

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**

**VICE-RECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**

**Estudio de Polimorfismos Genéticos en SDF1, CCR5, CCR2; y su Relación a  
Progresión en un Grupo de Sujetos Infeccionados con VIH-1**

**POR**

**YAMITZEL ZALDÍVAR ÁBREGO**

**8-703-2030**

**Como requisito para optar por el título de maestría en Ciencias Biológicas  
con especialización en Genética y Biología Molecular.**

**PANAMÁ, FEBRERO 2013**



Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología  
Programa de Maestría en Ciencias Biológicas, opción Genética y Biología Molecular

**TESIS**

Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas, opción Genética y Biología Molecular.

La estudiante: Yamitzel Zaldívar Ábrego Cédula N° 8-703-2030.

Título de la Tesis:

**“Estudio de Polimorfismos Genéticos en SDF1, CCR5, CCR2; y su Relación a Progresión en un Grupo de Sujetos Infectados con VIH-1”**

APROBADO POR:



---

**Doctor Juan Pascale,  
Presidente**



---

**Doctora Magaly de Chial,  
Miembro**



---

**Doctora Evelia Quirós,  
Miembro**

REFRENDADO POR:



---

**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA  
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

ECHA: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabajo de tesis a mi familia, mi madre, **Evangelina Ábrego de Zaldivar**, que con amor y consejo me enseñado a perseverar en mis propósitos; a mi padre, **Jorge Zaldivar**, amigo y consejero; a mis hermanos, **Jorge e Itzel**; y a mis dos sobrinos, **Alanis y Jorge Andrés**.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo.

Al Dr. Juan M. Pascale por aceptarme como director de tesis y sus acertados consejos. A mis compañeros de trabajo, en especial a Elizabeth Chia y Migdalis Ortega por su apoyo en todo momento.

A la Dra. Dora Estripeaut por su total colaboración estrecha en este estudio.

A todos mis profesores de post-grado por sus enseñanzas, pilares bases de mi formación académica.

A mi muy estimado profesor Basilio Gómez (q.e.p.d), quien me enseñó las bases de la inmunología y biología molecular.

A Cristian Bautista por sus acertados consejos en bio-estadística y a Phillipe Simon por su ayuda en la obtención de información.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas y Hospital del Niño, por su apoyo institucional para la ejecución y finalización de este trabajo.

A todos las personas que me apoyaron de una forma directa o indirecta a lograr que finalmente culminara ésta etapa de mi vida profesional.

## ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
Introducción .....	2
<b>Capítulo I .....</b>	<b>4</b>
Generalidades del VIH .....	5
I.    Taxonomía .....	5
II.   Genoma y proteínas virales del VIH.....	7
A.  Genoma .....	7
B.  Proteínas virales y sus principales funciones .....	9
1.  Proteínas estructurales .....	9
2.  Proteínas reguladoras .....	16
3.  Proteínas accesorias .....	18
III.  Estructura del VIH .....	21
A.  Envoltura viral .....	21
B.  Nucleocápside viral .....	22
IV.  Orígenes y diversidad .....	23
V.   Clasificación y epidemiología molecular del VIH .....	26
VI.  Ciclo de replicación del VIH-1 .....	30
VII. Domicilio celular del VIH .....	36
VIII. Mecanismo de transmisión .....	39
<b>Capítulo II .....</b>	<b>41</b>
Factores genéticos del hospedero .....	42
I.    Correceptores del VIH .....	43
A.  El rol de los correceptores .....	43
B.  Inhibición de la infección del VIH por ligandos de correceptores .....	46
C.  Fisiopatología del CXCR4 y CCR5 .....	48
II.  Variabilidad genética de receptores de quimiocina y su influencia en la susceptibilidad a la infección del VIH y SIDA .....	50
A.  La mutación delta 32 del CCR5 .....	50
B.  CCR2-64I .....	56
C.  La organización del gen CCR5 y las variantes de su promotor ...	57
D.  La variante SDF1-3' .....	62

<b>Capítulo III .....</b>	<b>64</b>
Diseño de la investigación .....	65
I. Objetivo general .....	65
II. Objetivos específicos .....	65
III. Hipótesis de trabajo .....	65
IV. Justificación .....	66
V. Metodología .....	67
A. Tipo de estudio .....	67
B. Universo de estudio .....	67
C. Sujetos de estudio .....	67
D. Consideraciones éticas .....	68
E. Colección de sangre y procesamiento .....	69
F. Conteo de CD <sub>4</sub> y estimación de la carga viral .....	69
G. Extracción de DNA y genotipificación .....	69
H. Amplificación, corte enzimático, detección y secuenciación .....	71
I. Análisis estadístico .....	72
<b>Capítulo IV .....</b>	<b>74</b>
I. Resultados .....	75
<b>Capítulo V .....</b>	<b>99</b>
I. Discusión .....	100
<b>Conclusiones .....</b>	<b>110</b>
<b>Recomendaciones .....</b>	<b>112</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>114</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>122</b>
1. Sistema de clasificación CDC para niños menores de 13 años de edad infectados con VIH-1 .....	123

2. Sistema de clasificación CDC para infectados con VIH revisado en 1993	
.....	124
3. Carta de aprobación del comité de bioética .....	125

