3, y este superior a E2/E2. **CONCLUSIONES:** La prevalencia de infección por VHC en sexoservidoras, fue de 1.2%, de 5.7% en drogadictas y de 5.9% en las pacientes VIH-1 POS. La prevalencia de infección por VIH-1 tanto en las mujeres drogadictas como en sexoservidoras fue de 0.6%. El alelo RANTES 3'222T se encontró asociado a la resistencia a la infección por VIH-1. Se asoció a los haplotipos GTT y GTC de RANTES -28/In1.1/3'222 con la susceptibilidad a la infección por VIH-1. La expresión de los haplotipos de RANTES disminuye en presencia de infección por el VIH-1. En mujeres mexicanas del Noreste de México, no se pudo establecer la asociación del alelo In1.1C con un efecto protector a la infección por VIH-1. Los genotipos RANTES -28C/C y -28 G/C se asociaron con un efecto protector contra VHC. El alelo E4 se asoció con la susceptibilidad a la infección por VIH-1. El alelo E4 fue el de mayor expresión. En la baja prevalencia de infección por VIH-1 en las sexoservidoras y drogadictas, influyeron el alelo E3 de *Apo E* y su expresión, el alelo RANTES 3'222T y los niveles de expresión de RANTES. La mutación  $\Delta$ 32 en el gen que codifica para CCR5, solo se encontró asociada con la resistencia a la infección por VIH-1 en drogadictas.

**Dra. ANA MARIA RIVAS ESTILLA**

Director de Tesis

## **CAPITULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

La prevalencia mundial de la infección por VIH se ha mantenido casi en el mismo nivel, aunque el número de personas que viven con este virus está aumentando, debido a los periodos más prolongados de supervivencia y al equilibrio dado entre las nuevas infecciones y el número de defunciones por año. [1]

México es un país con epidemia de SIDA concentrada, donde los grupos de mayor riesgo son los formados por hombres que tienen sexo con hombres, usuarios de drogas inyectables y profesionales del sexo. [2]

Aunque esta epidemia aparentemente permanece estable, es importante considerar los elementos que permitan combatirla y prevenirla. En este sentido, uno de los factores que dificultan el combatirla es que el virus ataca infectando directamente a los linfocitos T, macrófagos y células dendríticas, que son las células esenciales para defender al organismo contra las infecciones. [3, 4] Cuando estas células se activan para generar una respuesta inmunitaria específica, el virus se replica en plenitud, por lo que, la respuesta inmune celular específica, tanto contra el VIH como contra otros antígenos, activa simultáneamente las células diana y la replicación del virus, exponiendo a las células del sistema inmune a que sean infectadas y conduciéndolas a su destrucción, así como, en el caso de la estirpe



monocito/macrófago, a disminuir su capacidad de presentación de antígenos solubles, afectar su secreción de citocinas y el control de la inducción de apoptosis o el procesamiento fagocítico de los cuerpos apoptóticos. [3-8]

Aunque la infección con el VIH afecta significativamente al sistema inmune, se ha observado que hay individuos que no se infectan a pesar de una exposición reiterada a este virus, lo que supone una evidente protección natural; por otra parte, también existe una gran variación en la evolución de la infección por VIH entre los individuos, así como en la mortalidad, lo que sugiere que, además de los factores inherentes al agente infeccioso, existen factores genéticos del hospedero que pueden llegar a condicionar la infección por el VIH.

Así entonces, existen por lo menos dos tipos de factores genéticos involucrados en el hospedero. Uno de ellos se asocia a los genes del sistema HLA, que regulan la respuesta inmune a la infección viral, [9] y el otro está relacionado con los genes que participan en la entrada del virus en las células.

La idea de desarrollar el presente trabajo surgió de observar, que en el Noreste de México, existen zonas donde la prevalencia de infección por VIH-1 es muy baja en mujeres con actividad sexual remunerada, así como en drogadictas, a pesar de la alta exposición al VIH-1, lo que sugiere la participación de mecanismos propios del hospedero que podrían estar participando como elementos que confieren una protección a esta infección viral, de ahí que el presente trabajo esté relacionado con tres genes: dos de

ellos pueden llegar a modificar la transmisión del virus y la progresión de la enfermedad, mientras que el tercero se ha asociado a la evasión de la respuesta inmune del hospedero.

Uno de los primeros genes mencionados es el que codifica para la quimiocina RANTES, la cual puede participar en la modulación de la replicación del VIH-1 y su entrada a la célula, [10] el segundo es el gen que codifica para el receptor de quimiocinas CCR5, el cual actúa como su co-receptor del VIH-1; [11-13] y el tercero es el gen que codifica para la Apolipoproteína E, la cual ha sido descrita como elemento con el que interactúan virus como el Herpes Simple y el VIH-1 para evadir la respuesta inmune. [14-18]

Los objetivos básicamente son determinar la frecuencia de los polimorfismos de los genes de interés y la expresión del gen que codifica para RANTES y el que codifica para APO E, en dos de los principales grupos que viven en riesgo de adquirir infección por VIH-1 y VHC, las sexoservidoras y las drogadictas, así como también en mujeres sanas y pacientes VIH-1 POSITIVO (POS), con el fin de evaluar si la expresión de estos genes es diferente en los grupos de riesgo, como se comporta esta expresión de acuerdo a los polimorfismos en los genes de interés, y si esta expresión, así como los polimorfismos, están asociados a una protección o resistencia a la infección por VIH-1 y por VHC, en la población del Noreste de México.

## **CAPITULO 2**

### **ANTECEDENTES**

Se estima que a finales de 2007 en todo el mundo vivían 33.2 millones de personas con VIH/SIDA. 2.5 millones se infectaron a lo largo de ese año, durante el cual fallecieron 2.1 millones de personas. [1, 19]

Entre 2001 y 2007, se produjeron aumentos similares en la cifra estimada total de nuevas infecciones en varones y mujeres, si bien la razón varón/mujer se mantuvo estable en todo el mundo, [1, 19] en los últimos años, de los nuevos infectados, cerca del 50% eran mujeres y la mayoría de las nuevas infecciones se detectaron en adultos jóvenes; aproximadamente, alrededor del 50% tenía entre 15 y 24 años de edad, y el 95% se produjo en países en desarrollo. [20]

En general, el número de infecciones nuevas cada año es estable, pero existen algunos grupos de personas que siempre están en riesgo, y la prevalencia de infección por VIH en algunos de ellos va en aumento; ejemplo de estos últimos son los hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (HSH) y los usuarios de drogas inyectables (UDI), grupos que tienen la proporción más grande de nuevas infecciones por el VIH y casos de SIDA cada año. [19] Otro grupo que vive en constante riesgo de adquirir infección por VIH-1, y que adquiere una gran importancia en los países con

epidemia de SIDA concentrada, como es el caso de nuestro país, es el de los profesionales del sexo y sus parejas sexuales. [19]

Estados Unidos es uno de los países que mejor seguimiento da a la pandemia de VIH/SIDA, y su análisis epidemiológico muestra que las mujeres constituyen más de una cuarta parte de infecciones nuevas del VIH/SIDA, [21] y además, que ha ido en aumento el número de mujeres con esta infección, pues mientras en 1992, las mujeres representaron el 13.8% de las personas que vivían con el SIDA, [22] para fines de 2004 el porcentaje había aumentado a 23%. [21] Otro aspecto que destaca de este análisis es que en las mujeres, la transmisión por contacto sexual representa un 78% de las infecciones, [21] y que en relación a las nuevas infecciones, el porcentaje de infecciones debidas al contacto heterosexual es del 45%. [23]

En México, para finales del 2007, la transmisión heterosexual de la infección por VIH-1 en mujeres representó el 98.4%, [24] mientras que la proporción de mujeres en relación al total de las personas con infección por VIH-1 fue del 29%. [2] Así mismo, es importante señalar que en nuestro país, en 1997, las mujeres representaban el 8.3% del total de las personas con infección por VIH-1, mientras que para el 2006, esta proporción se había incrementado hasta un 20%. [2] Otro dato importante es que se estima una prevalencia de infección por VIH-1 del 0.2 en mujeres jóvenes entre 15 y 24 años. [2]

Los datos anteriores muestran el aumento de la prevalencia de VIH-1 en la población más joven y en mujeres, en las cuales la infección se asocia a una transmisión heterosexual, lo cual orienta a la evaluación de marcadores

moleculares asociados a la susceptibilidad o resistencia a esta infección en mujeres, en el contexto de la transmisión heterosexual.

## **2.1 Marcadores Moleculares**

La resistencia y susceptibilidad a la infección por VIH-1, así como la severidad de la infección por este virus presenta variaciones muy amplias entre los individuos, debidas a factores propios del virus y a elementos inherentes al hospedero. [25-28] Como se mencionó previamente, entre los factores genéticos del hospedero vinculados a esta infección se encuentran algunos polimorfismos de la quimiocina RANTES, ligando natural del correceptor CCR5, que ha sido asociado a la modificación en la transmisión y progresión de la infección por el VIH-1; [29-31] polimorfismos del receptor de quimiocinas CCR5, el cual es considerado como factor indispensable para el anclaje e ingreso del virus en las células diana, pues actúa como su co-receptor; [11-13] y polimorfismos del gen que codifica para la Apolipoproteína E, la cual ha sido descrita en diversos estudios como elemento con el que interactúan virus como el Herpes Simple y el VIH-1 para evadir la respuesta inmune, facilitando aun más la re-infección. [14-18]

### **2.1.1 RANTES**

RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted o citosina secretada por linfocitos T normales y regulada por activación) es una quimiocina que pertenece a la familia de quimiocinas tipo b y es producida por diferentes tipos de células como linfocitos T CD4+ y T CD8+, macrófagos, células epiteliales, endoteliales y dendríticas. [32, 33]

RANTES presenta varios polimorfismos entre los que destacan el -403, el -28, el In 1.1 y el 3'222, los cuales influyen en el aumento o disminución de la expresión de RANTES y a su vez pueden afectar la evolución de la infección por VIH-1 a SIDA. [34] Dos estudios previos investigaron la influencia de RANTES -403, -28, In 1.1 y 3'222 y sus haplotipos en la infección por VIH-1 encontrando que el que incluía In 1.1 C se correlaciona con la aceleración a SIDA en afro-americanos y euro-americanos. [35] En la población hispana se ha reportado que el haplotipo ACT RANTES -403, In 1.1 y 3'222 tiene efecto protector a la infección por VIH-1, pero este efecto no aparece en afro-americanos u otros grupos de población con infección por VIH-1. [36] En un grupo de afro-americanos homocigotos para el haplotipo -403\*G, -28\*C, In 1.1\*T y 3'222\*T, se encontró que tenían una carga viral menor a la que presentaban los individuos con otros haplotipos. [37] En coinfecciones VIH/VHC, un estudio encontró que el haplotipo -403 A/A, -28 G/G e In 1.1 C/C se encontraba con mas frecuencia en individuos VIH monoinfectados que en individuos control. [38] Otro estudio mostró que el haplotipo -403 G/A, -28 C/G, In1.1 T/C se encontraba en individuos con mono infección por VIH-1 mientras que el haplotipo -403 G/G, -28 C/C, In1.1 T/T se encontró en individuos VIH/VHC. [39] Estas últimas investigaciones aun son controversiales, sin embargo, muestran a RANTES como un marcador genético para evaluar la susceptibilidad a la infección por VIH-1.

También se han reportado estudios donde se han detectado niveles altos de RANTES, MIP-1 $\alpha$  (Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$ ) y MIP-1 $\beta$  (Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\beta$ ) en personas expuestas no infectadas, por lo que se han asociado a una protección “natural” a la

infección por VIH-1. Otros estudios mostraron que el efecto antiviral de estas quimiocinas es a nivel de la entrada del virus y que la inhibición de la infección esta restringida sólo a las cepas M-trópicas. [40-42] Un estudio en Kenia, reporta una frecuencia de 34 % de infección por VIH-1 en sexoservidoras, y muestra que, en aquellas resistentes a la infección, en la mucosa genital, el recuento de células T CD4+ y los niveles de expresión de CCR5 y CXCR4 estaban incrementados, así como los niveles séricos de RANTES. [43] En México, se han reportado porcentajes de infección por VIH-1 en sexoservidoras que varían del 0.14% al 5% [44] en no usuarias de drogas, mientras que en las sexoservidoras que son UD se han reportado hasta un 12%, [45] sin embargo no hay reportes de los niveles de expresión de los correceptores del VIH-1, ni de las quimiocinas en esta población, que tiene un alto riesgo de adquirir infección por este virus. [46]

### **2.1.2 Correceptor CCR5**

El correceptor CCR5 para el VIH-1, es una proteína transmembranal que está asociada a la proteína G, para la transmisión indirecta de señales a la célula; como es también el receptor de quimiocinas, entre ellas RANTES, las señales que se generan al unirse a sus ligandos, están asociadas a la migración celular.

En 1996, se describió una deleción de 32 pb del gen del receptor CCR5 (CCR5 $\Delta$ 32), que genera una proteína más corta, debido a que la deleción provoca la aparición de un codón de terminación prematuro. [47-49] Esto da como resultado un receptor no funcional, que ya no se ancla en la membrana celular. [50]

Los individuos homocigotos CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 serían naturalmente resistentes a la infección por el VIH-1 ya que la ausencia del receptor en la superficie celular impide la entrada de cepas VIH-1 R5, que son consideradas las variantes con mayor poder de transmisión. [51-55] Esto fue corroborado por estudios *in vitro* que demostraron que los cultivos primarios de células mononucleares con genotipo CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 eran resistentes a la infección con VIH-1 R5, pero no con las variantes virales X4, confirmando la especificidad de esta delección inactivante en el correceptor para los virus R5. [27, 47, 49, 56]

En grupos de individuos no infectados con alta exposición al virus se encontró el genotipo CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32, y contrariamente, varios estudios epidemiológicos demostraron la ausencia del genotipo homocigoto CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 en individuos VIH-1 infectados, apoyando el papel protector ejercido por este genotipo. Sin embargo el reporte de casos de individuos con genotipo CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 que contrajeron la infección demostró que esta resistencia no es absoluta. Aunque existe la posibilidad de que estos individuos hayan adquirido una variante viral que no sea dependiente de CCR5. [57-60] Por lo tanto el genotipo homocigoto CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32, se ha asociado a resistencia a la infección por el VIH. [61]

En general se asume que el estado homocigoto para la delección disminuye la susceptibilidad a la infección, y el estado heterocigoto retarda significativamente el curso de la enfermedad. Tanto las mutaciones de la



secuencia codificadora, como de la promotora presentan su efecto alterando la cantidad de receptores CCR5, afectando la susceptibilidad de las células del hospedero a la infección por VIH y probablemente también a otros virus como el VHC. [62]

El estado heterocigoto de la delección se encuentra aproximadamente en un 20 % de la población caucásica sana, y el estado homocigoto en solo 1 % de los individuos. [63, 64] Una frecuencia alélica menor del 10 % se ha encontrado en africo-americanos y en grupos de hispanos que se han analizado. [65]

El alelo  $\Delta 32$  se presenta en población caucásica en donde la frecuencia varía entre un 8% y un 10%, [52, 63, 64] y en poblaciones asiáticas o africanas no se ha reportado. [63]

En América Latina existen pocos reportes de la frecuencia del alelo  $\Delta 32$ . En Venezuela se estudiaron 32 individuos en los cuales no se detectó este alelo, como tampoco en grupos amerindios. [52, 63] También existe un reporte que señala una frecuencia del alelo  $\Delta 32$  del 3.5% en individuos residentes de Medellín, Colombia. [66]

Estudios realizados en individuos sanos que han practicado sexo sin protección con personas infectadas con VIH, señalan que la frecuencia del genotipo  $\Delta 32/\Delta 32$  varía entre el 2.8% y el 3.6%, [58, 67] Aunque son contradictorios los resultados obtenidos en estudios que versan sobre el papel que juega el genotipo heterocigoto (CCR5 +/ $\Delta 32$ ), la mayoría de ellos coincide en que la presencia de un alelo mutado da un cierto grado de protección, que se expresa en un retraso en el desarrollo del SIDA. [51, 58]

### 1.1.1 Apolipoproteína E

Las apolipoproteínas son la parte proteica hidrosoluble de las lipoproteínas que estabilizan la estructura de la lipoproteína y permiten que el colesterol y los triglicéridos sean transportados en el torrente circulatorio.

La APO E es un polipéptido de 299 aminoácidos, encontrándose en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y como una subfracción de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) llamada HDL1. Su concentración plasmática en sujetos normales es de 0.03 - 0.07 g/l. En humanos la Apo E se encuentra en tres isoformas reconocidas por análisis isoeléctrico, llamadas E2, E3 y E4. Las tres isoformas difieren una de otra por la sustitución de un simple aminoácido (arginina por cistina) en dos posiciones específicas de la secuencia de *Apo E*. [68] La presencia de tres isoformas, cada una de ellas codificadas por un simple alelo, generan seis diferentes fenotipos, tres homocigotos (E2/E2, E3/E3 y E4/E4), y tres heterocigotos (E2/E3, E2/E4 y E3/E4), distribuidos en forma variable en la población. El fenotipo E3/E3 es el más común (60% de la población) y el E2/E2 es el más raro. La APO E es reconocida por su receptor específico (presente en el hígado y responsable del catabolismo de los residuos de quilomicrones) y por el receptor LDL (que también une a APO B); la isoforma E2 no es reconocida por ningún tipo de receptor. [69]

Los polimorfismos de *Apo E* han sido fuertemente asociados con sus niveles de expresión; el alelo E2 se ha asociado a altas concentraciones de APO E y el E4 con bajas concentraciones. [70, 71]

Los polimorfismos han sido estudiados en relación a la enfermedad de Alzheimer, al metabolismo del colesterol y en enfermedades cardiovasculares, por lo que existen varios trabajos sobre las frecuencias de estos polimorfismos en diferentes poblaciones. Algunos de estos estudios muestran que en países del norte de Europa hay mayor frecuencia del alelo E4 (14% -19%) que en países del sur de Europa (7%-12%). En nigerianos y japoneses, hay una relativa baja frecuencia del alelo E2 (3% - 4%); en México-Americanos y en Indios Americanos se encontraron frecuencias del alelo E2 similares a las anteriores (2% - 4%). [70, 72-79]

Recientemente se ha asociado a la APO E con otro tipo de infecciones virales como la infección por VHC. Basados en la observación de que las partículas del VHC se asocian con beta-lipoproteínas en suero, Agnello y cols., reportaron que las partículas del VHC asociadas con LDLs eran capaces de ligarse a su receptor (r LDL) y así ingresar al hepatocito. [80, 81] Sin embargo, aún se desconoce la participación de este mecanismo en la internalización del virus en las células infectadas. Se ha postulado que polimorfismos de *Apo E* podrían influir en el establecimiento o la eliminación de la infección por el VHC. Wozniak y cols., reportaron que la presencia del alelo *Apo E-ε4* protege y disminuye el desarrollo de daño hepático severo en pacientes infectados con VHC. [82, 83]

Por otra parte, diversos estudios describen que el Virus herpes simple y el VIH-1 interactúan con APO E o sus componentes para evadir la respuesta inmune, facilitando aun más la re-infección. [15-17] En cambio, otros reportes muestran como en etapas tempranas, la APO E presenta actividad anti-infectiva contra el Hepres virus simple tipo 1 y 2, así como contra el VIH, dependiendo de su concentración y de la adopción de una estructura alfa helicoidal, al prevenir la formación de agregados virales y ejerciendo la actividad antiviral, que se ha asociado al fragmento N-terminal de la APO E. [14] Este efecto contra las infecciones se ha observado también contra bacterias como la *Pseudomonas aeruginosa* y el *Staphylococcus aureus*. [14]

Los mecanismos que se han propuesto para explicar la participación de APO E en infecciones virales son los siguientes: que puede influir en la reparación del tejido después de la infección; [17, 84] que modula la inflamación durante la infección; [85] que influye en el transporte de virus en la sangre [86] y que posee una actividad anti-infectiva. [14, 87]

En un estudio realizado en pacientes con infección por VIH-1 del Noreste de México, se encontró a los genotipos E2/E4 y E4/E4 de Apo E con una mayor susceptibilidad a la infección por este virus ( $p < 0.01$ ). [88]

Otros estudios también han asociado al alelo E4 con la infección por VIH-1, señalando que los alelos E2 y E4 aceleran la mortalidad por esta

infección, e incluso han asociado al alelo E4 con un aumento en el ingreso del virus a la célula. [89, 90]

En cambio, el alelo E3 ha sido relacionado con largos periodos de estabilidad en pacientes con infección por VIH-1, así como una lenta progresión de la infección, cursando con índices de CD4+ relativamente normales. [89]

Lo anterior sugiere que Apo E tiene un papel importante en la susceptibilidad a la infección por VIH-1, así como en la progresión de esta infección.