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla #1.</b> Taxonomía del VIH.....	6
<b>Tabla #2.</b> Genes y proteínas del VIH, además de sus funciones sumariadas.....	8
<b>Tabla #3.</b> Clasificación filogenética del VIH-1.....	27
<b>Tabla #4.</b> Características demográficas y clínicas de la población de estudio.....	75
<b>Tabla #5.</b> Frecuencia del polimorfismo delta 32 del gen CCR5 en sujetos infectados perinatalmente.....	77
<b>Tabla #6.</b> Frecuencia del polimorfismo en el gen CCR2 en sujetos infectados con VIH perinatalmente.....	78
<b>Tabla #7.</b> Frecuencia del polimorfismo en la región del promotor del gen CCR5, CCR5-59029, en sujetos infectados perinatalmente.....	80
<b>Tabla #8.</b> Frecuencia del polimorfismo en el gen SDF en sujetos infectados perinatalmente.....	82
<b>Tabla #9.</b> Resultados de la regresión de Cox CCR5-59029.....	86
<b>Tabla #10.</b> Resultado de la regresión de Cox SDF1.....	87
<b>Tabla #11.</b> Frecuencia del polimorfismo delta 32 del gen CCR5 en adultos positivos.....	96
<b>Tabla #12.</b> Frecuencia del polimorfismo CCR5-59029 en el promotor CCR5 en adultos VIH positivos.....	96
<b>Tabla #13.</b> Frecuencia del polimorfismo CCR2-64I en adultos VIH positivos.....	97
<b>Tabla #14.</b> Frecuencias del polimorfismo SDF1 en adultos VIH positivos.....	98



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura #1.</b> Genoma del VIH-1.....	7
<b>Figura #2.</b> Representación de la organización del genoma y virión del VIH.....	9
<b>Figura #3.</b> Genes estructurales y sus principales proteínas.....	10
<b>Figura #4.</b> Representación de la estructura del VIH-1.....	21
<b>Figura #5.</b> Árbol filogenético mostrando los cuatro grupos del VIH-1.....	24
<b>Figura #6.</b> Chimpancé huérfano.....	25
<b>Figura #7.</b> Distribución global de los subtipos y formas recombinantes del VIH1.....	26
<b>Figura #8.</b> Entrada esquemática del VIH-1.....	31
<b>Figura #9.</b> Esquema del ciclo replicativo del VIH-1.....	35
<b>Figura #10.</b> Diagrama del receptor de quimiocina.....	45
<b>Figura #11.</b> Secuencia y topología del receptor CXCR4.....	45
<b>Figura #12.</b> Uso del correceptor y tropismo del VIH-1.....	46
<b>Figura #13.</b> Representación diagramática de la unión del VIH-1 a los correceptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 expresado sobre la célula T CD <sub>4</sub> .....	47
<b>Figura #14.</b> Diagrama de la molécula llave de la membrana.....	51
<b>Figura #15.</b> Organización de los haplotipos CCR2 y CCR5 sobre el cromosoma 3p21 y su asociación con la progresión de la enfermedad.....	59
<b>Figura #16.</b> Imagen de una corrida electroforética en un gel de agarosa para el polimorfismo CCR5 delta 32.....	76
<b>Figura #17.</b> Imagen de una corrida electroforética en un gel de agarosa para el polimorfismo en CCR2.....	78
<b>Figura #18.</b> Imagen de una corrida electroforética en un gel de agarosa para el polimorfismo CCR5-59029.....	79
<b>Figura #19.</b> Imagen de una corrida electroforética en un gel de agarosa para el polimorfismo SDF1.....	81
<b>Figura #20.</b> Curva de progresión a muerte, según presencia de mutación CCR5-59029G en ambos alelos.....	83

<b>Figura #21.</b> Curva de progresión a muerte, según presencia de la mutación SDF1 en uno de los alelos en sujetos mayores de 5 y menores de 13 años.....	84
<b>Figura #22.</b> Regresión de Cox para el polimorfismo en la región del promotor CCR5-59029.....	85
<b>Figura #23.</b> Regresión de Cox para el polimorfismo SDF1.....	86
<b>Figura #24.</b> Gráfica que muestra la correlación del número de CD <sub>4</sub> vs los polimorfismos en CCR5-59029.....	87
<b>Figura #25.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el conteo de CD <sub>4</sub> total vs el polimorfismo en el promotor de CCR5.....	88
<b>Figura #26.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el conteo de CD <sub>4</sub> total vs el polimorfismo en SDF1.....	89
<b>Figura #27.</b> Gráfica que muestra la correlación del polimorfismo en CCR5-59029 vs la edad de los sujetos.....	90
<b>Figura #28.</b> Prueba de Mann-Whitney, donde se compara el conteo de los linfocitos T CD <sub>4</sub> durante el tratamiento en los sujetos ccr5-59029G.....	91
<b>Figura #29.</b> Prueba de Mann-Whitney, donde se compara el conteo de los linfocitos T CD <sub>4</sub> durante el tratamiento en los sujetos CCR5-59029A.....	91
<b>Figura #30.</b> Prueba de Mann-Whitney, donde se compara la carga viral durante el tratamiento en sujetos con el polimorfismo CCR5-59029G.....	92
<b>Figura #31.</b> Prueba de Mann-Whitney, donde se compara carga viral durante el tratamiento en sujetos con el alelo CCR5-59029A.....	93
<b>Figura #32.</b> Prueba de Mann-Whitney, donde se compara la carga viral durante el tratamiento en sujetos con el polimorfismo SDF1-3'G.....	94
<b>Figura #33.</b> Prueba de Mann-Whitney, donde se compara la carga viral durante el tratamiento en sujetos con el polimorfismo SDF1-3'G.....	94

## **ABREVIATURAS**

VIH-1 = Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1

SIDA = Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR-RFLP = Reacción en Cadena de la Polimerasa – Polimorfismo de Fragmentos Largos de Restricción

TARV = Tratamiento Antirretroviral

HTLV = Virus Linfotrópico T Humano

VIH-2 = Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 2

LTR = Secuencias Repetitivas Largas

RNA<sub>m</sub> = RNA mensajero

KD = KiloDaltons

MA = Matriz

CA = Cápside

NC = Nucleocápside

PR = Proteasa

TR = Transcriptasa Reversa

IN = Integrasa

CPI = Complejo de Preintegración

Env = Glicoproteína de Envoltura

HR1 = Hélice N

HR2 = Hélice C

CTD = Dominio Carboxiterminal

RRE = Elemento de Respuesta Rev

CMH o MHC = Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CTL = Células T Citotóxicas

SIV = Virus de Inmunodeficiencia Simiano

CFR = Formas Recombinantes Circulantes

UFR = Formas Recombinantes Únicas

UDI = Usuarios de Drogas Intravenosas

DC-SIGN = Lectina de Superficie Celular Especifica

7M = Siete Dominios Transmembranosos

GTP = Trifosfato de guanosina

GDP = Difosfato de Guanosina

NSI = No Inductora de Sincicio

M= Macrófagos

SI = Inductora de Sincitio

MIP = Proteína Inflamatoria de Macrófagos

SNC = Sistema Nervioso Central

WNV = Virus del Nilo Occidental

SNP = Polimorfismos de Nucleótidos Únicos

Wt = Tipo Salvaje

MPM = Marcador de Peso Molecular

## RESUMEN

Las mutaciones en las quimiocinas y sus receptores; SDF1, CCR2 y CCR5 han sido identificados y asociados con resistencia a la infección del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y retardo de la progresión al síndrome de inmunodeficiencia (SIDA) o muerte. Los datos de poblaciones con mezclas de etnias tales como la población panameña son muy escasos. El propósito de este estudio fue determinar la frecuencia de los polimorfismos en SDF1, CCR5 y CCR2 en individuos panameños infectados perinatalmente y su asociación con progresión a muerte. Además de determinar la frecuencia de los polimorfismos en SDF1, CCR5 y CCR2 en sujetos adultos infectados con VIH-1.

Muestras de sangre de 74 sujetos infectados perinatalmente con VIH-1 y 223 adultos infectados con VIH-1 fueron obtenidas y evaluadas para las mutaciones CCR5 delta ( $\Delta$ ) 32 en el gen de CCR5, CCR5-59029 en la región del promotor de CCR5, CCR2-V64I, y en el gen SDF1-3'A utilizando PCR y PCR-RFLP.

Los sujetos infectados perinatalmente que presentaron el polimorfismo CCR5-59029G mostraron una progresión lenta a muerte y una mejor recuperación de los niveles de linfocitos T CD4. Los sujetos con el polimorfismo SDF1-3'A entre las edades de 5 a 12 años mostraron una progresión lenta a muerte y una disminución estadísticamente significativa de la carga viral del VIH-1 después del tratamiento con TARV. Los análisis estadísticos no mostraron ninguna asociación con la progresión a SIDA o muerte.

Este es el primer estudio que se realiza en Centroamérica en busca de asociación entre factores genéticos del hospedero y progresión a SIDA y muerte en sujetos infectados con VIH-1 perinatalmente. Como se esperaba, la frecuencia del alelo  $\Delta$ 32 entre nuestra población de estudio fue marcadamente bajo comparado a frecuencias reportadas en caucásicos. El polimorfismo CCR5-59029G fue relacionado a progresión lenta a SIDA y muerte en individuos infectados perinatalmente con VIH-1, su detección puede aportar información en la evolución clínica en estos sujetos y apoyar en las decisiones terapéuticas.

## INTRODUCCIÓN

El presente trabajo responde a la necesidad de conocer si los factores genéticos pueden ejercer algún impacto en la sobrevida de los pacientes viviendo con VIH/SIDA. Se han investigado ciertas mutaciones en regiones promotoras o codificantes de quimiocinas y sus ligandos, que son responsables de una mayor sobrevida en aquellos individuos infectados con el virus que conduce a SIDA. Desde la década de los 80, cuando aparecen los primeros casos de pacientes presentando signos evidentes de desgaste o inmunodeficiencia se iniciaron las investigaciones, primero para conocer el agente causal y una vez descubierto conocer más del ciclo de vida de este minúsculo pero letal virus. Así se inicia una extensa y profunda investigación en el mundo entero, del virus, que revolucionaría todos los conceptos de bioseguridad en los hospitales y bancos de sangre en forma global. El virus que ha provocado marchas y hasta tener un día para que todos los líderes mundiales se reúnan y discutan las estrategias a seguir para hacer frente a esta pandemia, es el VIH. Este virus pertenece a los retrovirus que necesita de ciertas moléculas proteicas para invadir las células donde se multiplicaran para luego salir de ellas e invadir a otras células susceptibles en el organismo. Está bien estudiado el rol que las células del sistema inmune juegan en la proliferación del virus dentro del ser humano al expresar en la membrana citoplasmática proteínas que interaccionan con las proteínas virales. Estas proteínas son el blanco de una gran variedad de estudios siendo este, además, uno de mis objetivos. A mediados de 1996, Liu et al. publicó que en la sociedad humana existen individuos que no expresan unas de las proteínas de membrana necesarias para que la interacción virus – célula se ejecute.