## **CAPITULO 3**

### **JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años, la prevalencia de infección por VIH-1 ha ido en aumento en mujeres, así como en la población de jóvenes entre 18 y 25 años. Sin embargo, los grupos de personas que viven con mayor riesgo siguen siendo los hombres que tienen sexo con hombres, las personas usuarias de drogas intravenosas y las personas que ofrecen actividad sexual remunerada.

En ese sentido, es que llama la atención que en el Noreste de México, existen zonas donde la prevalencia de infección por VIH-1 es muy baja en mujeres con actividad sexual remunerada, así como en drogadictas, a pesar de la alta exposición al VIH-1, lo que sugiere la participación de mecanismos propios del hospedero que podrían predisponer o condicionan el desarrollo de esta infección.

Estos antecedentes resaltan la importancia de elucidar los mecanismos moleculares de patogenicidad, relacionados con factores genéticos del hospedero, y que están involucrados en la resistencia/susceptibilidad a la infección por VIH-1 en grupos altamente expuestos como mujeres que ofrecen actividad sexual remunerada y en mujeres drogadictas, ya que estos grupos de riesgo, desde el punto de vista de salud pública, podrían ser los de mayor participación en la transmisión heterosexual del VIH-1.

## **CAPITULO 4**

### **OBJETIVO GENERAL**

***Determinar la frecuencia genotípica de CCR5, Apolipoproteina E y RANTES y su patrón de expresión en un grupo de mujeres con actividad sexual remunerada***

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la frecuencia de la infección por VIH-1 en un grupo de mujeres que ofrecen actividad sexual remunerada (ASR).
2. Evaluar si existe una asociación entre los polimorfismos de los genes que codifican para CCR5, Apo E y RANTES y la presencia de la infección por VIH-1.
3. Determinar el patrón de expresión de Apo E y RANTES en el grupo de personas con ASR y compararlo con el grupo de personas sin ASR VIH-1 negativas.
4. Correlacionar la frecuencia genotípica y la expresión génica con la presencia de infección por VIH-1 en un grupo de personas expuestas al virus y con un grupo control de bajo riesgo de infección.

## **CAPITULO 5**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Subdirección de Posgrado, del Hospital Universitario "Dr. José E. González" de la UANL, con clave S0008-2005-1, del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (CONACYT): "Evaluación del efecto antiviral de los antiinflamatorios no esteroides en pacientes con hepatitis C ", y se realizó en forma prospectiva, transversal, descriptiva y observacional de Septiembre de 2005 a Noviembre de 2008.

#### **5.1 Área Física**

El trabajo se realizó en el laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en el Servicio de Infectología del Hospital Universitario, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el laboratorio de Infectología de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.J.E.D.

#### **5.2 Sujetos Incluidos en el Estudio**

##### **5.2.1 Grupo problema:**

Se integró un grupo de Mujeres (n=168) que ofrecían actividad sexual remunerada, seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios:



**Inclusión:** género femenino, mayores de edad, que aceptaran participar en el estudio.

**Exclusión:** mujeres menores de edad, con alteración de la coagulación, que se negaran a participar en el estudio.

### **5.2.2 Grupos control**

Se conformaron los siguientes subgrupos control:

- a) Mujeres donadoras de sangre negativas para el VIH-1 y VHC (n=168).
- b) Mujeres VIH-1 positivo (POS) por anticuerpos y WB (n=168).
- c) Mujeres usuarias de drogas (n=153).

**Inclusión:** género femenino, mayores de edad, que aceptaran participar voluntariamente. En las mujeres donadoras de sangre, que fueran negativas para antecedentes o factores de riesgo para infección por VIH-1 y VHC. En el tercer grupo, el criterio fue que consumieran alguna droga.

**Exclusión:** mujeres menores de edad, que se negaran a participar.

### **5.3 Número de Pacientes, Base de Datos y Confidencialidad**

A partir de la información recabada de cada una de las pacientes se generó una base de datos que se utilizó para realizar estudios epidemiológicos y de asociación de las características clínicas y los hallazgos experimentales. La identificación de cada una de las pacientes fue a través de la asignación de una clave confidencial y se ha mantenido en el anonimato y la confidencialidad en todo momento. A los datos de nombres y

claves confidenciales solo tiene acceso el responsable del proyecto. El tamaño de la muestra por subgrupo se estimó con el paquete estadístico epi data, de conformidad a los siguientes parámetros: un intervalo de confianza del 95%, una precisión del 95%, y una prevalencia de factores de riesgo del 30%, empleando una corrección para población finita. El tamaño estimado de la muestra fue de 168 personas.

#### **5.4 Material Biológico**

A cada una de las personas incluidas en este estudio se les tomó una muestra de sangre periférica, obtenida por punción venosa en una única ocasión, empleando tubos vacutainer con EDTA, así como material desechable estéril. La cantidad de muestra que se obtuvo fue de 10 ml.

Inmediatamente después de tomada la muestra, ésta se colocó en hielo y fue transportada al Laboratorio de Infectología, en donde se centrifugó para separar el plasma y el paquete leucocitario.

Del plasma se hicieron diferentes alícuotas, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf, etiquetadas y conservadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A partir del paquete de leucocitos se extrajo el ADN, el cual fue conservado en tubos eppendorf a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , también debidamente etiquetados.

#### **5.5 Reactivos**

Para las reacciones de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se empleo la enzima *Taq*DNA plimerasa, el  $\text{MgCl}_2$  y buffer de PCR de Promega

Corporation (Madison, WI, EUA). Los dNTPs fueron adquiridos de GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA).

Las enzimas de restricción que se emplearon (*Hha I*, *Mbo II*, *Hph I* y *Mnl I*) para digerir los productos amplificados fueron adquiridas de New England Biolabs Inc (Beverly, MA, EUA).

Para las reacciones de Reacción de Retrotranscripción Asociada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) se utilizó la enzima SuperScript™ II ó bien MMLV, Random primers, Buffer First-Strand 5X, DTT y RNaseOUT inhibidor de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

Los geles fueron preparados con agarosa grado analítico adquirida de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

El ácido bórico, Trizma base, EDTA, SDS, NaCl, cloroformo y etanol, fueron de grado analítico y provenían de la casa comercial SIGMA CHEMICAL CO (St. Louis, MO, EUA).

El trizol y el marcador de pares de bases (pb) se adquirió de GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA).

Para la determinación de anticuerpos anti-VHC y anti-VIH-1 se utilizó estuches comerciales de Abbot de 3ª generación.

Para la cuantificación de RANTES se emplearon kits comerciales de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) de la compañía PEPROTECH, USA.

Para la cuantificación de APO E, se empleó: Mouse Monoclonal anti-Apo E (WUE-4) Species Summary-Hu (+) ELISA, Goat Polyclonal anti-APOE Species Summary Hi(+) MK(+), Rabbit Polyclonal anti-6-Histidine Species

Summary, Rabbit Polyclonal anti-SOD1 species Summary Hu(+) Application  
Summary, Apolipoprotein E 50 µg Biodesing y Zeocin Selection Reagent 1g  
de Invitrogen.

El material de plástico que se utilizó fue de la marca COSTAR.

## **5.6 Equipo**

Se utilizó una microcentrifuga eppendorf modelo 5415 C; balanza digital Sartorius modelo 1206 MP; balanza analítica OHAUS modelo APL1; incubadora SHEL-LAB y horno de microondas Goldstar. La cámara de electroforesis horizontal que se utilizó, incluyendo su fuente de poder, son de marca BIO-RAD Life Science Research Products. El termociclador que se utilizó era de la casa comercial Eppendorf. El lector de ELISA era de la marca Bio-Tek Instruments.

## **5.7 Programas de Análisis Computacional**

Se utilizó un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, modelo Gel Documentation\_System 1000, de BIO-RAD.

El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word XP y Microsoft® Power Point 2003 de Microsoft Corporation. Para el análisis estadístico se empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation), los programas SPSS, y Epi Data™.

Los programas utilizados por vía internet fueron: Entrez [National Center for Biotechnology Information (NCBI)], Centres for Disease Control (CDC). El

navegador de Internet que se uso fue Microsoft Explorer Versión 8.0 (Microsoft Corporation).

## 5.8 Métodos

### 5.8.1 Datos Demográficos e Historia Clínica

Los datos demográficos y la historia clínica fue captada por el Médico durante la consulta en el caso de las pacientes VIH-1 POS. Los datos de las sexoservidoras, drogadictas y donadoras de sangre fueron recabados durante una entrevista realizada por el investigador.

### 5.8.2 Estudios Serológicos y Moleculares

La muestra sanguínea tomada a cada una de las participantes se utilizó para:

- 1) **Estudios serológicos**: determinación de anticuerpos anti-VIH-1 y anti-VHC. Determinación la concentración serica de RANTES y APO E .
- 2) **Estudios moleculares**: Identificación de los polimorfismos del gen que codifica para la APO E, del que codifica para RANTES y del gen que codifica para CCR5 e identificación cualitativa del genoma del VHC.

Por ser metodologías desarrolladas dentro de protocolos de investigación previamente publicados han sido completamente validados de acuerdo a los métodos previamente reportados por otros grupos de investigación.

### **5.8.2.1 Estudios Serológicos**

La determinación de anticuerpos anti-VHC y anti-VIH-1 se llevó a cabo en un equipo AxSYM de Abbott utilizando los estuches comerciales de Abbott de 3ª generación y siguiendo los protocolos del proveedor.

Para la cuantificación de RANTES y APO E en plasma se emplearon placas con 96 pocillos y, en el caso de RANTES kits comercial de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), siguiendo las instrucciones del fabricante (ELISA Development Kit 900-K33, de PEPROTECH).

Para la cuantificación de APO E, se implementó una prueba de ELISA, en la cual se empleó un anticuerpo contra APO E en una concentración de 1 µg/ml para sensibilizar la placa, durante un tiempo de 14 horas a 4 °C. Posteriormente se bloqueó la placa empleando una solución de leche Svelty al 2% en PBS 1X, durante 1 hora a 37 °C. En cada ocasión se hizo 4 lavados de las placas con leche al 2% en PBS 1X.

Concluidos los cuatro lavados, se colocaron las muestras de suero o bien, la proteína recombinante APO E para realizar la curva de calibración, y se dejó incubando por una hora a 37 °C, para que se llevara a cabo la reacción antígeno-anticuerpo. Transcurrido este tiempo, se hicieron los 4 lavados correspondientes, solo que ahora se empleó para el lavado una solución de leche al 2% tritón 0.1% en PBS 1X, y se prosiguió a añadir el anticuerpo de detección, el cual se dejó reaccionando durante una hora a 37 °C, y luego de ser nuevamente lavadas las placas de reacción con esta última solución de lavado, se añadió el anticuerpo conjugado y se dejó reaccionando durante una hora a 37 °C, para luego lavar como corresponde,

con la solución de leche al 2% tritón 0.1% en PBS 1X, y finalmente se añadió el cromógeno y se realizaron las lecturas de absorbancia inmediatamente, y en intervalos de 10 minutos durante la siguiente media hora, con el fin de obtener las concentraciones de las muestras, mediante el uso de la curva de calibración correspondiente.

Las concentraciones de la proteína recombinante utilizadas en cada curva de calibración fueron: 2000, 1000, 500, 250 y 125  $\mu\text{g/ml}$ .

### **5.8.2.2 Estudios Moleculares**

**5.8.2.2.1 Análisis Cualitativo del VHC.** Se aisló el ARN viral del VHC a partir del plasma mediante la técnica de Chomczynski-Sacchi, se obtuvo el ADN complementario (cADN), posteriormente se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar una secuencia altamente conservada del VHC, y se evaluaron los amplicones por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Para llevar a cabo el proceso antes descrito se siguieron las técnicas que a continuación se describen.

#### **Extracción de ARN Viral.**

A partir del plasma separado de la muestra de sangre periférica de cada participante se realizó la extracción de ARN para identificar la presencia del genoma del VHC utilizando la Técnica de Chomczynski-Sacchi como se detalla a continuación. [91]

Se colocaron 400  $\mu\text{l}$  de plasma en un tubo eppendorf y se les añadió 600  $\mu\text{l}$  de trizol; fueron mezclados perfectamente y colocados en hielo por 5 minutos.

A esta mezcla se le añadió 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo grado analítico; nuevamente todo fue mezclado y colocado en hielo por 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 8,000 rpm por 5 minutos a 4 °C.

La fase acuosa fue recuperada en otro tubo eppendorf y se le añadió 600  $\mu\text{l}$  de isopropanol grado analítico. Se mezcló todo nuevamente y se dejó reposar por 1 hora a  $-20$  °C.

Completado este tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a 14,000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. El sedimento fue resuspendido en 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  con DEPC estéril, y luego se le añadieron 150  $\mu\text{l}$  de etanol 100 %.

Se procedió a centrifugar la mezcla anterior a 14,000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Al terminar de centrifugar se decantó y el residuo se dejó secar por 10 minutos. Este residuo fue resuspendido en 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  con DEPC estéril y fue utilizado inmediatamente. Cuando no fue posible utilizarlo inmediatamente se almacenó a  $-70$  °C.

**Reacción de Retrotranscripción Asociada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).** Este método se utilizó para sintetizar a partir del ARN viral una hebra complementaria en ADN (cADN), para posteriormente amplificarla por PCR y de esta manera detectar el genoma viral fácilmente por medio de electroforesis. [92]



### Condiciones de la reacción de RT-PCR para amplificar el VHC

Las reacciones de RT-PCR se prepararon de la siguiente manera:

En un tubo eppendorf estéril de 200  $\mu$ l se preparó una mezcla conformada por 3  $\mu$ l de ARN total de la muestra y 6  $\mu$ l (5)\* de H<sub>2</sub>O miliQ con DEPC, la cual se incubó a 72 °C por 10 minutos, posteriormente se mantuvo en hielo por 5 minutos, y luego se le añadieron 10  $\mu$ l de una mezcla maestra constituida con 4  $\mu$ l de Buffer 5X, 2  $\mu$ l de DTT, 2  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ l de Random Primers y 1  $\mu$ l de inhibidor de ARNasas.

A la mezcla maestra antes mencionada, formada por un total de 19  $\mu$ l, se le añadió 1  $\mu$ l de la enzima SupereScript. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, el tubo con la mezcla de reacción se colocó en el termociclador para que se llevara a cabo el programa de amplificación de la hebra complementaria del ARN del VHC, que consistía en incubar la muestra a 37 °C por una hora y posteriormente a 95 °C por cinco minutos. El cADN obtenido se conservó a – 20 °C.

Una vez obtenido el cADN del ARN del VHC, se procedió a la identificación del VHC mediante el uso de una PCR que amplificara un segmento específico y altamente conservado del genoma viral. Para esta reacción se usaron oligonucleotidos [93] que ya han sido validados y que son empleados rutinariamente en el Laboratorio de Infectología

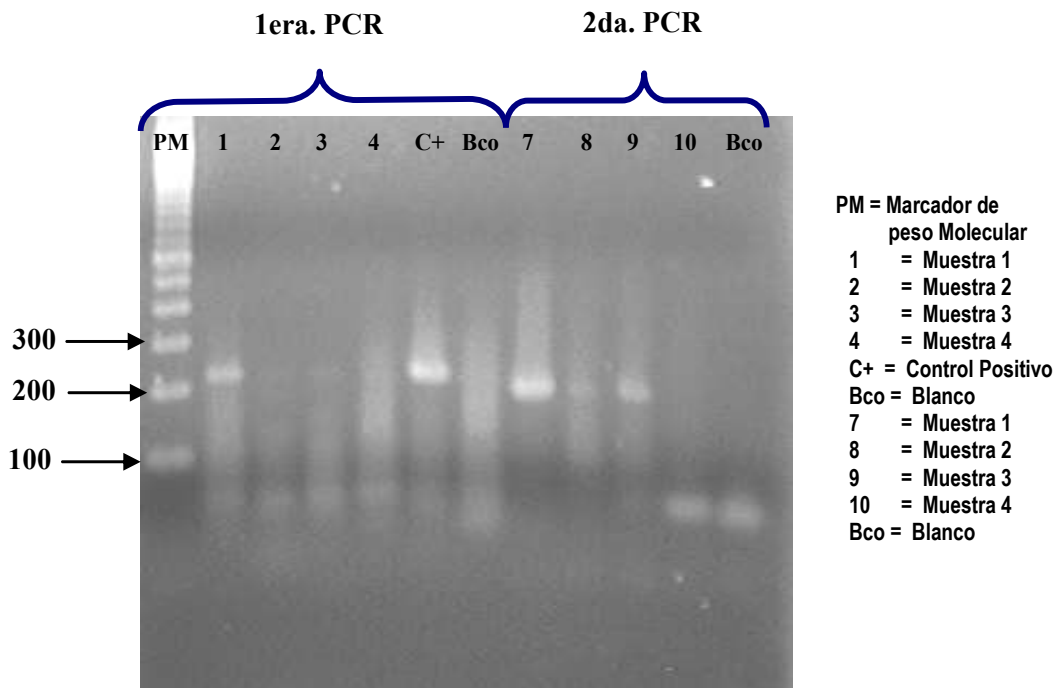
Molecular/Diagnóstico Molecular Sección Infectología, siendo los que se señalan a continuación (Tabla I):

**Tabla I**

INFORMACIÓN GENERAL DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS EN LA PRIMERA AMPLIFICACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DEL VHC

Primers usados en la primera PCR para la identificación cualitativa del VHC					
<b>OLIGOS</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Localización</b>	<b>Tamaño pb</b>	<b>Gen</b>	<b>Referencia</b>
UHCV1	CTGTGAGGAACTACTGTCTTC	-297 a -277	223	VHC	Yamada M. Dig Dis Sci. 1994;2:234-239.
DHCV2	CAACACTACTCGGCTAGCAGT	-96 a -76	223	VHC	Yamada M. Dig Dis Sci. 1994;2:234-239.