Para que la entrada del virus se dé, es necesario la unión de las proteínas virales a un receptor de membrana llamado CD4, luego esta unión desencadena un cambio conformacional de las proteínas virales permitiendo la interacción de otra proteína viral con un correceptor de membrana. El CCR5 fue la proteína que no era expresada en ciertos individuos de la población, en especial descendientes del Norte de Europa. Además de no expresar la proteína en mención, se descubrió que el VIH no puede penetrar a las células si este no está presente en la membrana de las células siendo estos individuos resistentes a la infección del VIH. Después de este descubrimiento se ha seguido estudiando la relación del VIH con otros correceptores y desarrollando investigaciones para conocer el mecanismo y todos los componentes usados para la entrada del virus a las células. Por ello, es importante conocer todos estos mecanismos ya que en 2005, Fätkenheuer et al. publicaron la estrategia de bloqueo del CCR5 como terapia antirretroviral buenos resultados en pacientes con cepas virales con tropismo hacia esta proteína. Científicos de diferentes latitudes han estado estudiando otros receptores y ligandos, y en nuestros países se han iniciado múltiples estudios para conocer la prevalencia de estos polimorfismos en la población latinoamericana. En Panamá, desde el 2001 estamos estudiando la frecuencia de ciertos polimorfismos en estas proteínas tanto de población control como en pacientes viviendo con VIH/SIDA. Lo interesante es que conoceremos nuestra herencia en cuanto a estos polimorfismos y otros no estudiados hasta el momento en pacientes panameños VIH+, también analizaremos si tienen alguna relación con el estado viral e inmunológico de estos pacientes, siendo esto último por primera vez investigado en nuestro país.

# **CAPÍTULO I**



## GENERALIDADES DEL VIH

### I. TAXONOMÍA

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia de los *Retrovirus*, al género de los *Lentivirus*, se subdivide en tipo 1 y 2 y sus huéspedes naturales son los vertebrados que produce infección crónica en el hospedero y gradualmente daño al sistema inmune del huésped (1, 3, 5, 6).

La familia de los *Retrovirus* es un grupo de virus RNA de cadena o hebra sencilla cuyas relaciones genéticas se establecen a partir de la composición de los aminoácidos de la enzima transcriptasa reversa, de la secuencia de los genes *gag* y *env* (6). Por el momento, se conocen siete subfamilias: los *Alfaretrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus*, y *Espumaretrovirus*. Los *Deltaretrovirus*, también llamados *Oncovirus*, están asociados a las leucemias de las células T y a las leucemias de células peludas (HTLV-1 y HTLV-2) y los *Lentivirus* al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Hasta 1987, el VIH estaba clasificado en la subfamilia de los *Oncovirus* y se denominaba HTLV-III (6).

Los *Lentivirus* son asociados con enfermedades crónicas del sistema hematológico y nervioso en animales y hombre (20). Tres principales tipos de *Lentivirus* que han sido caracterizados en primates son: el virus de inmunodeficiencia del simio (SIV, de sus siglas en inglés) y entre humanos, los dos tipos relacionados estrechamente, el VIH-1, el tipo predominante en el mundo, y el VIH-2 endémico de África Occidental, pero que se ha extendido a Europa (especialmente Portugal), Suramérica y la India (1, 3, 4, 6). Además, existen otros géneros de *Lentivirus* que infectan equinos, caprinos, y bovinos (6).

Los genomas de los *Lentivirus* son complejos, codificando un número de proteínas reguladoras y accesorias no encontradas en otros *Retrovirus* (20). Todos los *Retrovirus* expresan tres genes, *gag*, *pol*, y *env*, los cuales codifican las proteínas estructurales así

como las enzimas requeridas para la replicación del virus. Sin embargo, los *Lentivirus* contienen genes adicionales que son esenciales o contribuyen con la persistencia y eficiencia de la replicación viral. El *Lentivirus* prototipo, VIH-1, codifica seis genes adicionales (*tat*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *nef*). El VIH-2 y el SIV pierden el gen *vpu*, pero contienen un gen llamado *vpx*. Los *Lentivirus* no primates contienen poco de estos genes extras, pero todos contienen los genes *tat*, y *nev*, los cuales son genes de expresión viral responsables de la activación transcripcional y post-transcripcional (1, 6, 20).

Tabla #1. Taxonomía del VIH.

<b>Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)</b>
Grupo: Grupo VI (ssRNA-TR)
Familia: <i>Retroviridae</i>
Género: <i>Lentivirus</i>
Especies: VIH-1, VIH-2

## II. GENOMA Y PROTEÍNAS VIRALES DEL VIH-1

### A. Genoma

El genoma del VIH-1 consiste de dos moléculas de RNA, de polaridad positiva, idénticas de una sola cadena, de 9.213 Kb (18) dentro del virión, mientras la forma persistente del genoma del VIH-1 es una cadena de DNA proviral doble dentro de las células infectadas (4, 7,14, 20). El VIH, como otros retrovirus, contiene 3 genes estructurales, y 2 genes reguladores; incluyendo, 4 genes accesorios (4, 7, 14, 17, 20). El RNA del VIH está flanqueado por dos secuencias redundantes (R) cortas, en ambos extremos. Estas son adyacentes a secuencias únicas, U5 y U3, encontradas en los extremos 5' y 3', respectivamente. La característica que define a un *Retrovirus* es su habilidad de convertir su RNA genómico a un DNA intermedio a través de la transcriptasa reversa codificada por el virus. Una reacción subsecuente catalizada por otra enzima viral, integrasa, resulta en la integración de esta molécula de DNA dentro del DNA del hospedero. La integración genómica es casi al azar, ocurriendo preferiblemente en sitios activos transcripcionalmente (17, 19, 20).

Una importante modificación como resultado de la transcripción reversa e integración es la duplicación de las secuencias U5 y U3, de modo tal que el provirus ahora contiene U3 – R – U5 en ambos extremos. Estas secuencias que flanquean al provirus son designadas secuencias repetitivas largas (LTR). Los LTR permiten la integración al genoma celular y allí se encuentran los elementos reguladores iniciales de la transcripción viral (Figura #1) (4, 14, 15, 16, 17, 19, 20).

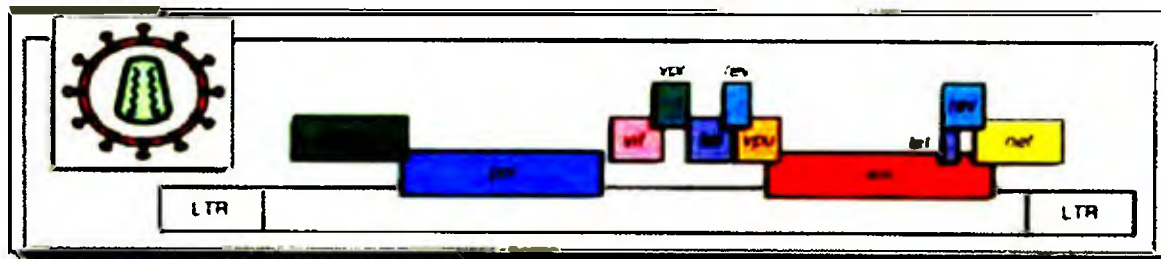


Figura #1. Genoma del VIH-1. Se observa la división del genoma en los diferentes genes que forman parte del material genético viral del VIH-1. Adaptado de Janeway, *et al.*, 2001

En la tabla #2 muestra los nombres de los 9 genes del VIH y sus funciones resumidas.

**Tabla #2. Genes y proteínas del VIH, además de sus funciones sumariadas (4, 14,15, 17)**

Gen	Proteína	Función
<i>LTR</i>		Integración del DNA viral dentro del genoma de la célula del hospedero, Sitio de unión para los factores de transcripción del hospedero
<i>Env</i>	Gp160 SU/gp120 TM/gp41	Poliproteína precursora Proteína de la envoltura viral Interacción con el receptor CD4 y correceptores CCR5 y CXCR Fusión de membranas (fusión e internalización)
<i>gag</i>	p55 CA/p24 MA/p17 NC/p7 p6	Poliproteína precursora Proteína de la nucleocápside Proteína de la matriz Proteína de la nucleocápside Ribonucleoproteína Ribonucleoproteína. Encapsidación viral
<i>Pol</i>	Transcriptasa reversa/p66/p51, TR Integrasa/p31, IN Proteasa/p11, PR	Retrotranscripción Actividad ARNasa H Media la inserción del DNA proviral del VIH. Integración Procesamiento pos-transduccional de las poliproteínas gag y gag-pol
<i>Tat</i>	Tat	Elongador del ARN mensajero Transactivador Inducción de apoptosis
<i>Rev</i>	Rev	Regulador del transporte y el procesamiento del ARN mensajero Permite la exportación de transcritos no empalmados y empalmados parcialmente del núcleo
<i>Nef</i>	Nef	Incremento de la retrotranscripción (replicación viral) <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Regulación negativa de CD4 y HLA clase I Inducción de apoptosis en linfocitos T citotóxicos (LTC)
<i>Vif</i>	Vif	Aumenta la infectividad viral Interacción con APOBEC3G
<i>Vpr</i>	Vpr	Transactivador viral Transporte del complejo de preintegración al núcleo Aumenta la producción de virones Detención del ciclo celular. Inducción de apoptosis
<i>Vpu</i>	Vpu	Secuestro de CD4 en el retículo endoplasmático Aumenta la generación y liberación de virones desde la membrana celular

## B. Proteínas Virales y sus Principales Funciones

Las proteínas del VIH-1 son divididas dentro de tres clases:

- ✕ Proteínas estructurales: Gag, Pol, y Env
- ✕ Proteínas reguladoras: Tat, y Rev
- ✕ Proteínas accesorias o auxiliares: Vpu, Vpr, Vif, y Nef (16, 17)

En la tabla #2 encontrará las proteínas del VIH con sus funciones resumidas.