La mezcla maestra para esta Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) estuvo formada por 5 µl de Buffer 10X, 2 µl de Oligo HCV1-U 10 µM, 2 µl de Oligo HCV2-D 10 µM, 2 µl de dNTPs 10 mM, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.5 µl de TaqDNA polimerasa 5U/µl, 35 µl de H<sub>2</sub>O miliQ y 2 µl cADN para obtener un volumen total de 50 µl de mezcla de reacción. Las condiciones para la PCR fueron: un ciclo de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto; uno más de 72 °C por 10 minutos y finalmente uno de 4°C por 10 minutos. El producto de amplificación que se obtuvo fue de 223 pb y se detecto por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 1.).



**Figura 1.** ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE VHC. EN EL ÁREA DE LA 1ª PCR SE APRECIAN LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE 223 pb. EN EL ÁREA DE LA 2ª RCP, SE OBSERVAN SEGMENTOS DE 193 pb.

Con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección del VHC, se llevó a cabo una PCR ANIDADA, utilizando la mezcla maestra constituida por 5  $\mu$ l de Buffer 10X, 2  $\mu$ l de Oligo HCV3-U 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ l de Oligo HCV4-D 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 1.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  25 mM, 0.25  $\mu$ l de TaqDNA polimerasa 5U/ $\mu$ l, 36.25  $\mu$ l de  $H_2O$  miliQ y 1  $\mu$ l de producto amplificado de la primera PCR, para un volumen total de 50  $\mu$ l de mezcla de reacción. Las condiciones para la PCR fueron: un ciclo de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto; uno más de 72 °C por 10 minutos y finalmente uno de 4°C por 10 minutos. El producto de amplificación que se obtuvo fue de 194 pb y se detecto por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 1).

Los oligonucleotidos [93] empleados como cebadores en esta PCR ANIDADA también ya han sido validados y son empleados rutinariamente en el Laboratorio de Infectología Molecular/Diagnóstico Molecular Sección Infectología (Tabla II).

**Tabla II**

INFORMACIÓN GENERAL DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS EN LA SEGUNDA AMPLIFICACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DEL VHC

Primers usados en la PCR ANIDADA para la identificación cualitativa del HCV					
Oligos	Secuencia 5'-3'	Localización	Tamaño pb	Gen	Referencia
UHCV3N	ACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT	-276 a -255	194	HCV	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.
DHCV4N	ACTCGGCTAGCAGTCTTGCGG	-102 a -84	194	HCV	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.

**5.8.2.2.2 Análisis de Polimorfismos de los Genes que Codifican para RANTES, el Correceptor CCR5 y la Apolipoproteína E.** Para el análisis de polimorfismos de los genes que codifican para la quimiocina RANTES, el correceptor CCR5 y la Apolipoproteína E, se extrajo ADN genómico a partir de los leucocitos de la sangre periférica que se tomó de las mujeres incluidas en el estudio. Posteriormente se amplificaron las secuencias específicas de ADN que codifican para estas proteínas mediante PCR, utilizando iniciadores específicos. Para la determinación de los polimorfismos del gen que codifica para RANTES y del gen que codifica para la APO E se realizó el análisis de fragmentos polimórficos con enzimas de restricción (RFLPs), utilizando la enzima *Hha I* para los polimorfismos de *Apo E* y las

enzimas *Mbo II*, *Mnl I* y *Hph I* para determinar los polimorfismos de un solo nucleotido (SNPs) de RANTES In 1.1, -28 y 3'222, respectivamente. Con el fin de realizar el proceso antes descrito se siguieron las técnicas que a continuación se describen.

**Extracción de ADN genómico por la técnica de TSNT.** De las muestras de sangre periférica se hizo la separación del paquete leucocitario, a partir del cual se realizó la extracción de ADN genómico mediante el siguiente protocolo: [91]

En un tubo eppendorf de 2 ml se colocan 500  $\mu$ l de paquete globular leucocitario y se le añadieron 200  $\mu$ l de buffer de lisis TSNT (Tritón 100X 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8.0 10 mM) y se mezclaron por inversión por unos segundos para lograr una lisis total.

Posteriormente, a este lisado se le añadieron 500  $\mu$ l de fenol pH 8.0 y se mezcló ligeramente. Esta mezcla se colocó en hielo por 3 minutos.

Transcurrido este tiempo fueron añadidos 100  $\mu$ l de solución sevag [cloroformo:alcohol isoamílico (49:1)] y se mezcló por 5 minutos en vortex. Luego se le añadió 100  $\mu$ l de TE 1X, se mezcló y se dejó reposar en hielo por 3 minutos.

Se procedió a centrifugar esta mezcla a 10,000 rpm por 8 minutos. Una vez separadas las fracciones, la fase acuosa se paso a otro tubo y se le añadieron 2.5 partes de etanol 100 %, además, se le adicionó 100  $\mu$ l de acetato de sodio y se dejó reposar por 3 minutos en hielo.

Después de este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se separaron las fases por decantación y la pastilla que se formó se dejó secar al aire (no más de 2 horas).

Finalmente esta pastilla fue resuspendida en agua miliQ estéril (50  $\mu$ l).

Las muestras de ADN obtenidas fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y a todas ellas se les determinó la pureza y concentración. [91]

**Reacción en Cadena de la Polimerasa.** Es una técnica que permite amplificar rápidamente *in vitro* un fragmento específico de ADN, consiguiendo millones de copias del segmento de interés. Esta técnica resulta de la aplicación de las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión de forma cíclica, empleando los siguientes elementos para la amplificación del ADN: dNTPs, oligonucleótidos complementarios a la secuencia blanco específica, y *Taq*DNA polimerasa. [92, 94]

Los oligonucleótidos que utilizamos para la amplificación de los genes que codifican para RANTES,[29] el correceptor CCR5 [95] y para la Apolipoproteína E [96], ya están validados y son empleados en el Laboratorio de Infectología Molecular/ Diagnóstico Molecular Sección Infectología, siendo los que se señalan en la Tabla III (pág. 32).

Para la amplificación del gen que codifica para la APO E fue empleada la mezcla maestra constituida por 5  $\mu$ l de Buffer 10X, 2.5  $\mu$ l de Oligo UApoE 10  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ l de Oligo DApoE 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 3  $\mu$ l de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2.5  $\mu$ l de Tritón 2 %, 2.5  $\mu$ l de DMSO 100 %, 0.5  $\mu$ l de *Taq*DNA polimerasa 5U/ $\mu$ l, 28.5  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y 2  $\mu$ l de ADN para un volumen total

de 50 µl de mezcla de reacción. Las condiciones para la PCR fueron: un ciclo de 95 °C por 3 minutos; 35 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos y 72 °C por 20 segundos; uno más de 72 °C por 5 minutos y finalmente uno de 4°C por 10 minutos. El producto de amplificación que se obtuvo fue de 227 pb y se detecto por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

**Tabla III**

CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS OLIGONUCLÉOTIDOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN QUE CODIFICA PARA CCR5, DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA APOLIPOPROTEINA E Y DEL GEN QUE CODIFICA PARA RANTES

Oligos	Secuencia 5´-3´	Tamaño pb	Gen	Referencia
<b>Apolipoproteina E</b>				
U-ApoE	TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA	227	Apo E	Wenham PR. Lancet 1991;337:1158-1159
D-ApoE	ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACTGCCA			
<b>Correceptor CCR5</b>				
U-CCR5	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC	189 wt / 157 Δ 32	CCR5	Woitars RP, Gastroenterol 2002;122:1721-1728
D-CCR5	CCTGTGCCTCTTCTCTCATTTTCG			
<b>Quimiocina RANTES</b>				
U-RANTES -28 G/C	ACTCGAATTTCCGGAGGCTA	154	RANTES	Ping An GWN, PNAS 2002;99:10002-10007
D-RANTES -28G/C	TCTGCAGCTCAGGCTGGCCCTTTAT			
U-RANTES In1.1 T/C	CCTGGTCTTGACCACCACA	343	RANTES	Ping An GWN, PNAS 2002;99:10002-10007
D-RANTES In1.1 T/C	GCTGACAGGCATGAGTCAGA			
U-RANTES 3'222 T/C	CTGTCCCGGTAAGTACTGACAAGG	474	RANTES	Ping An GWN, PNAS 2002;99:10002-10007
D-RANTES 3'222 T/C	CCCGAGTAGCTGGGACTACA.			

Para la amplificación del gen que codifica para el correceptor CCR5, fue utilizada una mezcla maestra cuyos componentes fueron 5  $\mu\text{l}$  de Buffer 10X, 1  $\mu\text{l}$  de Oligo-U 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{l}$  de Oligo-D 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM, 3  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0.25  $\mu\text{l}$  de TaqDNA polimerasa 5U/ $\mu\text{l}$ , 36.75  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y 2  $\mu\text{l}$  de ADN, todo lo cual correspondía a 50  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción. Las condiciones programadas en el termociclador fueron: un ciclo de 95 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos y 72 °C por 20 segundos; uno más de 72 °C por 5 minutos y finalmente uno de 4°C por 10 minutos. El producto de amplificación que se obtuvo fue de 189 pb para la forma nativa del gen y de 157 pb para la delección  $\Delta 32$ , que se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

En la determinación de cada uno de los tres SNPs de RANTES, cada 50  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción para PCR contenía 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de Tris-HCl (ph 8.3), 0.2 mM de dNTPs, 0.2  $\mu\text{M}$  de cada uno de los oligos, 1.25 U de ADN polimerasa y 100 ng de ADN genómico. Las condiciones para la PCR fueron: un ciclo de 95 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos y 72 °C por 20 segundos; uno más de 72 °C y finalmente uno de 4°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron detectados en gel de agarosa al 2%. La única variación que se presentó en cada determinación fue el uso de los oligonucleótidos específicos para RANTES -28, RANTES In 1.1 y RANTES 3'222. El producto obtenido de la amplificación con los oligonucleótidos para el SNP -28G/C fue de 154 pb. El producto de la PCR para determinar el polimorfismo In1.1T/C era de 343 pb y para el SNP 3'222T/C, fue de 474 pb.



En todas las determinaciones antes señaladas, los productos de amplificación y su tamaño en pares de bases (pb), fueron verificados utilizando siempre como referencia un marcador de pares de bases.

**Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción.** Se basa en el hecho de que secuencias específicas de ADN presentan a menudo lugares de ruptura diferentes por las endonucleasas de restricción, y producen, por lo tanto, conjuntos diferentes de fragmentos al ser tratados con las endonucleasas apropiadas. [92]

Protocolos:

25  $\mu$ l de producto de amplificación de *Apo E* fueron digeridos con 3  $\mu$ l de enzima *Hha I*, en un medio constituido por 4  $\mu$ l de Buffer RxB, 1  $\mu$ l de BSA y 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O miliQ, integrando un volumen total de reacción de 40  $\mu$ l. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 3 h y posteriormente se inactivó la enzima por incubación de la mezcla a 65 °C por 10 minutos. Los productos de la digestión generaron un patrón de bandas de diferentes tamaños, que integraron el mapa de restricción de los tres principales alelos: E2, E3 y E4. Este mapa de restricción se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV

TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN ESPERADOS DE LA DIGESTIÓN, CON LA ENZIMA *Hha I*, DEL PRODUCTO DE LA AMPLIFICACION DEL GEN *Apo E*

ALELO	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS ESPERADOS DE LA DIGESTIÓN CON <i>Hha I</i> (pb)
E2	16, 18, 21, 81, 91
E3	16, 18, 21, 33, 48, 91
E4	16, 18, 19, 21, 33, 48, 72

El producto obtenido de la amplificación con los oligonucleotidos para el SNP -28G/C fue de 154 pb, el cual fue digerido con la enzima *Mnl I*, y se produjeron fragmentos de 127 pb y de 27 pb para el genotipo -28G/G y un producto no digerido de 154 pb para el genotipo -28C/C. El producto de la PCR para determinar el polimorfismo In1.1T/C era de 343 pb, el cual fue digerido con *Mbo II*, generando fragmentos de 225 pb y de 118 pb para el genotipo In1.1C/C, y un producto no digerido por la enzima de 343 pb para el genotipo In1.1T/T. Con respecto al producto obtenido de la amplificación con los primers para el SNP 3'222T/C, éste era de 474 pb, y fue digerido con la enzima de restricción *Hph I*, obteniendo un fragmento de 423 pb y de 51 pb para el genotipo 3'222C/C, y de 474 pb para el genotipo 3'222T/T, ya que el producto de la PCR no es digerido por la enzima. Las condiciones de digestión son las que se muestran en la tabla V.

Finalmente, en todos las determinaciones de polimorfismos, los productos de la digestión fueron identificados por electroforesis (90 V por 1.5 hs) en gel de agarosa al 3 %, utilizando siempre un marcador de pares de bases como referencia.

**Tabla V**

CONDICIONES DE LAS REACCIONES DE DIGESTIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS SNPs RANTES -28, In 1.1 Y 3'222.

REACTIVO	MIX 1 X
Agua miliQ	3 $\mu$ l
Buffer NEB 2	2 $\mu$ l
Enzima <i>Mbo</i> II 5 u/ $\mu$ l para RANTES In 1.1; enzima <i>Mnl</i> I 5 u/ $\mu$ l para RANTES -28; y enzima <i>Hph</i> I 5 u/ $\mu$ l para RANTES 3'222	2 $\mu$ l
Producto amplificado	13 $\mu$ l
Incubar a 37 °C por 6 hs y posteriormente inactivar la enzima por incubación de la mezcla a 65 °C por 20 minutos	

### 5.8.3 Análisis Estadístico

Se emplearon elementos de la estadística descriptiva como la media y la desviación estándar para realizar el análisis de las variables de interés.

La distribución de los alelos y genotipos de RANTES fue analizada con Chi cuadrada y prueba exacta de Fisher. Para determinar el riesgo relativo se empleo el análisis de momios y cuando resultó asociación se efectuó una regresión logística. Los niveles de expresión de RANTES en cada grupo fueron expresados como media más menos la desviación estándar y la comparación fue realizada mediante el análisis de varianza de una vía. Se tomo como nivel de significancia estadística a  $p \leq 0.05$ .

A los subgrupos control se les realizó la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para analizar si la población tenía algún sesgo.

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas SPSS, y Epi Data.

## CAPITULO 6

## RESULTADOS

### 6.1 Sujetos Incluidos en el Estudio

Un total de 168 sexoservidoras fueron invitadas a participar y se incluyeron en el estudio durante su asistencia a consulta en una Clínica de Salud Municipal de la Ciudad de Durango, Dgo. Con respecto al grupo de mujeres usuarias de drogas (UD), 153 mujeres aceptaron participar voluntariamente en el estudio y la invitación se realizó en Centros de Apoyo para Drogadictos tanto oficiales como privados. Con respecto al grupo de mujeres VIH-1 positivas se incluyeron 168 pacientes atendidas en Hospitales públicos y privados con diagnóstico confirmado de VIH-1. Finalmente, se incluyó un grupo de 168 mujeres que participaron como donadoras de sangre y que aceptaron participar en el estudio (Tabla VI).

**Tabla VI**

NÚMERO DE MUJERES QUE INTEGRARON CADA GRUPO DE ESTUDIO, EDAD, Y RANGO DE EDAD RESPECTIVO.

GRUPO DE ESTUDIO	NÚM. DE SUJETOS (n)	EDAD (min/max)
MUJERES SANAS	168	30 (18 - 55) DS 7.1
SEXOSERVIDORAS	168	31 (18 - 65) DS 8.7
DROGADICTAS	153	27.3 (18 - 63) DS 8.8
MUJERES VIH-1 POS	168	35 (18 - 54) DS 9.5

Es importante señalar que las mujeres que participaron en los diferentes grupos de estudios (drogadictas, VIH-1 positivas y sanas), se eligieron con

características de sexo, edad, lugar de origen y lugar de residencia, lo mas cercanamente posible, pareadas con el grupo de las sexoservidoras.

## **6.2 Características Demográficas y Clínicas de los Sujetos Incluidos en el Estudio**

La edad promedio en sexoservidoras fue de 31 ( $\pm$  8.7) años, en drogadictas de 27.3 ( $\pm$  8.8) años, en mujeres VIH-1 POS fue de 35 ( $\pm$  9.5) años y en mujeres donadoras de sangre de 30 ( $\pm$  7) años (Tabla VI).

El 86.7% de la población incluida en el presente trabajo es originaria del Noreste de México.

Cuentan con mas de 6 años de preparación escolar en el 50% de las sexoservidoras, el 58.2% de las drogadictas y el 87% de las pacientes VIH-1 POS (Tabla VII). Son solteras el 73.8% de las sexoservidoras, el 69% de las mujeres VIH-1 POS y el 55.6% de las drogadictas (Tabla VII).

### **Tabla VII**

PRINCIPALES CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS DE LOS  
SUBGRUPOS DE ESTUDIO

CARACTERÍSTICA DEMOGRÁFICA		SEXOSERVIDORAS f (%) n = 168	DROGADICTAS f (%) n = 153	MUJERES VIH-1 POS f (%) n = 168
ESCOLARIDAD (Años escolares cursados)	0-6	75 (44.6%)	38 (24.8%)	23 (13.6%)
	7-9	54 (32.2%)	37 (24.2%)	36 (21.4%)
	10-12	22 (13.1%)	36 (23.5%)	24 (14.3%)
	13-17	8 (4.8%)	16 (10.5%)	45 (26.8%)
	> 17	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (1.9%)
	NO contesto	9 (5.3%)	26 (16.4%)	37 (22.0%)
ESTADO CIVIL	SOLTERA	124 (73.8%)	88 (55.6%)	117 (69.0%)
	CASADA	14 (8.35%)	41 (26.4%)	28 (16.0%)
	UNIÓN LIBRE	10 (5.95%)	14 (9.0%)	8 (4.0%)
	DIVORCIADA	18 (10.7%)	14 (9.0%)	11 (6.0%)
	VIUDA	2 (1.2%)	0 (0.0%)	4 (2.0%)

### 6.3 Factores de Riesgo

Son heterosexuales el 98.8% de las sexoservidoras, el 75.8% de las drogadictas y el 63.1% de las mujeres VIH-1 POS. En cambio son bisexuales el 1.2% de las sexoservidoras, el 17.6% de las drogadictas y el 10.1% de las pacientes VIH-1 POS. No se presentó la homosexualidad en los diferentes subgrupos de estudio (Tabla VIII).

Refieren haber tenido un accidente con punzocortantes el 39.9% de las drogadictas y el 3.6% de las mujeres VIH-1 POS (Tabla VIII).

**Tabla VIII**

PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y POR VHC, ENCONTRADOS EN LOS SUBGRUPOS DE ESTUDIO

FACTOR DE RIESGO	CARACTERÍSTICA	SEXOSERVIDORAS f (%) n = 168	DROGADICTAS f (%) n = 153	MUJERES VIH-1 POS f (%) n = 168
SEXUAL	<b>Número de parejas sexuales:</b>			
	0 – 5	78 (46.4 %)	77 (50.3%)	42 (27.4%)
	6 – 10	20 (11.9 %)	45 (29.4%)	16 (10.5%)
	11 – 15	5 (3 %)	3 (2.0%)	40 (26.1%)
	> 10	9 (5.4%)	22 (14.4%)	0 (0.0%)
	NO contesto	56 (33.30%)	6 (3.9%)	55 (36.0%)
Orientación sexual:	Homosexual	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	Heterosexual	166 (98.8%)	116 (75.8%)	106 (63.1%)
	Bisexual	2 (1.2%)	27 (17.6%)	17 (10.1%)
	NO contesto	0 (0.0%)	10 (6.6%)	45 (26.8%)
ACCIDENTES PUNZO CORTANTES	Si	0 (0.0%)	61 (39.9%)	6 (3.6%)
	No	168 (100%)	92 (60.1%)	162 (96.4%)
USO DE DROGAS INTRA VENOSAS	Si	0 (0.0%)	24 (15.7%)	12 (7.2%)
	No	168 (100%)	129 (84.3%)	156 (92.8%)
USO DE DROGAS NO INTRA VENOSAS	Si	29 (17.3%)	133 (86.9%)	0 (0.0%)
	No	139 (82.7%)	20 (13.1%)	168 (100%)
TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA	Si	29 (17.3%)	20 (13.1%)	20 (11.9%)
	No	139 (82.7%)	133 (86.9%)	148 (88.1%)
INGESTA DE ALCOHOL	Negada	51 (30.4%)	41 (26.8%)	76 (45.2%)
	Ocasional	4 (2.4%)	6 (3.9%)	19 (11.3%)
	Moderada	75 (44.6%)	72 (47.0%)	65 (38.7%)
	Intensa	38 (22.6%)	34 (22.3%)	8 (4.8%)

El uso de drogas intravenosas se presentó en el 15.7% de las drogadictas, mientras 7.2% de las mujeres VIH-1 POS refieren haberlas usado, y fue negado por las sexoservidoras (Tabla VIII).

Habían recibido terapia transfusional el 17.3% de las sexoservidoras, el 13.1% de las drogadictas y el 11.9% de las mujeres VIH-1 POS (Tabla VIII). Negaron la ingesta de alcohol el 30.4% de las sexoservidoras, el 26.8% de las drogadictas y el 45.2% de las pacientes VIH-1 POS (Tabla VIII).

Refieren haber tenido entre 0 y 5 parejas el 50.3% de las drogadictas y el 27.4% de las mujeres VIH-1 POS. El 46.4% de las sexoservidoras señalaron haber tenido entre 0 y 5 clientes por semana durante el año previo a la encuesta (Tabla VIII).

Señalaron haber cursado con infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) el 8.3% de las sexoservidoras, la gonorrea fue la Enfermedad de Transmisión Sexual (ETS) mas frecuente en drogadictas (8.3%) y en mujeres VIH-1 POS prevaleció la sífilis (9.5%) (Tabla IX).

Todas las sexoservidoras refieren haber usado siempre condón. El 46.4% de las sexoservidoras tenían menos de cinco años de ejercer la prostitución.

**Tabla IX**

ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL MÁS FRECUENTES EN LOS SUBGRUPOS DE ESTUDIO

FACTOR DE RIESGO	ENFERMEDAD	SEXOSERVIDAS f (%) n = 168	DROGADICTAS f (%) n = 153	MUJERES VIH-1 POS f (%) n = 168
ENFERMEDAD DE TRANSMISIÓN SEXUAL	SIFILIS	4 (2.4%)	1 (0.6%)	16 (9.5%)
	GONORREA	1 (0.6%)	13 (8.3%)	6 (3.6%)
	CLAMIDIA	0 (0.0%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)
	VPH	14 (8.3%)	3 (1.9%)	0 (0.0%)
	HERPES SIMPLE	0 (0.0%)	0 (0.0%)	6 (3.6%)
	VHB	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
	CONDILOMAS	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5 (3.5%)
	PEDICULOSIS	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
	MOLUSCO	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.6%)
	OTRAS	4 (2.4%)	8 (5.0%)	6 (3.6%)
	TOTAL	23 (13.7%)	26 (17.0%)	42 (25%)

#### 6.4 Prevalencia de Infección por VIH-1



Las mujeres sanas, donadoras de sangre, presentaron serología negativa para el VIH-1, para el VHC y para el VHB. También resultaron negativas en la identificación del genoma del VHC por RT-PCR (Tabla X).

En las mujeres drogadictas, se estableció una seroprevalencia de infección por VIH-1 del 0.6% (n=1), y fue confirmada por Western blot (WB); en sexoservidoras se determinó una prevalencia de 0.6% (n=1) para VIH-1. Todas las pacientes VIH-1 POS, contaban con la prueba de WB positiva para este virus (Tabla X).

**Tabla X**

PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIH-1 Y POR VHC EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO

MARCADOR MOLECULAR	SANAS n = 168	SEXOSERVIDORAS n = 168	DROGADICTAS n = 153	MUJERES VIH-1 POS n = 168
	PREVALENCIA	PREVALENCIA	PREVALENCIA	PREVALENCIA
ELISA VIH-1	0 %	0.6% (n=1)	0.6% (n=1)	---
WB VIH-1	0 %	0 %	0.6% (n=1)	---
ELISA VHC	0 %	1.19% (n=2)	5.73% (n=9)	4.16% (n=7)
RT-PCR VHC	0 %	0 %	5.09% (n=8)	5.95% (n=10)

Los factores de riesgo presentes en la mujer drogadicta que resulto positiva para la infección por VIH-1 fueron: más de 10 parejas en el transcurso de su vida, haber cursado con gonorrea, inicio de vida sexual a los once años, uso de drogas por vía oral, inhalada e intravenosa, haber consumido todo tipo de drogas y tener relaciones bisexuales. En relación a

las características genéticas que nos ocupan, se le determinó un genotipo de RANTES 3'222 T/C, RANTES In1.1 T/T, RANTES -28 G/G, CCR5 WT y *Apo E* E3/E4. La concentración sérica de APO E fue de 332.4 µg/ml y la de RANTES de 7µg/ml.

En la sexoservidora que resultó positiva para anticuerpos contra VIH-1, el único factor de riesgo presente fue la promiscuidad. Presento un genotipo de RANTES 3'222 T/C. RANTES In1.1C/C, RANTES -28G/G, CCR5 WT y *Apo E* E2/E3. En ella la cuantificación plasmática de RANTES fue de 25.6 µg/ml y la de APO E de 201.6 µg/ml.

### **6.5 Prevalencia de Infección por VHC.**

De las 168 sexoservidoras solo 2 resultaron positivas para anticuerpos contra VHC, lo cual representó una prevalencia del 1.19% para esta infección. En estas dos personas, no se detectó el genoma viral por RT-PCR (Tabla X).

En las mujeres drogadictas, se estableció, mediante la determinación de anticuerpos contra VHC, una prevalencia del 5.73% (n=9), y por RT-PCR fue confirmada la presencia del virus solo en ocho de ellas.

En mujeres VIH-1 POS, por medio de la identificación del genoma del VHC por RT-PCR, se estableció una prevalencia de coinfección del 5.95% (n=10),

por anticuerpos solo se detecto esta infección viral en siete de ellas (Tabla X).

Las sexoservidoras que fueron positivas para la infección por VHC, presentaron como factor de riesgo la promiscuidad, el consumo de alcohol, y solo una de ellas tenía el antecedente de infección por VPH (Tabla XI).

En las drogadictas con infección por VHC estuvieron presentes los siguientes factores de riesgo: la bisexualidad en el 66.7%, la promiscuidad en el 100%, el haber cursado con una ETS en el 22.2%, el uso de drogas inyectables en el 88.9%, la ingesta de alcohol en el 88.9% y los accidentes punzocortantes en el 33.3% (Tabla XI).

En las mujeres VIH-1 POS que presentaron coinfección con VHC, la heterosexualidad y la promiscuidad fue una característica común entre ellas, mientras que solo el 50% había cursado con una ETS, predominando la sífilis; solo el 30% refirió haber consumido drogas intravenosas, el 90% señalo haber consumido alcohol frecuentemente, y todas negaron haber recibido terapia transfusional y haber tenido un accidente con punzocortantes (Tabla XI).

**Tabla XI**

**FACTORES DE RIESGO PRESENTES EN LAS MUJERES QUE PARTICIPARON EN EL ESTUDIO Y A QUIENES SE LES DETECTO INFECCIÓN POR VHC**

PACIENTE COINFECTADO	FACTORES DE RIESGO						
	ORIENTACIÓN SEXUAL	PROMIS- CUIDAD	ETS	UDIV	TRANSF. SANGUINEA	INGESA ALCOHOL	APC
1 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	SIFILIS	NO	NO	SI	NO
2 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	SIFILIS	NO	NO	SI	NO
3 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	NO	NO	NO	NO	NO
4 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	NO	SI	NO	SI	NO
5 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	SIFILIS	NO	NO	SI	NO
6 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	NO	SI	NO	SI	NO
7 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	GONORREA	SI	NO	SI	NO
8 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	SI	NO	NO	SI	NO
9 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL	SI	NO	NO	NO	SI	NO
10 VIH-1 POS	HETERO-SEXUAL -	SI	NO	NO	NO	SI	NO
11 DROG	BISEXUAL	SI	NO	SI	NO	SI	NO
12 DROG	BISEXUAL	SI	NO	SI	NO	NO	NO
13 DROG	HETERO-SEXUAL	SI	NO	SI	NO	SI	NO
14 DROG	HETERO-SEXUAL	SI	GONORREA	SI	NO	SI	SI
15 DROG	BISEXUAL	SI	NO	SI	NO	SI	SI
16 DROG	BISEXUAL	SI	NO	SI	NO	SI	NO
17 DROG	BISEXUAL	SI	SI	SI	SI	SI	SI
18 DROG	BISEXUAL	SI	NO	NO	NO	SI	NO
19 DROG	HETERO-SEXUAL	SI	NO	SI	NO	SI	NO
20 SX	HETERO-SEXUAL	SI	VPH	NO	NO	SI	NO
21 SX	HETERO-SEXUAL	SI	NO	NO	NO	SI	NO
<b>Total (n=21)</b>	<b>HETERO-SEXUAL 71.4%</b>	<b>SI 100%</b>	<b>SI 38.1%</b>	<b>SI 52.4%</b>	<b>SI 4.8%</b>	<b>SI 90.5%</b>	<b>SI 14.3%</b>

APC: Accidentes punzo-cortantes, ETS: Enfermedades de transmisión sexual, UDIV: Usuarías de drogas inyectables.

En las 21 personas detectadas con infección por VHC, los factores de riesgo asociados a esta infección fueron la bisexualidad, la promiscuidad, las

ETS y el uso de drogas inyectables (OR=3.7, OR=4.8, OR=2.1 y OR=10.9, respectivamente,  $p < 1E-5$ ) (Tabla XII).

**Tabla XII**

OR ESTIMADO PARA LOS FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA ADQUISICIÓN DE INFECCIÓN POR VHC EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

CARACTERÍSTICAS	CASOS VHC POS n = 21	POBLACIÓN VHC NEG n = 636	OR	$\chi^2$	p
HETEROSEXUALIDAD	15	373	1.0	$\chi^2$	< 1E-5
BISEXUALIDAD	6	40	3.73		
PROMISCUIDAD	21	108	4.84		
ETS	7	84	2.07		
USO DE DROGAS IV	11	25	10.94		

## 6.6 Polimorfismos de los Genes que Codifican para RANTES, el Correceptor CCR5 y la Apolipoproteína E

### 6.6.1 Polimorfismos del Gen que Codifica para RANTES

#### 6.6.1.1 Frecuencia de SNPs de RANTES en los subgrupos de estudio

Los genotipos -28G/C, In1.1T/T, 3'222T/T y 3'222T/C fueron los más frecuentes en todos los grupos de estudio.

El genotipo -28G/C mostró su frecuencia mas alta en las mujeres sanas (0.91); mientras que los genotipos In1.1T/T y 3'222T/T fueron los de mayor frecuencia en el subgrupo de sexoservidoras (0.74 y 0.80, respectivamente)

y el genotipo 3'222T/C fue el más frecuente en mujeres sanas (0.72) (Tabla XIII).

Los alelos -28C y 3'222C fueron los más frecuentes en mujeres sanas y pacientes VIH-1 POS (sanas: 0.78 y 0.52 respectivamente; VIH-1 POS: 0.52 y 0.55, respectivamente). El alelo -28G prevaleció en sexoservidoras (0.67) y en el de drogadictas (0.80); mientras que la frecuencia más alta del alelo 3'222T se observó en las sexoservidoras (0.89). Los alelos In1.1T e In1.1C no presentaron una diferencia significativa de su frecuencia en los subgrupos que conformaron nuestro estudio (Tabla XIII).

Se observó que los SNPs de RANTES 3'222 y RANTES -28 presentaron un ligamiento, siendo el más frecuente el 3'222T/C : -28G/C, seguido por el 3'222T/C:-28G/G y finalmente el 3'222T/C:-28C/C. Esto es confirmado por el desequilibrio que presentaron los genotipos de RANTES -28 y RANTES 3'222 en los diferentes subgrupos de estudio, aunque en el contexto de la población total, el único que no estuvo en equilibrio de HW fue el SNP RANTES 3'222.

Con respecto a los haplotipos, el F4 (32.7%) y F5 (28.5%) fueron los más frecuentes en las mujeres sanas, en el grupo de sexoservidoras fueron el F10 (28.5 %) y el F11 (27.9%), mientras que en drogadictas el F1 (31.3%), F2 (13.7%) y el F10 (11.1%) fueron los de mayor frecuencia, y en mujeres VIH-1 POS los haplotipos F20 (21.4%), F4 (16.0%) y F23 (16.0%) son los que prevalecieron (Tabla XIV).

Tabla XIII

DISTRIBUCIÓN DE ALELOS Y GENOTIPOS DE RANTES -28G/C, IN1.1T/C Y 3'222T/C EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS ANALIZADAS

	SANAS n = 166		SEXOSERVIDORAS n = 166		DROGADICTAS n = 133		VIH-1POS n = 166		TOTAL (%) n = 637		VIH-1POS n = 166	
	n (%)	f	n (%)	f	n (%)	f	n (%)	f	n (%)	f	A1-A3 n = 70 (%)	B1-C3 n = 96 (%)
<b>ALELOS</b>												
-28G	153 (91.1)	0.218	157 (93.4)	0.677	130 (84.9)	0.808	148 (88.1)	0.476	585 (89.0)	0.591	56 (80.0)	92 (93.9)
-28C	168 (100)	0.782	91 (54.2)	0.323	53 (34.6)	0.192	156 (92.8)	0.520	365 (55.6)	0.408	69 (96.6)	87 (88.8)
in1.1T	153 (91.1)	0.701	163 (97.0)	0.863	143 (93.9)	0.788	160 (95.2)	0.744	617 (93.9)	0.769	69 (96.6)	91 (92.8)
in1.1C	86 (51.2)	0.299	43 (25.6)	0.137	58 (37.9)	0.212	78 (46.4)	0.255	245 (37.3)	0.230	31 (44.3)	47 (47.9)
3'222T	153 (91.1)	0.414	165 (98.2)	0.696	142 (92.8)	0.518	96 (57.1)	0.443	556 (84.6)	0.604	36 (51.4)	60 (61.2)
3'222C	138 (82.7)	0.586	33 (19.6)	0.104	112 (73.2)	0.482	135 (80.3)	0.557	419 (63.8)	0.395	63 (90.0)	72 (73.5)
<b>GENOTIPOS</b>												
-28G/C	0 (0.0)	0.005	77 (45.9)	0.458	100 (65.3)	0.654	12 (7.1)	0.071	188 (28.8)	0.287	1 (1.4)	11 (11.2)
-28G/C	153 (91.1)	0.910	80 (47.6)	0.476	30 (19.6)	0.196	136 (80.9)	0.809	398 (60.7)	0.607	55 (78.6)	81 (82.6)
-28C/C	15 (8.9)	0.089	11 (6.5)	0.065	23 (15.0)	0.150	20 (11.9)	0.119	69 (10.5)	0.105	14 (20.0)	6 (6.1)
in1.1T/T	82 (48.8)	0.488	125 (74.4)	0.744	95 (62.1)	0.621	90 (53.6)	0.595	392 (59.7)	0.596	39 (55.7)	51 (52.0)
in1.1T/C	71 (42.3)	0.422	38 (22.6)	0.226	48 (31.4)	0.314	70 (41.7)	0.416	227 (34.5)	0.345	30 (42.8)	40 (40.8)
in1.1C/C	15 (8.9)	0.089	5 (2.9)	0.029	10 (6.5)	0.065	8 (4.8)	0.047	38 (5.8)	0.057	1 (1.4)	7 (7.1)
3'222T/T	29 (17.1)	0.172	135 (80.3)	0.803	41 (26.8)	0.268	33 (19.6)	0.196	238 (36.2)	0.362	7 (10.0)	26 (26.5)
3'222T/C	124 (72.4)	0.723	30 (17.8)	0.178	101 (66.0)	0.660	63 (37.5)	0.375	318 (48.4)	0.484	29 (41.4)	34 (34.7)
3'222C/C	15 (8.9)	0.088	3 (1.78)	0.017	11 (7.2)	0.072	72 (42.9)	0.428	101 (15.4)	0.153	34 (46.6)	38 (38.8)

#### 6.6.1.2

### **Asociación de alelos, genotipos y haplotipos de RANTES -28G/C In 1.1T/C 3'222T/C con la susceptibilidad a la infección por VIH-1**

La distribución de los alelos, genotipos y haplotipos de RANTES -28/In 1.1/3'222 en los diferentes subgrupos de estudio, fue comparada con la que se presentó en las mujeres VIH-1 POS. Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa de las frecuencias de los genotipos RANTES -28C/C y -28G/C entre las pacientes VIH-1 POS y las sexoservidoras ( $p < 1E-5$ ), las drogadictas ( $p < 1E-5$ ) y las donadoras de sangre ( $p = 5.5E-3$ ), respectivamente. Los genotipos RANTES 3'222C/C y 3'222T/C también mostraron una diferencia significativa entre las pacientes VIH-1 POS y las sexoservidoras ( $p < 1E-5$ ), las drogadictas ( $p < 1E-5$ ), y las donadoras de sangre ( $p < 1E-5$ ), respectivamente.