### 1. Proteínas Estructurales

#### 1.1 Gag

El gen *gag* (Figura # 2) da origen a la proteína precursora Gag de 55 kilodaltons (KD), también llamada p55, la cual es expresada desde el RNA mensajero (RNAm) viral no empalmado. Al momento de la traducción, p55 es miristilada en su extremo amino (Figura #2), provocando su unión con el lado citoplasmático de la membrana celular. La p55 asociada a membrana recluta dos copias del RNA genómico viral junto con otras proteínas celulares y virales que desencadenan el brote de la partícula viral desde la superficie de una célula infectada. Después del brote de la partícula viral, la p55 es

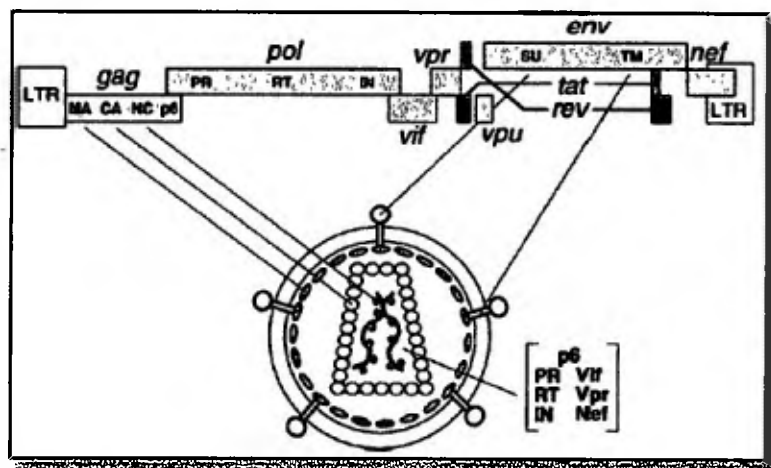


Figura #2 Representación de la organización del genoma y virión del VIH Adaptado de Frankel, *et al.*, 1998.

dividida por la proteasa viral (producto del gen *pol*) durante el proceso de maduración viral en cuatro proteínas más pequeñas matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC), y p6 (16). Dos péptidos espaciadores, p2 y p1, son también generados de la división de la p55 (Figura #3) (17).

#### MA

La mayoría de las moléculas de MA permanecen unidas a la superficie interna de la bicapa lipídica del virión, estabilizando la partícula (Figura #2). Un subconjunto de MA es reclutado dentro de la capa más profunda del virión donde lleva parte del complejo el cual escolta el DNA viral al núcleo. Estas moléculas MA facilitan el transporte nuclear del genoma viral porque una señal cariofílica (afín al núcleo) sobre MA es reconocida por la maquinaria nuclear celular importada. Este fenómeno permite al VIH infectar células sin división, una propiedad inusual para un retrovirus (16).

#### CA

CA forma el centro cónico de partículas virales (Figura #2). La ciclofilina A ha demostrado interactuar con la región p24 de p55 conduciendo a su incorporación dentro de las partículas virales. La interacción entre Gag y la ciclofilina A es esencial porque la interrupción de esta interacción por ciclosporina A inhibe la replicación viral.

#### NC

La región NC del Gag es responsable reconociendo específicamente la señal de empaquetamiento de VIH. La señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ) consiste de cuatro estructuras de loop con tallo localizado cerca del extremo 5' del RNA viral, y es suficiente para mediar la incorporación de un RNA heterólogo dentro de los viriones (Figura #3). NC une a la señal de empaquetamiento a través de interacciones mediadas por motivos de dos anillos de zinc. NC también facilita la transcripción reversa (16).

## p6

La región polipeptídica p6 media las interacciones entre p55 y la proteína accesoria Vpr, conduciendo a la incorporación de Vpr dentro de los viriones ensamblados. La región p6 también contiene un dominio tardío así llamado el cual es requerido para la liberación eficiente de los brotes de viriones desde una célula infectada (Figura #3) (12, 16, 17).

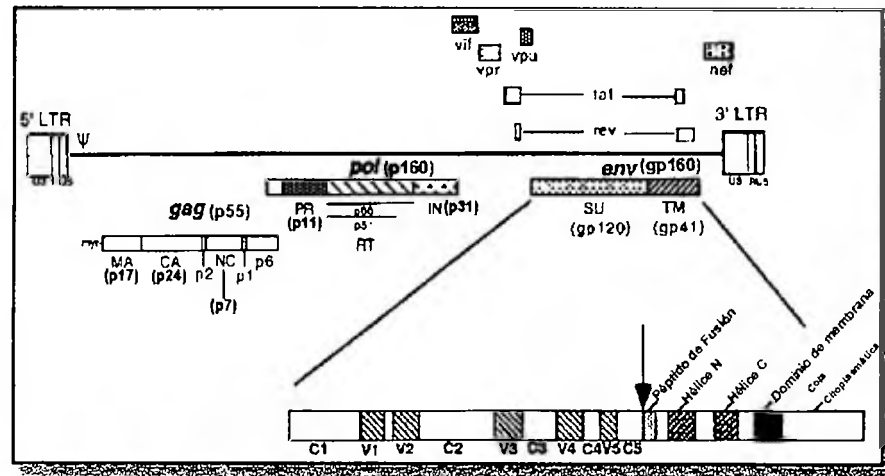


Figura #3 Genes estructurales y sus principales proteínas.  $\Psi$  indica posición de la señal de empaquetamiento del RNA. El sitio de minitilación N terminal de Gag es indicado como "myr". Adaptado de Freed, *et al.*, 2001.