Tabla XIV

DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS DE RANTES -28G/C, IN1.1T/C Y 3'222T/C Y EL ODDS RATIO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS ANALIZADAS

HAPLOTIPOS RANTES	SANAS n = 168		SEXOSERV. n = 168		DROGADICTAS n = 153		VIH-1 POS n = 168		TOTAL n = 657		TOTAL MUJERES VIH-1 NEG n = 489		VIH-1 POS A1 - A3 n = 70		VIH-1 POS B1 - C3 n = 98 (%)	
	n (%)	OR	n (%)	OR	n (%)	OR	n (%)	OR	n (%)	OR	n (%)	OR	n (%)	OR	N (%)	OR
(-28 -ln1.1 -3'222)	0	--	9 (5.3)	1.0	48 (31.3)	1.0	3 (1.7)		60		57 (11.6)	N/A	0	--	3 (3.1)	--
F1 (GG-TT-TQ)	0	--	3 (1.7)	0.0	21 (13.7)	0.0	0		24		24 (4.9)	--	0	--	0	--
F2 (GG-TC-TQ)	0	--	2 (1.2)	--	6 (3.9)	N/A	0		8		8	--	0	--	0	--
F3 (GG-CC-TC)	55 (32.7)	1.0	11 (6.5)	7.3	5 (3.6)	86.4	27 (16.0)		98		71 (14.5)	1.0	13 (18.6)	N/A	14 (14.3)	N/A
F4 (GC-TT-TC)	48 (28.5)	0.76	2 (1.2)	27.0	6 (3.9)	48.0	18 (10.7)		74		56 (11.4)	0.85	8 (11.4)	N/A	10 (10.2)	N/A
F5 (GC-TC-TQ)	4 (2.3)	3.06	1 (0.6)	18.0	8 (5.2)	12.0	6 (3.6)		19		13 (2.6)	1.21	3 (4.3)	N/A	3 (3.1)	N/A
F6 (CC-TC-TQ)	7 (4.1)	N/A	0	--	5 (3.6)	N/A	5 (3.0)		17		12	--	4 (5.7)	N/A	1 (1.0)	N/A
F7 (CC-TT-TC)	10 (5.9)	0.61	2 (1.2)	N/A	2 (1.3)	N/A	3 (1.7)		17		14 (2.8)	N/A	0	--	3 (3.1)	--
F8 (GC-CC-TC)	0	--	0	--	1 (0.6)	N/A	0		1		1 (0.2)	--	0	--	0	--
F9 (CC-CC-TC)	0	--	48 (28.5)	0.25	17 (11.1)	3.7	4 (2.4)		69		65 (13.3)	0.16	1 (1.4)	N/A	3 (3.1)	--
F10 (GG-TT-TT)	12 (7.1)	1.87	47 (27.9)	0.70	10 (6.5)	17.6	11 (6.5)		80		69 (14.1)	0.42	2 (2.8)	N/A	9 (9.2)	N/A
F11 (GC-TT-TT)	1 (0.6)	N/A	6 (3.6)	--	2 (1.3)	N/A	0		9		9 (1.8)	--	0	--	0	--
F12 (CC-TT-TT)	0	--	12 (7.1)	0.5	4 (2.6)	8.0*	2 (1.2)		18		16 (3.2)	N/A	0	--	2 (2.0)	--
F13 (GG-TC-TT)	12 (7.1)	2.04	18 (10.7)	2.0	3 (2.0)	64.0*	12 (7.1)		45		33 (6.7)	0.96	3 (4.3)	N/A	9 (9.2)	N/A

\*X = 5.94, p = 0.014



En cambio, los genotipos In 1.1C/C e In 1.1T/C solo presentaron una diferencia estadísticamente significativa al comparar a las mujeres VIH-1 POS con las sexoservidoras ( $p=2E-4$ ) (Tabla XV).

**Tabla XV**

DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE RANTES -28, IN1.1 Y 3'222 Y EL ODDS RATIO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS ANALIZADAS

GRUPO		-28			In1.1			3'222		
		G/G	G/C	C/C	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C
SANAS n = 168	f	0	153	15	82	71	15	29	124	15
	OR	N/A	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	1.0	0.90	0.49	1.0	<b>0.45</b>	<b>4.22</b>
	X <sup>2</sup>	7.69	7.69	7.69	2.47	2.47	2.47	37.08	37.08	37.08
	p	<b>0.0055</b>	<b>0.0055</b>	<b>0.0055</b>	0.11	0.11	0.11	<b>1E-5</b>	<b>1E-5</b>	<b>1E-5</b>
SEXOSERVIDORAS n = 168	f	77	80	11	125	38	5	135	30	3
	OR	1.0	<b>10.91</b>	<b>11.67</b>	1.0	<b>2.56</b>	<b>2.22</b>	1.0	<b>8.59</b>	<b>98.18</b>
	X <sup>2</sup>	26.52	26.52	26.52	13.85	13.85	13.85	133.0	133.0	133.0
	p	<b>&lt;1E-5</b>	<b>&lt;1E-5</b>	<b>&lt;1E-5</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;1E-5</b>	<b>&lt;1E-5</b>	<b>&lt;1E-5</b>
DROGADICTAS n = 153	f	100	30	23	95	48	10	41	101	11
	OR	1.0	<b>37.78</b>	<b>7.25</b>	1.0	1.54	0.84	1.0	<b>0.77</b>	<b>8.13</b>
	X <sup>2</sup>	55.31	55.31	55.31	0.6	0.6	0.6	22.04	22.04	22.04
	p	<b>&lt;1E-5</b>	<b>&lt;1E-5</b>	<b>&lt;1E-5</b>	0.43	0.43	0.43	<b>&lt;1E-5</b>	<b>&lt;1E-5</b>	<b>&lt;1E-5</b>
VIH-1 POS n = 168	f	12	136	20	90	70	8	33	63	72

El alelo 3'222T mostró una asociación con la resistencia a la infección por VIH-1 en todos los subgrupos de estudio ( $p \leq 3.11E-3$ ) mientras que el alelo 3'222C se encontró asociado a la susceptibilidad a esta infección únicamente en las sexoservidoras ( $p=9.05E-29$ ) (Tabla XVI).

Los alelos In 1.1T e In 1.1C presentaron una asociación con la susceptibilidad a la infección por VIH-1, solo que el primero en mujeres sanas ( $p=0.013$ ) y el segundo en las sexoservidoras ( $p=7.0E-5$ ) (Tabla XVI).

No mostró asociación con la infección por VIH-1 el alelo RANTES -28G. El alelo -28C se asoció con la susceptibilidad a la infección por el VIH-1 en sexoservidoras y drogadictas ( $p=9.2E-16$ ,  $p=8.2E-28$  respectivamente), y mostró también una asociación con la resistencia a esta infección en las mujeres sanas ( $p=4.2E-4$ ) (TABLA XVI).

**Tabla XVI**

VALORES DE ODDS RATIO OBTENIDOS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE RANTES -28, IN1.1 Y 3'222 CON A LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS ANALIZADAS

GRUPO		-28		In1.1		3'222	
		G	C	T	C	T	C
SANAS n = 168	OR	0.725	<b>0.037</b>	<b>1.961</b>	0.826	<b>0.131</b>	0.853
	X <sup>2</sup>	0.80	12.44	2.29	0.76	50.39	0.32
	p	0.371	<b>0.00042</b>	<b>0.013</b>	0.382	<b>1.25E-12</b>	0.573
SEXOSERVIDORAS n = 168	OR	0.518	<b>11.0</b>	0.613	<b>2.519</b>	<b>0.024</b>	<b>16.73</b>
	X <sup>2</sup>	2.88	64.58	0.72	15.82	81.72	123.86
	p	0.089	<b>9.26 E-16</b>	0.396	<b>7.0E-5</b>	<b>1.56E-19</b>	<b>9.05E-29</b>
DROGADICTAS n = 153	OR	1.309	<b>24.52</b>	1.39	1.42	<b>0.103</b>	1.49
	X <sup>2</sup>	0.68	119.46	0.48	2.38	53.14	2.31
	p	0.411	<b>8.29E-28</b>	0.490	0.12	<b>3.11E-3</b>	0.128

De los 27 haplotipos posibles de RANTES -28/In1.1/3'222, se encontraron 26 en la población de estudio, de los cuales solo 10 mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes subgrupos y el subgrupo de mujeres VIH-1 POS. De esos 10 haplotipos, cuya constitución se muestra en la Tabla XIV (pág. 47), los que se encontraron asociados con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 en mujeres sanas fueron los haplotipos F6, F11, F14, F20 y F23 ( $p=6E-5$ ); en las

sexoservidoras fueron los haplotipos F4, F5, F6 y F14 ( $p=1E-5$ ), y en las usuarias de drogas se encontraron los haplotipos F4, F5, F6, F10 F11, F13, F14, F20 y F23 son los que presentaron asociación con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 ( $p=8E-5$ ) (Tabla XIV, pág. 50).

En mujeres sanas, los haplotipos asociados con la resistencia a la infección por VIH-1 fueron el F5 y F8 ( $p=6E-5$ ); mientras que en sexoservidoras fueron el F10, F11 y F13 ( $p=1E-5$ ); y en drogadictas no hubo haplotipos asociados con la resistencia a esta infección (Tabla XIV, pág. 50).

Los haplotipos no mostraron asociación con la sintomatología en la mujeres VIH-1 POS ( $p=0.2$ ) (Tabla XIV, pág. 50).

#### **6.6.1.3 Asociación de alelos, genotipos y haplotipos de RANTES - 28G/C In 1.1T/C 3'222T/C con la susceptibilidad a la infección por VHC.**

No se encontró asociación entre los genotipos de RANTES -28, In 1.1 y 3'222 con la infección por VHC en los subgrupos de estudio. Sin embargo, al hacer la evaluación del grupo de personas en las cuales se detecto una infección por VHC durante el presente estudio, y compararlos con las mujeres sanas, se estableció una asociación de los genotipos -28C/C y -28 G/C con la resistencia a la infección por VHC ( $p = 0.00001$ ), denotando una clara relación con el alelo -28C (Tabla XVII).

**Tabla XVII**

FRECUENCIAS GENOTIPICAS DE RANTES -28, IN1.1 Y 3'222 Y ODDS RATIO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VHC, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS

GRUPO	VHC		-28			In1.1			3'222		
			G/G	G/C	C/C	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C
SANAS n = 168	NEG	f	0	153	15	82	71	15	29	124	15
		POS	f	9	12	0	11	7	3	2	19
		OR	N/A	0.0	0.0	N/A	N/A	N/A	0.46	0.46	0.46
		X <sup>2</sup>	19.21	19.21	19.21	0.62	0.62	0.62	3.24	3.24	3.24
		p	0.00001	0.00001	0.00001	0.73	0.73	0.73	0.19	0.19	0.19
SEXOSERVIDORAS n = 168	NEG	f	76	79	11	124	38	4	134	29	3
		POS	f	1	1	0	1	0	1	1	0
		OR	N/A	N/A	N/A	1.0	0.0	31	N/A	N/A	N/A
		X <sup>2</sup>	0.14	0.14	0.14	1.69	1.69	1.69	1.44	1.44	1.44
		p	0.93	0.93	0.93	0.19	0.19	0.19	0.48	0.48	0.48
DROGADICTAS n = 153	NEG	f	92	29	23	89	46	9	40	93	11
		POS	f	8	1	0	6	2	1	1	8
		OR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		X <sup>2</sup>	2.60	2.60	2.60	0.59	0.59	0.59	2.32	2.32	2.32
		p	0.27	0.27	0.27	0.74	0.74	0.74	0.31	0.31	0.31
VIH-1 POS n = 168	NEG	f	12	125	20	86	64	7	12	125	20
		POS	f	0	10	0	4	5	1	0	10
		OR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		X <sup>2</sup>	2.77	2.77	2.77	1.58	1.58	1.58	0.33	0.33	0.33
		p	0.25	0.25	0.25	0.45	0.45	0.45	0.84	0.84	0.84

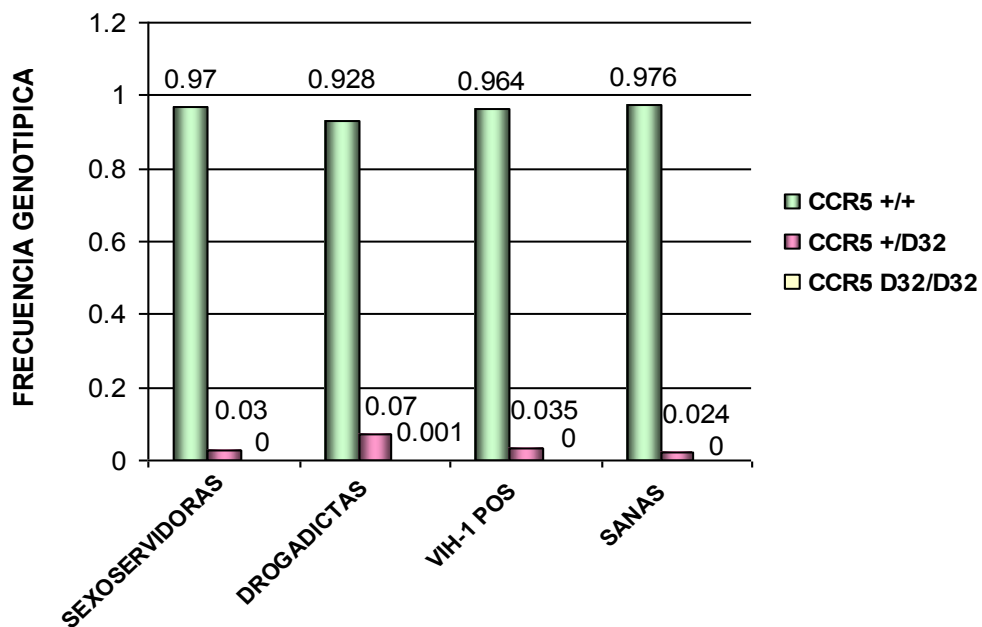
## 6.6.2 Polimorfismos del Gen que Codifica para el Correcceptor CCR5.

### 6.6.2.1 Frecuencia del polimorfismo $\Delta 32$ del gen que codifica para CCR5.

Los resultados mostraron una frecuencia del genotipo CCR5 +/+ (nativo) de 0.97 en sexoservidoras, de 0.92 en las drogadictas, de 0.96 en mujeres VIH-1 POS y de 0.97 en mujeres sanas donadoras de sangre (Figura 2).

Para el genotipo heterocigoto CCR5 +/ $\Delta$ 32, las frecuencias estimadas fueron: en sexoservidoras de 0.03, en drogadictas de 0.071, en mujeres VIH-1 POS de 0.035 y en mujeres sanas de 0.024 (Figura 2).

Las frecuencias encontradas del genotipo homocigoto para CCR5  $\Delta$ 32, fueron de cero en las sexoservidoras, mujeres VIH-1 POS y mujeres sanas, mientras que en drogadictas fue de 0.001 (Figura 2.).



**Figura 2.** FRECUENCIA DE LOS GENOTIPOS DE CCR5 EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS

La frecuencia del alelo CCR5 + (nativo) en sexoservidoras fue de 0.98, en drogadictas de 0.96, en mujeres VIH-1 POS de 0.98 y en mujeres sanas de 0.98. La frecuencia del alelo CCR5  $\Delta$ 32 en sexoservidoras se estableció

en 0.015, en drogadictas en 0.037, en mujeres VIH-1 POS en 0.018 y en mujeres sanas en 0.012 (Figura 3.).

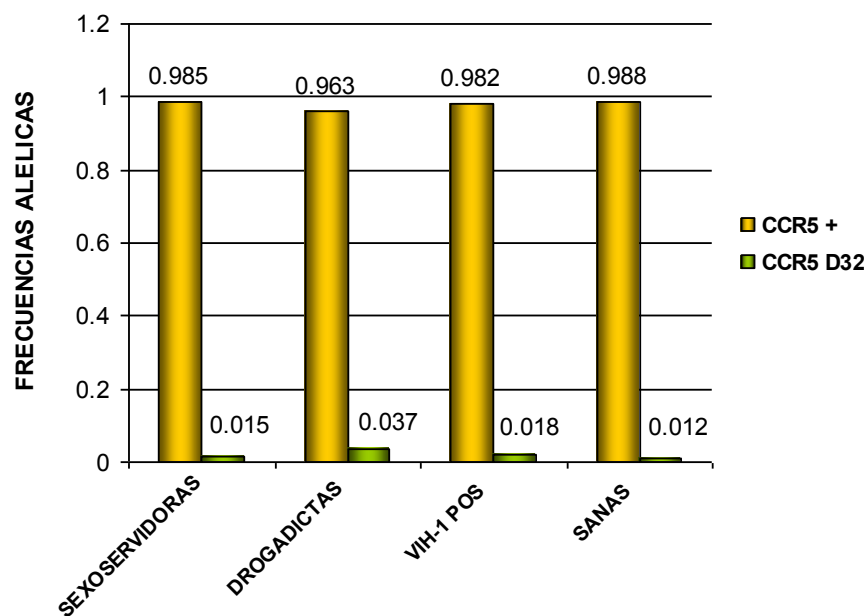


Figura 3. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE CCR5 EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS

### 6.6.2.2 Asociación de alelos y genotipos del polimorfismo $\Delta 32$ del gen que codifica para CCR5 con la susceptibilidad a la infección por VIH-1.

No se encontró una asociación entre los genotipos de CCR5 y la infección por VIH-1 en la población de estudio (Tabla XVIII).



**Tabla XVIII**

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE CCR5 Y EL OR ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VIH-1 EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS Y SEXOSERVIDORAS Y MUJERES DEL NORESTE DE MÉXICO

CCR5	CCR5 +/+ (n)	CCR5 +/-Δ32 (n)	OR	IC	p
SEXOSERVIDORAS	163	5	0.83	0.21 < OR < 3.14	<b>0.75</b>
DROGADICTAS	142	11	2.09	0.69 < OR < 6.54	<b>0.14</b>
SANAS	164	4	0.65	0.15 < OR < 2.68	<b>0.51</b>

Solo se encontró asociación entre el alelo CCR5 Δ 32 y la resistencia a la infección por VIH-1 en el subgrupo de drogadictas ( $p=0.009$ ) (Tabla XIX).

**Tabla XIX**

VALORES DE ODDS RATIO OBTENIDOS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE CCR5 +/-Δ32 CON LA INFECCIÓN POR VIH-1 EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS Y SEXOSERVIDORAS

CCR5 Δ32	OR	$\chi^2$	IC	p
SEXOSERVIDORAS	0.83	---	0.40 < OR < 1.74	0.59
DROGADICTAS	0.48	6.74	---	0.009
SANAS	0.66	---	0.30 < OR < 1.45	0.26

### 6.6.2.3 Asociación de alelos y genotipos del polimorfismo Δ32 del gen que codifica para CCR5 con la susceptibilidad a la infección por VHC.

Todas las mujeres en las que se detecto infección por VHC, presentaron un genotipo CCR5 +/+ (nativo), por lo que no se pudo establecer una

asociación de la infección por VHC con los genotipos y alelos derivados de la mutación  $\Delta 32$  en el gen que codifica para CCR5 (Tabla XX).