La mayoría de los retrovirus codifican secuencias específicas que promueve la liberación de las partículas virales. Estas secuencias son conocidas colectivamente como dominio tardío o "L" para hacer hincapié en su papel tardío en el ensamblaje de virus. Los retrovirus codifican sus dominios L en una variedad de posiciones en Gag, en el caso del VIH-1, el dominio L está presente en p6. Deleciones de p6, o mutaciones dentro de un motivo Pro-Thr/ Ser-Ala-Pro altamente conservado localizado cerca del extremo N terminal de p6, perjudican la liberación de partículas virales (17)

## **1.2 Pol**

La enzima codificada por *pol* es inicialmente sintetizada como un precursor de poliproteína Gag-Pol, p160, cuya síntesis resulta de un evento de cambio de marco de lectura, el cual es desencadenado por un motivo de RNA cis-acting. Cuando el ribosoma encuentra este motif, ellos cambian aproximadamente 5% del tiempo al marco de lectura *pol* sin interrumpir la traducción. La frecuencia del cambio del marco de lectura ribosomal explica porque los precursores de Gag y Gag-Pol son producidos en una proporción de aproximadamente 20:1 (16, 17). Las enzimas codificadas individualmente por *pol*, proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR), RNasa H (p51), e integrasa (IN) son divididas desde la p160 por la proteasa viral (Figura #2 y #3). Esas divisiones no todas ocurren eficientemente, por ejemplo, aproximadamente 50% de la proteína TR permanece unida a la RNasa H como un polipéptido único (p66) (17).

### **PR**

La actividad proteasa es requerida para la división de los precursores de poliproteína Gag y Gag-Pol, y cambios conformacionales deben ocurrir con la partícula, para producir virus maduro infeccioso. Algunos de estos eventos de maduración pueden ocurrir simultáneamente con el ensamblaje y brote. La PR divide en varios sitios la poliproteína para producir las proteínas finales MA, CA, NC, y p6 desde el Gag y las proteínas PR, TR, y IN desde Pol. El ensamblaje y maduración deben ser altamente coordinados, los factores que influyen en la actividad PR pueden tener efectos dramáticos sobre la producción de virus. PR funciona como un dímero y es parte de Pol, así la actividad PR inicialmente depende de la concentración de Gag-Pol y de la tasa de autoprosesamiento, el cual puede ser influenciado por secuencias p6 adyacentes (12, 16). El péptido espaciador p2 localizado entre CA y NC puede también ayudar al control de las tasas de división relativas e infectividad, y el procesamiento de NCy p6 pueden ser además



influenciados por la RNA unida a NC. La sobreexpresión de PR puede conducir a tasas aberrantes de procesamiento e infectividad reducida (12). El conocimiento de su estructura ha conducido a una clase de droga dirigida hacia inhibir la función de la proteasa. Estos compuestos antivirales han mejorado grandemente el tratamiento para los individuos infectados con VIH-1 (16).

### TR

Una de las características distintivas de los retrovirus es su habilidad para convertir su genoma de RNA en DNA de doble hebra en la post-infección temprana. Esta acción es catalizada por la enzima TR. En el caso del VIH-1, la TR es un heterodímero de dos subunidades, una de las cuales es de 66 KDa (p66), la otra de 51 KDa (p51). Estas dos subunidades son derivadas de la misma región del precursor de poliproteína, p160; p51 es formado cuando el dominio de 15 KDa de la RNasa H del extremo C terminal de p66 es removido por la PR (12, 17).

Durante el proceso de transcripción reversa, la polimerasa hace una copia de DNA de doble hebra de el dímero de RNA genómico de hebra única presente en el virión. La RNasa H remueve la hebra patrón de RNA de la primera hebra de DNA, permitiendo la síntesis de la hebra complementaria del DNA. El DNA viral puede ser completamente sintetizado dentro de 6 horas después de la entrada viral, aunque el DNA puede permanecer sin integrarse por períodos prolongados. Muchos elementos cis-actuantes en el RNA viral son requeridos para la generación del DNA viral. Como la polimerasa no contiene una actividad de revisión enzimática (Proofreading activity), la replicación está propensa a errores e introduce varios puntos de mutación dentro de cada nueva copia del genoma viral. El VIH, y otros retrovirus, empacan dos copias del genoma de RNA de hebra sencilla por virión. En este caso la transcripción reversa implica saltos de una hebra a otra, la interacción TR/hebra patrón es de una afinidad relativamente baja. Como

consecuencia, el cambio de hebra patrón puede ocurrir con frecuencia; si las dos moléculas de RNA en un virión particular no son genéticamente idénticas, la hebra patrón cambiante resultará en la generación de un DNA genómico recombinante nuevo que contiene secuencias derivadas de ambas hebras de RNA parental. La alta frecuencia de recombinación genética, junto con la alta tasa de mutación de la TR del VIH-1 ( $3 \times 10^{-5}$  por ciclo de replicación) resulta en poblaciones de VIH siendo secuencias altamente heterogéneas (formando las llamadas "cuasiespecies"). Provocando que el VIH sea capaz de evadir rápidamente la respuesta inmune del hospedero y desarrolle resistencia a las drogas antirretrovirales (12, 16, 17).