**Tabla XX**

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE CCR5 Y EL RESPECTIVO OR ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VHC EN MUJERES ESTUDIADAS

CCR5	VHC POS (n)	VHC NEG (n)	OR	IC	p
CCR5 +/+	19	612	0.46	0.04 < OR < 11.39	0.48
CCR5 +/ $\Delta 32$	1	25			
CCR5 $\Delta 32/\Delta 32$	0	0			

### 6.6.3 Polimorfismos del Gen que Codifica para la Apolipoproteína E.

#### 6.6.3.1 Frecuencia de los polimorfismo del gen que codifica para la Apolipoproteína E.

Como se puede observar en la Tabla XXI, el alelo más frecuente en las mujeres sanas y en las drogadictas fue el E3 (0.49); en las sexoservidoras la frecuencia de los tres alelos de *Apo E* fue similar (E2=0.32, E3=0.34, E4=0.34), mientras que en las mujeres VIH-1 POS predominó el alelo E4 (0.44).

El genotipo más frecuente de *Apo E* en todos los subgrupos de estudio fue el E3/E4. Las drogadictas y las mujeres sanas, presentaron frecuencias genotípicas muy similares entre sí, mientras que el genotipo E3/E4 fue el más frecuente en sexoservidoras y el E4/E4 en las pacientes VIH-1 POS (Tabla XXI).

**Tabla XXI**

FRECUENCIA DE GENOTIPOS Y ALELOS DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA APOLIPOPROTEÍNA E ENCONTRADA EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.

SUBGRUPO DE ESTUDIO	GENOTIPO DE APO E	POBLACIÓN QUE LO PRESENTA		DISTRIBUCIÓN DE ALELOS	POBLACIÓN QUE LO PRESENTA	
		n	f genotípica		n	f alélica
SANAS n = 168	E2 / E2	12	0.05	Homocigoto ε2	12	0.23
	E2 / E3	33	0.22	Heterocigoto ε2	53	
	E2 / E4	20	0.13	Homocigoto ε3	34	0.49
	E3 / E3	34	0.24	Heterocigoto ε3	97	
	E3 / E4	64	0.28	Homocigoto ε4	5	0.28
	E4 / E4	5	0.08	Heterocigoto ε4	84	
SEXOSERVIDAS n = 168	E2 / E2	24	0.10	Homocigoto ε2	24	0.32
	E2 / E3	37	0.22	Heterocigoto ε2	60	
	E2 / E4	23	0.22	Homocigoto ε3	8	0.34
	E3 / E3	8	0.11	Heterocigoto ε3	97	
	E3 / E4	60	0.23	Homocigoto ε4	16	0.34
	E4 / E4	16	0.12	Heterocigoto ε4	83	
DROGADICTAS n = 153	E2 / E2	12	0.06	Homocigoto ε2	12	0.25
	E2 / E3	29	0.24	Heterocigoto ε2	52	
	E2 / E4	23	0.13	Homocigoto ε3	36	0.49
	E3 / E3	36	0.24	Heterocigoto ε3	77	
	E3 / E4	48	0.26	Homocigoto ε4	5	0.26
	E4 / E4	5	0.07	Heterocigoto ε4	71	
VIH-1 POS n = 168	E2 / E2	13	0.06	Homocigoto ε2	13	0.24
	E2 / E3	20	0.16	Heterocigoto ε2	57	
	E2 / E4	37	0.21	Homocigoto ε3	16	0.32
	E3 / E3	16	0.10	Heterocigoto ε3	75	
	E3 / E4	55	0.28	Homocigoto ε4	28	0.44
	E4 / E4	28	0.19	Heterocigoto ε4	92	
POBLACIÓN TOTAL n = 657	E2 / E2	61	0.07	Homocigoto ε2	61	0.26
	E2 / E3	119	0.21	Heterocigoto ε2	221	
	E2 / E4	102	0.18	Homocigoto ε3	95	0.40
	E3 / E3	95	0.16	Heterocigoto ε3	346	
	E3 / E4	227	0.27	Homocigoto ε4	54	0.33
	E4 / E4	54	0.11	Heterocigoto ε4	329	

### 6.6.3.2 Asociación de alelos y genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E con la infección por VIH-1.

Para estimar la asociación entre los alelos y genotipos de *Apo E* y el riesgo de adquirir la infección por VIH-1, se calculó el odds ratio (OR) en cada subgrupo. Los resultados mostraron que el alelo E4 presentó asociación con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 ( $p < 3.4E-4$ ), y el alelo E3 con la resistencia a dicha infección en drogadictas y en mujeres sanas ( $p = 2.5E-3$  y  $p = 3.4E-4$ , respectivamente), sin embargo se asoció con la susceptibilidad a la infección en sexoservidoras ( $p < 1E-5$ ). El alelo E2 no mostró asociación con la infección por VIH-1 (Tabla XXII).

**Tabla XXII**

ODDS RATIO OBTENIDOS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL GEN QUE CODIFICA PARA APO E CON LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS Y SEXOSERVIDORAS

REGRESIÓN LOGÍSTICA									
	SEXOSERVIDORAS			DROGADICTAS			SANAS		
ALELO	OR	$\chi^2$	$p$	OR	$\chi^2$	$p$	OR	$\chi^2$	$p$
E2	1.0	22.5	< 1E-5	1.0	9.0	2.5E-3	1.0	12.8	3.4E-4
E3	1.25			0.67			0.60		
E4	1.68			1.68			1.46		

Los genotipos de *Apo E* mostraron una relación estrecha con la infección por VIH-1. El análisis de asociación mostró, que las portadoras del genotipo E4/E4 ( $OR \geq 3.5$ ) y del E2/E4 ( $OR \geq 1.6$ ) tenían mayor riesgo de adquirir la infección por VIH-1, en comparación con las mujeres portadoras de los otros genotipos ( $p \leq 2.8E-3$ ) (Tabla XXIII).

**Tabla XXIII**

ODDS RATIO OBTENIDOS DE LA ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL GEN QUE CODIFICA PARA APO E CON LA INFECCIÓN POR VIH-1, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS Y SEXOSERVIDAS

<b>ANÁLISIS DE MOMIOS</b>									
	<b>SEXOSERVIDAS</b>			<b>DROGADICTAS</b>			<b>SANAS</b>		
<b>GENOTIPO</b>	<b>OR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
E2 / E2	1.0	<b>18.1</b>	<b>2.8E-3</b>	1.0	<b>28.1</b>	<b>3.4E-5</b>	1.0	<b>31.5</b>	<b>7.3E-6</b>
E2 / E3	1.0			0.7			0.6		
E2 / E4	3.1			1.6			1.8		
E3 / E3	4.0			0.4			0.4		
E3 / E4	1.8			1.1			0.8		
E4 / E4	3.5			5.6			5.6		
<b>REGRESIÓN LOGÍSTICA</b>									
<b>GENOTIPO</b>	<b>OR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
E2 / E2	1.0	<b>0.47</b>	<b>0.493</b>	1.0	<b>0.08</b>	<b>0.76</b>	1.0	<b>2.02</b>	<b>0.154</b>
E2 / E3	1.0			0.7			0.6		
E2 / E4	3.1			1.6			1.8		
E3 / E3	4.0			0.4			0.4		
E3 / E4	1.8			1.1			0.8		
E4 / E4	3.5			5.6			5.6		

### 6.6.3.3 Asociación de alelos y genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E con la infección por VHC.

No se encontró una asociación entre los alelos y genotipos del gen que codifica para APO E con la susceptibilidad o resistencia a la infección por VHC.

## 6.7 Patrón de expresión de RANTES y Apo E.

### 6.7.1 Patrón de expresión de RANTES

Los niveles séricos de RANTES fueron comparados entre los cuatro subgrupos: mujeres donadoras de sangre, mujeres VIH-1 POS, drogadictas y sexoservidoras. Esta comparación mostró que el subgrupo de mujeres donadoras de sangre presentaron valores superiores a los encontrados en promedio en el subgrupo de sexoservidoras ( $p < 1E-4$ ); que el grupo de sexoservidoras tenía a su vez valores de RANTES superiores a las drogadictas ( $p < 1E-4$ ) y que este último subgrupo presentó concentraciones mayores a las de las pacientes VIH-1 POS ( $p < 1E-4$ ) (Tabla XXIV y XXV).

Tabla XXIV

PRINCIPALES PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE RANTES EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS

PARAMETROS	EXPRESIÓN DE RANTES			
	VIH-1 POS	SANAS	DROGADICTAS	SEXOSERVIDORAS
Promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )	55.7	107.9	96.9	74.8
Máximo ( $\mu\text{g/ml}$ )	252.4	4948.7	587.9	2138.0
Mínimo ( $\mu\text{g/ml}$ )	2	0	0.67	2
Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	51.12	383.2	118.1	166.5
Varianza ( $\mu\text{g/ml}$ )	2629.3	146883.2	13956.6	27729.8

No se encontró asociación entre los alelos y los genotipos de los SNPs de RANTES -28, In1.1 y 3'222 con los niveles de expresión de este gen.

**Tabla XXV**

RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RANTES, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS

	<b>F</b>	<b>p</b>		<b>F</b>	<b>p</b>
<b>VIH-1 &lt; SX</b>	0.09	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>SA &gt; UD</b>	10.52	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>VIH-1 &lt; UD</b>	0.19	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>SA &gt; SX</b>	5.30	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>VIH-1 &lt; SA</b>	0.02	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>UD &lt; SX</b>	0.50	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>SA &gt; SX &gt; UD &gt; VIH-1</b>					

Al evaluar la expresión de los SNPs de RANTES en función del ligamiento que se presenta entre el SNP RANTES 3'222 T/C y el SNP RANTES -28 G/C, se encontró que los niveles de expresión de RANTES 3'222T/C ligado a RANTES -28G/C eran mayores a los de la expresión de RANTES 3'222T/C ligado a RANTES -28G/G, y el que presentó los niveles mas bajos de expresión fue RANTES 3'222T/C ligado a RANTES -28C/C ( $R^2=0.986$ ). No se encontró asociación entre los niveles de expresión en función del ligamiento antes mencionado y la sintomatología en las pacientes VIH-1 POS ( $p=0.084$ ).

Los niveles de expresión de los haplotipos más frecuentes ( $n > 30$ ) fueron, de mayor a menor expresión, los siguientes: F5, F11, F1, F4, F10, F14 y F23 ( $R^2=0.991$ ) (Tabla XXVI).

**Tabla XXVI**

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE LOS HAPLOTIPOS MÁS FRECUENTES DE RANTES -28 / IN1.1 / 3'222 ENCONTRADOS EN MUJERES ESTUDIADAS

PARAMETROS	HAPLOTIPOS						
	F1 n = 60	F4 n = 98	F5 n = 74	F10 n = 69	F11 n = 80	F14 n = 45	F23 n = 34
Promedio (µg/ml)	118.6	75.8	148.8	74.9	83.4	67.5	64.8
Máximo (µg/ml)	587.9	840.0	4,948.7	322.9	2,138.0	193.9	187.9
Mínimo (µg/ml)	6.4	1.25	5.0	0.92	0.7	0.67	2.0
Desviación estándar (µg/ml)	149.3	75.8	571.3	58.3	235.7	49.2	46.8
Varianza (µg/ml)	22,283.4	8,234.9	326,394.4	3,400.6	55,582.6	2,419.1	2,193.4

De igual forma, se evaluaron los niveles de expresión de los haplotipos de RANTES en mujeres VIH-1 POS, solo que en este caso el orden de mayor a menor expresión fue el siguiente: F14, F20, F4, F5, F11 y F23 ( $R^2=0.947$ ) (Tabla XXVII).

**Tabla XXVII**

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE LOS HAPLOTIPOS MÁS FRECUENTES DE RANTES -28 / IN1.1 / 3'222 ENCONTRADOS EN UN GRUPO DE MUJERES VIH-1 POS

PARAMETROS	HAPLOTIPOS					
	F4 n = 27	F5 n = 18	F11 n = 11	F14 n = 12	F20 n = 36	F23 n = 27
Promedio (µg/ml)	91.2	96.5	61.2	83.0	57.9	52.1
Máximo (µg/ml)	200.0	165.0	164.4	193.9	252.4	187.9
Mínimo (µg/ml)	5.5	31.7	2.0	18.0	2.0	2.0
Desviación estándar (µg/ml)	52.5	96.5	46.0	57.1	56.7	43.3
Varianza (µg/ml)	2,752.8	2,197.8	2,121.0	3,264.9	3,213.4	1,872.9



Al comparar la expresión de los haplotipos en mujeres VIH-1 POS con respecto al que se presentó en la población total, se observó una disminución en los niveles de expresión de los haplotipos más frecuentes de RANTES -28/ln1.1/3'222, salvo en los haplotipos F14 y F23, en los cuales no se presentó un cambio significativo ( $r = -0.38$ ).

La expresión de RANTES fue menor en presencia de infección por VHC ( $R^2 = 1$ ), salvo en las mujeres VIH-1 POS, grupo en el cual no se presentó una diferencia significativa (Tabla XXVIII).

**Tabla XXVIII**

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE RANTES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE INFECCIÓN POR VHC, EN MUJERES SANAS, DROGADICTAS, SEXOSERVIDORAS Y MUJERES VIH-1 POS

PARAMETROS	EXPRESIÓN DE RANTES							
	SEXOSERVIDORAS		DROGADICTAS		VIH-1 POS		SANAS	
	VHC POS n = 2	VHC NEG n = 166	VHC POS n = 9	VHC NEG n = 144	VHC POS n = 11	VHC NEG n = 157	VHC POS n = 0	VHC NEG n = 168
Promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )	38.3	75.24	109.61	96.16	92.4	73.05	--	107.9
Mediana ( $\mu\text{g/ml}$ )	38.3	50.65	83.17	49.72	101.0	60.0	--	74.1
Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	17.9	167.47	86.64	120.01	49.93	51.28	--	383.2
Máximo ( $\mu\text{g/ml}$ )	51.0	2,138.0	236.4	587.9	159.0	252.4	--	4,948.7
Mínimo ( $\mu\text{g/ml}$ )	25.6	2.0	7.0	0.675	27.7	2.0	--	0
Varianza ( $\mu\text{g/ml}$ )	322.6	28,047.7	7,508.0	14,404.3	2,493.6	2,375.7	--	146,883.2

### 6.7.2 Patrón de expresión de Apo E

No hubo una diferencia significativa en la expresión de Apo E entre las personas con infección por VHC y las personas sin esta infección viral (Tabla XXIX), salvo en el grupo de sexoservidoras, sin embargo, la frecuencia de

sexoservidoras con VHC fue muy baja y no permite hacer una comparación estadísticamente válida de los niveles de expresión de *Apo E* entre sexoservidoras VHC positivas y VHC negativas.

Se encontró que en sexoservidoras los niveles de expresión de *Apo E* eran superiores a los encontrados en drogadictas, las cuales a su vez tenían valores superiores al de las pacientes VIH-1 POS y éstas últimas presentaron concentraciones mayores de *Apo E* al de las mujeres sanas ( $R^2=0.956$ ) (Tabla XXIX).

**Tabla XXIX**

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE APO E EN LOS SUBGRUPOS DE MUJERES DEL NORESTE DE MÉXICO QUE CONFORMARON LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. SE DESCRIBE DICHA EXPRESIÓN EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE INFECCIÓN POR VHC

PARAMETROS	EXPRESIÓN DE <i>Apo E</i>							
	SEXOSERVIDORAS		DROGADICTAS		VIH-1 POS		SANAS	
	VHC POS n = 2	VHC NEG n = 166	VHC POS n = 9	VHC NEG n = 144	VHC POS n = 11	VHC NEG n = 157	VHC POS n = 0	VHC NEG n = 168
Promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )	253.3	394.4	225.68	230.31	144.72	221.33	--	331.94
Mediana ( $\mu\text{g/ml}$ )	253.3	325.6	207.6	191.0	66.4	201.6	--	347.6
Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	73.11	338.07	216.43	202.23	180.86	179.75	--	161.56
Máximo ( $\mu\text{g/ml}$ )	305.0	2,081.6	713.6	1,197.6	605.6	854.4	--	794.0
Mínimo ( $\mu\text{g/ml}$ )	201.6	5.6	10.0	1.0	0.4	0.4	--	2.53
Varianza ( $\mu\text{g/ml}$ )	5,345.8	114,293.9	46,845.2	40,901.0	32,713.4	32,312.9	--	26,102.7

Al evaluar los niveles de expresión de los genotipos de *Apo E*, se encontró que el orden de mayor a menor expresión fue la siguiente: E4/E4, E3/E3, E3/E4, E2/E2, E2/E3, E2/E4 ( $R^2=0.935$ ) (Tabla XXX).

**Tabla XXX**

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS QUE DESCRIBEN LA EXPRESIÓN DE LOS GENOTIPOS DE APO E ENCONTRADOS EN UN GRUPO DE MUJERES VIH-1 POS

PARAMETROS	EXPRESIÓN DE GENOTIPOS DE Apo E					
	E2/E2 n = 61	E2/E3 n = 119	E2/E4 n = 102	E3/E3 n = 95	E3/E4 n = 227	E4/E4 n = 54
Promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )	330.9	287.3	231.6	312.4	301.3	305.7
Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	231.5	206.5	185.6	278.9	244.1	322.2
Máximo ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,093.6	1,102.4	781.6	2,081.6	2,007.6	305.7
Mínimo ( $\mu\text{g/ml}$ )	5.6	2.5	10.0	0.4	2.4	5.6
Varianza ( $\mu\text{g/ml}$ )	53,584.0	42,657.5	34,457.3	77,798.6	59,595.1	103,835.5

## **CAPITULO 7**

### **DISCUSIÓN**

Se determinó una prevalencia de infección por VIH-1 de 0.6% tanto en sexoservidoras, como en drogadictas. En ambos casos esta estimación es menor que la establecida para dichos grupos a nivel nacional, pues en trabajadores sexuales, sin distinción de género, se estimó una prevalencia de 5.5% durante el 2005, y en usuarios de drogas inyectables, también sin distinción de género y durante el mismo año, se determinó una prevalencia de 2.8%. [2]

La prevalencia de VIH-1 en drogadictas, determinada en este estudio, es mucho menor a la reportada en otros países como China y Canadá, en donde la prevalencia es de 8.1% y de 13.2%, respectivamente.[1] Pueden existir diversos factores que contribuyen a esta diferencia, entre ellos los genéticos, los económicos, culturales, y el medio ambiente. Lamentablemente, en lo que respecta a México, se aprecia claramente un incremento en la prevalencia, dado que mientras que a nivel nacional era de 1.2% en 1997, en el 2005 fue 2.8%. [1, 2]

En relación a las sexoservidoras, se determinó una prevalencia de infección por VIH-1 mayor a la reportada en otros países como China, en donde los registros señalan una prevalencia de 0.3% en el 2007. [1] En este grupo, se ha reportado un incremento en la prevalencia de infección por VIH-

1 en México, pues se estimó en 0.3% en 1999 y como se mencionó previamente, en el 2005 fue de 5.5%. [1, 2]

Las conductas de riesgo asociadas con la adquisición de infección por VIH-1 en sexoservidoras fue un número de parejas mayor de 6 ( $p=1E-5$ ) y tener relaciones bisexuales ( $p=2E-5$ ). En cambio, en drogadictas, estas conductas y el consumo de drogas inyectables fueron las relacionadas con la adquisición de infección por VIH-1.

La prevalencia de infección por VHC en sexoservidoras (1.2%), en drogadictas (5.7%) y en pacientes VIH-1 POS (5.9%), fue mayor a la reportada en estudios realizados en donadores de sangre mexicanos, en los que se determinó una prevalencia que fluctúa entre 1.1% y 0.8%. [97, 98]

En las pacientes VIH-1 POS la coinfección con VHC (5.95%) fue menor a la reportada en un estudio realizado en individuos VIH-1 POS del Noreste de México, en el cual se determinó una coinfección del 12.1%, y se incluían tanto hombres como mujeres. [88] También fue menor a la reportada en pacientes VIH-1 POS, sin distinción de género, en otros países como España, en donde la frecuencia de coinfección con estos dos virus llega a ser del 54% al 55%. [99]

Los factores de riesgo presentes en las mujeres VHC POS, muestran como el uso de drogas inyectables tiene mayor ingerencia en la transmisión de esta infección viral, sobrepasando con mucho a los otros factores que son la promiscuidad sexual, la bisexualidad y las ETS ( $p<1E-5$ ).

En la población general, las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs de RANTES In1.1 y -28 estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). Así mismo, se determinó que la frecuencia del alelo -28G (0.59) fue similar a la reportada en chinos y japoneses (0.62), [10, 100] sin embargo, se ha encontrado raramente o con poca frecuencia en otros grupos étnicos como los asiáticos (0.13) [29, 31]

En el grupo de mexicanas que se estudió, se encontró una frecuencia del alelo In 1.1C de 0.23, mientras que en Euroamericanos se ha encontrado una frecuencia de 0.14, de 0.20 en Afroamericanos y de 0.34 en Asiáticos. [29] Para el alelo 3'222C se determinó una frecuencia de 0.39, valor que es superior al reportado en Euroamericanos (0.11), en Afroamericanos (0.07) y en Asiáticos (0.24). [29]

Los resultados mostraron una asociación del alelo RANTES 3'222T con la resistencia a la infección por VIH-1; y el alelo RANTES -28G no presentó asociación con esta infección. En cambio, con respecto a los demás alelos de los SNPs de RANTES -28, In1.1 y 3'222 y su asociación con la infección por el VIH-1 es controversial, pues en algunos casos, como el del alelo In1.1C, éste mostró una asociación con la susceptibilidad a esta infección viral en sexoservidoras, pero dicha relación no permaneció constante en los demás subgrupos de estudio; o bien, como el comportamiento que presentó el alelo -28C, que en algunos subgrupos la asociación se presentó con la resistencia al VIH-1 y en otros con la susceptibilidad a este.

Sin embargo, parte de esta controversia es justificada por las frecuencias alélicas y genotípicas derivadas de los SNPs de RANTES -28/In 1.1/3'222, así como de los haplotipos derivados de ellos, junto con su respectiva asociación con la infección por VIH-1, ya que sugieren fehacientemente que los diferentes SNPs de RANTES influyen unos sobre otros. Así, al analizar estas frecuencias y asociaciones, es evidente que el SNP 3'222T está asociado con la resistencia a la infección por VIH-1, y que su influencia prevalece sobre la que pudiera ejercer cualquier otro SNP de RANTES individualmente. En cambio, la presencia conjunta del SNP 28C e In 1.1T, anulan la influencia que tiene el SNP 3'222T sobre la resistencia a la infección por VIH-1.

Por otra parte, la relación entre los SNPs de RANTES y sus frecuencias en los diferentes subgrupos de estudio muestran claramente la asociación de RANTES In 1.1T y -28C con la susceptibilidad a la infección por VIH-1, y la neutralidad del SNP -28G con respecto a esta infección. Sin embargo, no está clara la relación del In 1.1 C y 3'222C con los otros SNPs de RANTES.

En nuestra población de estudio integrada por mexicanas procedentes del noreste de México, no se logró establecer la asociación del alelo In1.1C con un efecto protector a la infección por VIH-1 descrito para población hispana, [36] pero sí se estableció una relación del alelo In1.1T con la susceptibilidad a esta infección en mujeres sanas.

El genotipo 3'222C/C, fue el único que presentó asociación con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 en los diferentes subgrupos de

estudio. El genotipo RANTES 3'222T/C, mostró asociación con la resistencia a la infección en mujeres sanas y drogadictas, y con la susceptibilidad a la misma en sexoservidoras. Este comportamiento que no es congruente con la relación que presentaron individualmente los alelos que lo conforman con la infección por VIH-1, puede estar más asociado con la interacción que se da entre los SNPs RANTES 3'222T y RANTES 3'222C con el SNP RANTES In 1.1T, que en el presente estudio mostró una asociación con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 y que esta presente, en forma adjunta, en más del 63% de los alelos de RANTES 3'222 observados en las sexoservidoras.

En cuanto al genotipo RANTES 3'222T/T, llama la atención que no mostró asociación con la infección por VIH-1 (OR=1.0, p=1E-5), pues era de esperar una asociación con un efecto protector por la presencia del alelo 3'222T, que en este estudio se encontró relacionado con la resistencia a la infección por dicho virus. Este comportamiento podría influir en la presencia del SNP RANTES In 1.1T, que se encontró asociado con la susceptibilidad a la infección por VIH-1, y se encuentra en más del 70% de toda la población de estudio. Este alelo presenta un efecto contrario al del asociado con el alelo 3'222T, por lo que aparentemente, se estaría compensado uno y otro efecto, quedando una resultante neutra en cuanto a la asociación con la infección por VIH-1. [36-38]

Los genotipos RANTES In1.1C/C y T/C presentaron una asociación con la susceptibilidad a la infección por el VIH-1.



Los genotipos de RANTES -28C/C y T/C muestran también una susceptibilidad a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, pero en este caso, esta asociación está presente tanto en sexoservidoras como en drogadictas, no así en mujeres sanas, donde se asocian con una mayor resistencia a la infección por VIH-1. Este comportamiento podría estar relacionado con el ligamiento que se observó entre RANTES 3'222 y RANTES -28, y apoyar que el SNP RANTES 3'222T, se asocia con la resistencia a dicha infección viral.

Con respecto a los haplotipos, algunos de ellos se presentan en forma característica en cada subgrupo de estudio: en mujeres sanas fue el haplotipo F5, en sexoservidoras el F11, en drogadictas el F1 y en mujeres VIH-1 POS el haplotipo F20.

El haplotipo F20 fue asociado en mujeres sanas y en drogadictas con una alta susceptibilidad a la infección por VIH-1, y fue precisamente el más frecuente en las mujeres VIH-1 POS que participaron en el presente trabajo.

En drogadictas los haplotipos más frecuentes fueron el F1 y F2. El primero no mostró asociación con la infección por VIH-1, mientras que el segundo presentó un efecto protector contra la infección por VIH-1 ( $p=8E-5$ ).

Los haplotipos no mostraron una asociación con la sintomatología en las mujeres VIH-1 POS ( $p=0.2$ ).

La ocurrencia de los alelos, genotipos y haplotipos en los diferentes subgrupos de estudio y su asociación con la infección por VIH-1, indican que los haplotipos CTT y GTC de RANTES -28/In1.1/3'222 son los asociados a la susceptibilidad a la infección por VIH-1 en la población del noreste de México que participo en el presente estudio, además, que el alelo RANTES In 1.1T es el que mas influye en la susceptibilidad a la infección por VIH-1, lo cual difiere de lo reportado en otros estudios, donde el alelo In 1.1C es el de mayor preponderancia en la asociación con esta infección. [38, 43]

Es importante resaltar que el haplotipo GTT fue el asociado con la resistencia a la infección por VIH-1 en nuestra población de estudio.

Así mismo, llama la atención que el alelo RANTES -28G, que en forma independiente no mostró asociación con la infección por VIH-1, sin embargo como parte de un haplotipo parecen influir en la resistencia a dicha infección viral, sobre todo si como genotipo homocigoto presenta una fuerte asociación con la infección, pero el factor de riesgo es 1 (uno). Esta observación enmarca la importancia de señalar que, en todos los haplotipos de RANTES -28/In 1.1/3'222 asociados con la resistencia a la infección por VIH-1 estan presentes, en forma conjunta, el SNP -28G y el SNP 3'222T, hecho que fortalece la propuesta del efecto neutro del SNP -28G y el efecto protector del SNP 3'222T.

Los niveles de expresión de RANTES en mujeres VIH-1 POS fueron menores a los encontrados en las mujeres sanas, resultados que difieren a lo observado en otros estudios, en donde la expresión de RANTES es mayor en la población VIH-1 positiva que en los controles sanos. [101]

No se encontró una asociación entre los alelos y los genotipos con los niveles de expresión de RANTES, sin embargo si se encontró una asociación, entre los haplotipos, formados por combinación de genotipos, y la expresión de RANTES. En este sentido, se esperaría que la diferencia observada en la expresión de RANTES entre los subgrupos se debiera a la frecuencia de haplotipos en cada uno de ellos, sin embargo los haplotipos mas frecuentes en cada subgrupo compensan entre si las diferencias que presentan en su expresión, por consiguiente, los niveles sericos de RANTES en cada subgrupo, fueron inherentes al factor de riesgo principal en ellos, o bien, a la ausencia de los mismos, como es el caso de las mujeres sanas.

Además de la influencia que presentaron los factoes de riesgo en la expresión de RANTES, también se observo que el SNP RANTES -28C aumentaba los niveles de expresión de RANTES, salvo en las pacientes VIH-1 POS.

La variación en la concentración de los haplotipos de RANTES en presencia de infección por el VIH-1 es mucho menor.

Se determinó que los genotipos -28C/C y -28 G/C (OR=0.00,  $p=1E-5$ ) presentaban un efecto protector contra la infección por VHC, lo cual mostró claramente una relación entre este efecto y el alelo -28C.

La frecuencia del alelo CCR5  $\Delta 32$  determinada en los diferentes subgrupos de estudio fue mucho menor en todos los casos, que la reportada para la población caucásica, en la que se ha señalado una frecuencia que va del 8% al 10%; así mismo, en sexoservidoras y mujeres sanas la frecuencia se estimó en niveles por debajo de los reportados para la población hispana (2% - 5%). [51, 63-65]

Solo se encontró a la mutación  $\Delta 32$  de CCR5 asociada a la resistencia a la infección por VIH-1 en el subgrupo de drogadictas. No se encontró asociación entre esta mutación y la infección por VHC.

Las frecuencias de los alelos E2, E3 y E4 que se determinaron en los subgrupos de estudio, difieren mucho de la determinada en México-Americanos y en otros grupos étnicos como los alemanes y franceses, sin embargo son similares a las determinadas en población japonesa. [102-112]

Al comparar las frecuencias genotípicas de *Apo E* en la población de estudio con respecto a la reportada en otros grupos étnicos, no se encontró semejanza con alguno de ellos, lo que indica una distribución genotípica

característica en el grupo de mujeres del noreste de México que participo en el presente trabajo. [102-112]

El alelo E2 fue el más frecuente en las sexoservidoras; el E4 prevaleció en las mujeres VIH-1 POS y el alelo E3 en drogadictas y mujeres sanas.

El análisis de riesgo mostró que el alelo E4 confería mayor susceptibilidad a la infección por VIH-1 a quienes lo portaban, y un efecto protector se asoció al alelo E3 en drogadictas y mujeres sanas. Estas asociaciones coinciden con la reportada en otros estudios.

Sin embargo, en sexoservidoras se encontró una discrepancia con lo antes señalado, pues el alelo E3 en este subgrupo de estudio, se asoció con la susceptibilidad a la infección por VIH-1. Posiblemente, este hecho este relacionado con que en dicho subgrupo hay una baja frecuencia de homocigotos para E3, mientras que los heterocigotos, en su mayoría (61%) son E3/E4, y por consiguiente, esta asociación del alelo E3 con la susceptibilidad a la infección viral, es más un reflejo de la participación del alelo E4, que su propia relación con dicha infección.

Los genotipos mostraron una relación estrecha con la infección por VIH-1, sin embargo, el análisis de asociación mostró que no hay una asociación directa con esta infección. Posiblemente esta circunstancia se deba a que dicha relación se esta dando en función de los alelos que los conforman y no por la interacción alelo-alelo con la infección. Por otra parte, también hay que

considerar que entre los mecanismos propuestos, a través de los cuales la APO E participa en infecciones virales, se encuentra el que señala que esta proteína interactúa con las proteínas de fusión viral en forma selectiva, cuyo mecanismo aun es desconocido, pero que implica la consideración de una gran diversidad de variables, entre ellas la diferencia estructural entre las isoformas de la APO E y su correspondiente variación en la afinidad hacia las proteínas de fusión, así como su interacción con los lípidos en la formación de lipoproteínas y su afinidad a los receptores LDL. [14]

Estudios previos han asociado al alelo E2 con concentraciones más altas de APO E, y a E4 con niveles de expresión más bajos, sin embargo, en el presente estudio se encontró que el genotipo E4/E4 presentaba niveles de expresión mayores que el E3/E3, y este a su vez superiores que el genotipo E2/E2, no concordando con la asociación antes señalada. [102, 113, 114]

La expresión encontrada en las formas heterocigotas de *Apo E* en la población de estudio, tampoco es coincidente con la reportada en un estudio realizado en México-Americanos, en el cual se señala que la expresión de *Apo E* es alta en las personas con genotipo E2/E3, es intermedia en el caso de E3/E3 y son bajas en el genotipo E3/E4; en cambio, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la expresión, de mayor a menor grado, es en el siguiente orden: E4/E4, E3/E3, E3/E4, E2/E2, E2/E3, E2/E4; coincidiendo con el estudio previamente señalado, solo en que E3/E3 es mayor a E3/E4, pero divergen en que la expresión en E2/E3 es mayor a la de los dos genotipos anteriores. [115]

Hay otro estudio que señala que la expresión de E2 es menor a la de E3 y E4, y además, que en la expresión de *Apo E* influye la variabilidad genética, [116] en ese sentido, los resultados obtenidos muestran coincidencia en cuanto a la comparación en los niveles de expresión respecto a los alelos, sin embargo, en cuanto a la variabilidad genética hay algunas controversias, pues por un lado se encontró que las frecuencias alélicas y genotípicas en mujeres sanas y drogadictas fueron muy similares, sin embargo, la expresión de *Apo E* en cada grupo fue estadísticamente diferente, siendo superior en las drogadictas que en las sanas ( $R^2=0.95$ ). Y por otra parte, la expresión de *Apo E* en sexoservidoras, que en su gran mayoría estaban sanas, fue mayor a la determinada en mujeres sanas donadoras de sangre. Ambos grupos tienen una diferente distribución alélicas y genotípica de *Apo E*, lo cual apoya la conclusión de que en la expresión de *Apo E* influye la variabilidad genética. [116]

Dichas controversias pueden estar relacionadas a que en las mujeres sanas, en las drogadictas y en las sexoservidoras, prevalecen los heterocigotos de E3, y no se pudo distinguir en estos casos, cual era el alelo expresado.

Los niveles de expresión de *Apo E* no mostraron una variación significativa en presencia o ausencia de infección por VHC.

## CAPITULO 8

### CONCLUSIONES

La prevalencia de infección por VIH-1 tanto en las mujeres drogadictas como en sexoservidoras fue de 0.6%.

Las conductas de riesgo asociados con la adquisición de infección por VIH-1 en sexoservidoras fue un número de parejas mayor de 6 ( $p=1E-5$ ) y tener relaciones bisexuales ( $p=2E-5$ ). En drogadictas, estas conductas, y el uso de drogas inyectables fueron las relacionadas con la adquisición de esta infección viral.

La prevalencia de infección por VHC en sexoservidoras, fue de 1.2%, de 5.7% en drogadictas y de 5.9% en las pacientes VIH-1 POS.

Los factores de riesgo asociados con la infección por VHC fueron el uso de drogas inyectables, la promiscuidad sexual, la bisexualidad y las ETS ( $p<1E-5$ ).

El alelo RANTES 3'222T se encontró asociado con la resistencia a la infección por VIH-1 en la población de estudio ( $p<3.11E-3$ ).



Se asoció a los haplotipos CTT y GTC de RANTES -28/In1.1/3'222 con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 en mujeres del Noreste de México, y al haplotipo GTT con la resistencia a dicha infección.

Se detectó un ligamiento entre los SNPs RANTES -28 y RANTES 3'222, el cual influye en la expresión de RANTES.

La expresión de los haplotipos de RANTES disminuye en presencia de infección por el VIH-1.

En mujeres mexicanas del Noreste de México, no se pudo establecer la asociación del alelo In1.1C con un efecto protector a la infección por VIH-1 descrito para población hispana, [36] pero si se estableció una relación del alelo In1.1T con la susceptibilidad a esta infección. [38, 43]

La expresión de RANTES varió en los diferentes subgrupos de estudio en función de una respuesta ante los factores de riesgo inherentes a cada uno de ellos.

Se encontró una asociación de la infección por VHC con los genotipos RANTES -28C/C y -28 G/C ( $p = 0.00001$ ), los cuales mostraron un efecto protector contra esta infección viral, y además queda evidenciada una clara relación con el alelo RANTES -28C.

En las mujeres analizadas se encontró una distribución genotípica de *Apo E* característica, pues es diferente al patrón encontrado en otros grupos étnicos.

Las frecuencias alélicas de *Apo E* en la población general que participo en el presente trabajo fueron: E2 = 0.26, E3 = 0.40 y E4 = 0.33. Las frecuencias genotípicas fueron: E2/E2 = 0.07, E2/E3 = 0.21, E2/E4 = 0.18, E3/E3 = 0.16, E3/E4 = 0.27 y E4/E4 = 0.11.

El alelo E4 se asoció con la susceptibilidad a la infección por VIH-1 confiriendo hasta 1.68 veces más riesgo a ella que los alelos E2 y E3; mientras que el genotipo homocigoto E4/E4 aumenta hasta 5.6 veces dicho riesgo.

El alelo E3 se asoció a la resistencia a la infección, aumentando alrededor de un 30% su influencia como factor de protección a la infección por VIH-1 cuando se encuentra como homocigoto E3/E3.

Los alelos E2, E3, E4 de *Apo E* presentaron niveles de expresión característicos, siendo el alelo E4 el de mayor expresión, seguido por el E3 y el de menor expresión fue el alelo E2.

En la baja prevalencia de infección por VIH-1 en las sexoservidoras y drogadictas, influyeron factores genéticos del hospedero asociados con la

prevalencia del alelo E3 de *Apo E* y su respectiva expresión, así como con la presencia del alelo RANTES 3'222T, y niveles de expresión de RANTES superiores a los encontrados en mujeres con infección por VIH-1.

Los niveles de expresión de *Apo E* no mostraron una variación significativa en presencia o ausencia de infección por VHC.

La mutación  $\Delta 32$  en el gen que codifica para CCR5, solo se encontró asociada con la resistencia a la infección por VIH-1 en drogadictas.

## CAPITULO 8

### BIBLIOGRAFÍA

1. OMS/UNAIDS. 2008 Report on the global AIDS epidemic. HIV and AIDS estimates and data, 2007 and 2001, 2009
2. OMS/UNAIDS/unicef. Epidemiological Fact Sheet on HIV and AIDS. Core data on epidemiology and response. Mexico. 2009
3. G. P. How immune-based intervention can change HIV therapy. *Nat Med.* 1997;3:483
4. Kootstra NA ZB, Schuitemaker H. Diminished human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription and nuclear transport in primary macrophages arrested in early (G1) phase of the cell cycle. *J. Virol* 2000;74:1712
5. Petit AJC TM, Terpastra FG, de Goede REY, van Lier RAW, Miedema F. Decreased accessory cell function by human monocytic cells after infection with HIV. *J. Immunol* 1988;140:1485
6. Yoo J CH, Kraus T, Hirsch D, Polyak S, George I, Sperber K. Altered cytokine production and accessory cell function after HIV-1 infection. *J Immunol* 1996;157:1313
7. Oyaizu N AY, Hashimoto F, Mc Closkey TW, Hosaka N, Kayagaki N, *et al.* Monocyte express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4 T-cell apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection. *J Immunol* 1997;158:2456
8. Ruibal-Ares B RN, de Bracco MME. Macrophages, multinucleated giant cells and apoptosis in HIV+ patients and normal blood donors. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;82:102
9. Carrington M NG, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, *et al.* HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science* 1999;283:1748
10. X.-Y. Zhao SSL, K. H. Wong, K. C. W. Chan, S. Ma, W.-C. Yam, K. Y. Yuen, M. H. Ng, B. H. Zheng. Effects of single nucleotide polymorphisms in the RANTES promoter region in healthy and HIV-infected indigenous Chinese. *European Journal of Immunogenetics* 2004;31:179-183
11. Feng Y BC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane domain, G protein coupled receptor. *Science* 1996;272:272-872
12. Deng H LR, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates. *Nature* 1996;381:661
13. Dragic T LV, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima K, *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR5. *Nature* 1996;381:667
14. Dabson CB SS, Hoggard P, Wozniak MA, Crutcher KA. The receptor-binding region of human apolipoprotein E has direct anti-infective activity. *J Infect Dis.* 2006;193:442-450

15. Dabson CB WM, Itzhaki RF. Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol* 2003;11:312-317
16. Corder EH RK, Lannfelt L, Boqdanovic N, Eggertsen G, Wilkins J, Hall C. HIV-infected subjects with the E4 allele for APO E have excess dementia and peripheral neuropathy. *Nat Med.* 1998;4:1182-1184
17. Itzhaki RF WM, Dobson C, Lin WR. Apo E - viral interactions. *Nat Med.* 1998;4:1344
18. Wozniak MA SS, Dobson CB, Parker SP, Scott FT, Leedham-Green M, Breuer J, Itzhak RF. Does apolipoprotein E determine outcome of infection by Varicella Zoster virus and Epstein Barr virus. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:672-678
19. ONUSIDA. Situación de la epidemia de SIDA. Programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA)/Organización Mundial de la Salud (OMS) 2007;ONUSIDA/07.27S / JC1322S
20. ONUSIDA. Situación de la epidemia de SIDA. Programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA)/Organización Mundial de la Salud (OMS) 2005;ONUSIDA/05.19S
21. CDC. HIV/AIDS Surveillance Report. 2006. US Department of Health and Human Services, CDC 2008;18:1-55
22. CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance, 2006. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC 2007
23. Hall HI SR, Rhodes P, *et al.* Estimation of HIV incidence in the United States. *JAMA* 2008;300:520-529
24. SS/DGE. Registro Nacional de Casos de SIDA. 2007;NOV
25. Babiker AG TP, K. Porter, A. S. Walker, J. H. Darbyshire. Age as determinant of survival in HIV infection. *J. Clin. Epidemiol* 2001;54:S16-S21
26. Lawn SD, s.t. Butera, T. M. Folks. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Microbiol* 2001;14:753-777
27. Paxton WA MS, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA. . Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures. *Nature Med* 1996;2:412-417
28. Paxton WA LR, Kamg S, Wu L, Gingeras TR, Landau NR, Mackay CR, Koup RA. Reduced HIV-1 infectibility of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of  $\beta$ -chemokines. *Virology* 1998;244:66-73
29. Ping An GWN, Lihua Wang, Sharyne Donfiel, James J. Goedert, John Phair, David Vlahov, Susan Buchbinder, William L. Farrar, William Modi, Stephen J. O'Brien, Cheryl A. Winkler. Modulator influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *PNAS* 2002;99:10002-10007
30. Hirbod T RC, Hasselrot K, Söderlund J, Kimani J, Bwayo JJ, Plummer F, Kaul R, Broliden K. . HIV-1 neutralizing activity is correlated with increased levels of chemokines in saliva of HIV-1-exposed uninfected individuals. *Curr HIV Res* 2008 6:28-33
31. McDermont DH BM, Kleeberger CA, Al-Sharif FM, Ollier WE, Simmerman PA, Boatman BA, Leitman SF, Detls R, Hajeer AH, Murphy PM. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 2000;14:2671-2678

32. Cocchi F DVA, Garzino-Demo A, *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the mayor HIV-suppressive factors produced by CD8+ t cells. *Science* 1995;270:1811-1815
33. Moriuchi H MM, Fauci AS. Nuclear factor-kappa B potently up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine theat blocks HIV infection. *J Immunol* 1997;158:3483-3491
34. Navratilova Z. Polymorphisms in CCL2 & CCL5 Chemokines/Chemokine Receptors Genes and Their Association with Diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olmouc Czech Repub* 2006;150:191-204
35. Vázquez Van Dyck M RMS, Vázquez Castellanos JL, Pandero Cerda A. . Predisposición genética y virus de la Hepatitis C crónica. *Investigación en Salud* 2005;7:26-32
36. Wang C SW, Lobashevky E, Wilson CM, Douglas SD, Mytilineos J *et al.* . Cytokine and chemokine gene polymorphisms among ethnically diverse North Americans with HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:446-454
37. Duggal P WC, An P, Yu XF, Farzadegan H, O'Brien SJ *et al.* The effect of RANTES chemokine genetic variants on early HIV-1 plasma RNA among African American injection drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38:584-589
38. Golo Ahlenstiel AI, Jacob Nattermann, Karin Bueren, Jürgen K Rockstroh, Hans H Frackmann, Bernd Kupfer, Olfert Landt, Amnon Peled, Tilman Sauerbruch, Ulrich Spengler, Rainer P Woitas. Distribution and effects of polymorphic RANTES gene alleles in HIV/HCV coinfection –A prospective cross-sectional study. *Worl J Gastroenterol* 2005;11:7631-7638
39. Ahlenstiel G Iq, Nattermann N, *et al.* . Role of RANTES gene polymorphisms in HIV infection is neutralized by HCV coinfection. *Conf Retrovir Opportunistic Infect*, 2004
40. Alkhatib G CC, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC, CCR5: a RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955-1958
41. Alkhatib G BC, Berger EA. Cell type-specific cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol* 1996;70:5487-5494
42. Deng HK LR, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhaart M, DiMarzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-666
43. Shehzad M *ea.* Elevated T Cell Counts and RANTES Expression in the Genital Mucosa of HIV-1Resistant Kenyan Commercial Sex Workers. *The Journal of I nfectious Diseases* 2005;192:728-38
44. VIH/SIDA SdSyCNplpycd. Reporte de Epidemiología del VIH/SIDA en México. Nov. 2007
45. VIH/SIDA SdSyCNplpycd. Reporte de Epidemiología del VIH/SIDA en México 2007
46. Cruz C H-TG, Silva A, Uribe ZP, Teran X, Del Rio CH.C STDs and HIV prevalence in Female Sex Workers (FSW) in Mexico City. XI International Conference on AIDS. México, D. F., México, 1996
47. Samson MF LF, Doranz BJ, *et al.* Resistáanse to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1998;382:722-725

48. Samson MF LG, Libert FF, *et al.* The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J Biol Chem* 1997;272:21934-21941.
49. Rana S BG, Cook D, *et al.* Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the  $\Delta$ CCR5 mutation. *J Virol* 1997;71:3219-3227
50. Venkatesan SF PA, Van Ryk DIF, *et al.* Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5 Delta 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration. *J Bio Chem* 2002;277:2287-2301
51. Samson M LF, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Sar S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyltermans G, Verhofsto, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382:722-725
52. Liu R PW, Choe Sea. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367-377
53. Connor RI PW, Sheridan KE, Koup RA. Macrophages and CD4+ T lymphocytes from two multiply exposed, uninfected individuals resist infection with primary non-syncytium-inducing isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1996;70:8758
54. Paxton WA MS, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter M, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med.* 1996;2:412-417
55. Schuitemaker H. KM, Kootstra NA., Derckesen MW, de Goede RE, van Steenwijk R., *et al.* Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytophagic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992;66:1354
56. Kupfer B KR, Brackmann HH, *et al.* Protection against parenteral HIV-1 infection by homozygous deletion in the C-C chemokine receptor 5 gene. *AIDS* 1999;13:1025-1028
57. Kuipers H WC, Dyer W, *et al.* An HIV-1-infected individual homozygous for the CCR5 D32 allele and the SDF-1 3 $\phi$ A allele. *AIDS.* 1999;13:433-434
58. Huang Y PW, Wolinsky SM, *et al.* The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disprogression. *Nat Med.* 1996;2:1240-1243
59. Balotta C BP, Violin M, *et al.* Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor in an HIV-1-infected patient. *AIDS* 1997;11:F67-F71
60. Wu L PW, Kassam N, *et al.* CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med.* 1997;185:1681-1692
61. Ansari-Lari MA LX, Metzker ML, Rut AR, Gibbs RA. The extent of genetic variation in the CCR5 gene. *Nat Genet* 1997;16:221-222
62. Woitas RP AG, Iwan AF, *et al.* Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1721-1728
63. Martinson JJ CN, Rees DC, Liu YT, Clegg J. Global distribution of the CCR5 gene 32-base pair deletion. *Nature Genet* 1997;16:100-103
64. Magierowska M LV, Boubnova L, Carcassi, Sami Djoulah DJ, El Chenawi F, Hallé NGL, Ivanova R, Jungerman M, Naumova, Petrany G, Sonnerborg A, Stavropoulos C, Thorsby E, Vu-Triene A, Debré P, Theodorou I, Charron D.

- Distribution of the CCRT gene 32 base pair deletion and SDF1-3'A variant in healthy individuals from different populations. *Immunogenetics* 1998;48:417-419
65. Zimmerman PA B-WA, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, Vaccarezza M, Kennedy PE, Kumaraswami V, Giorgi JV, Detels R, Hunter J, Chopek M, Berger EA, Fauci AS, Nutman TB, Murphy PM. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997;3:23-36
  66. Marquet S SF, Arias M, *et al.* Variants of the human NRAMP1 gene and altered immunodeficiency virus infection susceptibility. *J Infect. Disease* 1999;180:1521-1525
  67. Dean M CM, Winkler C, *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science* 1996;273:1856-1862
  68. Weisgraber KH RS, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo  $\epsilon$  isoforms. *Biol Chem* 1981;256:9077-9083
  69. Deary IJ WM, Pattie A, Starr JM, Hayward C, Wright AF, Carothers A, Whalley LJ. Cognition y el cambio  $\epsilon$  alelo APOE. *Nature* 2002;418
  70. Hanis CL H-ED, Douglas TC, *et al.* Effects of the apolipoprotein E polymorphism on levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins among Mexican-Americans in Starr County, Texas. *Arterioscler Thromb* 1991;11:362-370
  71. Siest G PT, Régis-Bailly A, *et al.* Apolipoprotein  $\epsilon$ : an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995;41:1068-1086
  72. Kamboh MI SB, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins VI. Common polymorphism of apolipoprotein  $\epsilon$  in blacks. *Dis Markers* 1989;7:49-55
  73. Howard BV GS, Lui K. Association of apolipoprotein  $\epsilon$  phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults: the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Am J Epidemiol* 1998;148:859-868
  74. Kataoka S RD, Cowan LD, *et al.* Apolipoprotein  $\epsilon$  polymorphism in American Indians and its relation to plasma lipoproteins and diabetes: the Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:918-925
  75. Schaefer EJ L-FS, Johnson S, *et al.* Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein  $\epsilon$  phenotype with plasma lipoprotein levels: results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:1105-1113
  76. Assman G SG, Menzel HJ. Apolipoprotein  $\epsilon$  polymorphism and hyperlipidemia. *Clin Chem* 1984;30:641-643
  77. Lehtimäki T MT, Viikari J, *et al.* Apolipoprotein  $\epsilon$  phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *J Lipid Res* 1990;31:487-495
  78. Evans AE ZW, Moreel JFR, *et al.* Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy Chinese men. *Hum Genet* 1993;92:191-197
  79. Eto M WK, Makino I. Increased frequencies of apolipoprotein  $\epsilon$ 2 and  $\epsilon$ 4 alleles in patients with ischemic heart disease. *Clin Genet* 1989;36:183-188
  80. Hennig BJ HS, Frodsham AJ, *et al.* Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. *Genes Immun* 2002;3:359-367



81. Shi SF PS, Tu HF, Taylor DR, *et al.* Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292:198-210
82. Shi SF LM. Hepatitis C viral RNA: challenges and promises. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58:1276-1295
83. Wozniak MA IR, Faragher EB, *et al.* Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology* 2002;36:456-463
84. Itzhaki RF LW, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type I in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 1997;349:241-244
85. Lynch JR TW, Wang H, *et al.* APO E genotype and an ApoE mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J Biol Chem* 2003;278:48529-48533
86. Burgos JS RC, Sastre I, Alfaro JM, Valdivieso F. ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport* 2003;14:1825-1827
87. Lins L T-SA, Pillot T, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Brasseur R. Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's beta-amyloid peptide and apolipoprotein E alpha-helices. *J Neurochem* 1999;73:758-769
88. Rivas-Estilla Ana M R-VE, Martínez-Hernández Ramón, Charles-Niño Claudia, Ramírez-Camacho Ericka, Rositas-Noriega Felix, Garza-rodriguez Maria L., Barrera-Saldaña Hugo A, Trujillo-Murillo Karina, Ramos-Jimenez Javier. Hepatitis C virus infection among HIV-1 infected individuals from northern Mexico. *Hepatology Research* 2007;37:311-316
89. Burth TD *et al.* Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APO e4/e4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105
90. Corder EH PR, Giunta S, Franceschi C. Differential course of HIV-1 infection and APOE polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8718-8723
91. Sambrook J RD. *Molecular Cloning a Laboratory Manual.* . 2002;1
92. Ausubel FM BR, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. . *Short Protocols in Molecular Biology.* 2002. Fifth Edition. Editorial Board. 2002;1
93. Yamada M KS, Yoshioka K, Higashi Y, Tanaka K, Ishikawa Takayanagi M. . Hepatitis C virus genotypes are not responsible for development of serious liver disease. *Dis Dis Sci.* 1994;39:234-239
94. Ausubel FM BR, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. . *Short Protocols in Molecular Biology.* 2002;1
95. Woitas RP AG, Iwan AF, *et al.* Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122
96. Wenham PR PW, Blandell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet* 1991;337:1158-1159
97. Carreto-Vélez M.A. C-BT, Martínez-Magdaleno A. . Seroprevalence of HBV, HCV, and HIV, among blood donors in Irapuato, Mexico. *Salud Públ. Méx.* 2003;45:S690-S693
98. Ladrón-DE Guevara L. GN, Vázquez-Cantarell M., García-Méndez S., Di Silvio M. Prevalence of and risk factors for hepatitis C in blood donors. *Rev. Gastroent Méx.* 2002;67:11-16
99. González-García JJ MB, Hernández S, Pacheco R, Diz S, García P, Esteban H, Arribas JR, Quereda C, Rubio R, Diez J, Moreno S, Vázquez-Rodríguez JJ. Prevalences of hepatitis virus coinfection and indications for chronic hepatitis C

virus treatment and liver transplantation in Spanish HIV-infected patients. The GESIDA 29/02 and FIPSE 12185/01 Multicenter Study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:340-348

100. Liu HI, Chao, D., Nakayama, E.E., Taguchi, H., Goto, M., Xin, X., Takamatsu, J.K., Saito, H., Ishikawa, Y., Akaza, T. *et al.* Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1999;96:4581

101. Ramalingam S KR, Abraham O.C., Subramanian S, Rupali P, Pulimood S.A., Jesudason M.V., Sridharan G. Chemokine profile among human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infected individuals from southern India. *Indian J Med Res* 2008;127:133-139

102. Hanis CL H-ED, Douglas TC, *et al.* . Effects of the apolipoprotein E polymorphism on levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins among Mexican-Americans in Starr County, Texas. *Arterioscler Thromb* 1991;11:362-70.

103. Kamboh MI SB, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins VI. Common polymorphism of apolipoprotein  $\epsilon$  in blacks. *Dis Markers* 1989;7:49-55.

104. Howard BV GS, Lui K. . Association of apolipoprotein  $\epsilon$  phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults: the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults Am J Epidemiol* 1998;148:859-868

105. Kataoka S RD, Cowan LD, *et al.* 4. Kataoka S, Robbins DC, Cowan LD, *et al.* Apolipoprotein  $\epsilon$  polymorphism in American Indians and its relation to plasma lipoproteins and diabetes: the Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:918-25. . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:918-925

106. Schaefer EJ L-FS, Johnson S, *et al.* Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein  $\epsilon$  phenotype with plasma lipoprotein levels: results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:1105-1113

107. Assman G SG, Menzel HJ. . Apolipoprotein  $\epsilon$  polymorphism and hyperlipidemia *Clin Chem* 1984;30:641-643

108. Lehtimäki T MT, Viikari J, *et al.* Apolipoprotein  $\epsilon$  phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study *J Lipid Res* 1990;31:487-495

109. Luc G BJ, Arveiler D, *et al.* Impact of apolipoprotein  $\epsilon$  polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction: the ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1412-1419

110. Cattin L FM, Tonizzo M, *et al.* Polymorphism of the apolipoprotein  $\epsilon$  gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:91-94

111. Evans AE ZW, Moreel JFR, *et al.* Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy Chinese men. *Hum Genet* 1993;92:191-197

112. Eto M WK, Makino I. Increased frequencies of apolipoprotein  $\epsilon$ 2 and  $\epsilon$ 4 alleles in patients with ischemic heart disease. *Clin Genet* 1989;36:183-188

113. Siest G PT, Regis-Bailly A, *et al.* Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995;41:1068-1086

114. Riddell DR ZH, Atchison K, Warwick HK, Atkinson PJ, Jefferson J, Xu L, Aschmies S, Kirksey Y, Hu Y, Wagner E, Parratt A, Xu J, Li Z, Zaleska MM, Jacobsen JS, Pangalos MM, Reinhart PH. Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism of brain Apo E levels. *J Neurosci* 2008;28:11445-11453

115. Hsueh WC MB, Hixson JE, Rainwater DL. Effects of the Apo E polymorphism on plasma lipoproteins in Mexican Americans. *Ann Epidemiol* 2000;10:524-531
116. Anuurad E LG, Rubin J, Pearson TA, Berglund L. Apo E genotype affects allele-specific apo[a] levels for large apo[a] sizes in African Americans: the Harlem-Basset Study. *J Lipid Res* 2007;48:693-698