### IN

Esta enzima de 32 KDa cataliza una serie de reacciones para integrar el DNA lineal viral de doble hebra dentro del genoma del hospedero.

El DNA viral producido dentro del citoplasma de la célula hospedera es transportado al núcleo, en forma de complejo de preintegración (CPI), junto a la IN y proteína Vpr. Dentro del núcleo y cerca de la cromatina, la IN cataliza la unión de DNA viral de doble hebra en el DNA celular.

Algunos detalles de la integración del VIH al genoma del hospedero:

#### En el citoplasma

1. Fijación estable de IN a los extremos U3 y U5 de las secuencias LTR virales. La actividad exonucleasa de IN corta un dinucleótido GT en cada extremo 3' (U3 y U5) en el DNA lineal doble viral. Esta reacción conocida como procesamiento de extremos 3', genera una molécula de DNA de doble hebra con extremos 3' empotrados (17, 19).

### En el núcleo

2. La actividad endonucleasa de la doble hebra de DNA viral hace un corte en el DNA celular. Los extremos 3' del DNA viral se unen de forma covalente a los extremos 5' del DNA celular. Esta reacción es conocida como transferencia de hebra (12, 16, 17,19)
3. El proceso de integración es completado cuando las enzimas de reparación celular llenan los espacios entre el DNA viral y el DNA celular (12, 16, 17, 19). Para favorecer la reparación y lograr una integración productiva del DNA del VIH en el huésped, es necesario eliminar la IN en este sitio de integración mediante la acción de una ubiquitina ligasa (la proteína VHL) y del proteosoma (19).

### **1.3 Env**

Las glicoproteínas de envoltura (Env) también son sintetizadas como un precursor de poliproteínas. La Env de 160 KD (gp160) es expresada desde el ARNm empalmado individualmente. Primero sintetizado en el retículo endoplasmático, Env migra a través del complejo de Golgi donde sufre glicosilación con la adición de 25 a 30 complejos de cadenas laterales de carbohidratos unidos al extremo N terminal se añaden a los residuos de asparagina (16). La glicosilación Env es requerida para la infectividad. Una proteasa celular divide la gp160 para generar **gp41 (TM)** y **gp120 (SU)** (Figura #2). La gp120 contiene los determinantes que interactúan con el receptor y el correceptor, mientras que gp41 no solo ancla el complejo gp120/gp41 en la membrana a través de interacciones no covalentes como estructuras triméricas (16, 17, 21), sino que contiene dominios que son críticos para catalizar la reacción de fusión de membrana entre la membrana lipídica del hospedero y la viral durante la entrada del virus (17). La comparación de secuencias *env* de un gran número de aislados virales reveló que la

gp120 está organizada dentro de cinco regiones conservadas (C1 – C5) y cinco dominios altamente variables (V1 – V5) (Figura #3). Las regiones variables tienden a ser localizadas en bucles (loops) unidos por puentes de disulfuro. La gp41 está compuesta de tres dominios principales: el ectodominio (el cual contiene determinantes esenciales para la fusión de membrana), la secuencia ancla transmembrana, y la cola citoplasmática (Figura #3) (17). Además, esta proteína transmembranal contiene dos regiones helicoidales; HR1 (hélice N) y HR2 (hélice C), y un péptido de fusión (Figura # 3) (17, 21)

## **2. Proteínas Reguladoras**

### **2.1 Tat**

Tat es un transactivador transcripcional que es esencial para la replicación del VIH-1. Tat es una proteína de 101 aminoácidos codificada por dos exones de RNA; un Tat más pequeño de 72 aminoácidos (codificado por un exón) es codificado por algunos aislados (17). Tat es una proteína de unión a RNA, distinta a los factores de transcripción que interactúan con el DNA. Tat unido a una estructura de lazo de tallo corto (short stem-loop), conocida como la región de respuesta transactivación (TAR), que es localizado en el extremo 5' del RNA viral. Un dominio rico en arginina de Tat ayuda a mediar en la unión a una región abultada de tres nucleótidos del TAR (12, 17). La unión de Tat ocurre junto con proteínas celulares, en especial los factores de transcripción NF-κB y Sp1, que contribuyen con el efecto de Tat. La unión de Tat a las actividades de transcripción TAR del LTR VIH incrementa la síntesis de RNA al menos de 100 a 1000 veces (12, 14, 16, 17).

Tat actúa principalmente para promover la fase de la elongación de la transcripción del VIH-1, así transcritos de longitud completa pueden en ausencia de la expresión Tat, el VIH genera principalmente transcritos cortos (>100 nucleótidos). La estimulación de

la elongación de la polimerasa es acompañada por el reclutamiento de una serina quinasa la cual fosforila el dominio carboxiterminal (CTD) de la RNA polimerasa II (12, 16, 17). Esta quinasa, la cual es conocida como familia quinasa dependiente de ciclina (CDK9), es parte de un complejo que se une directamente a Tat. La función de Tat requiere de un co-factor celular, conocido como ciclina T, la cual facilita el reconocimiento de la región del lazo TAR por el complejo ciclina T-Tar. Además, Tat ha demostrado activar la expresión de un número de genes celulares incluyendo el factor de necrosis tumoral beta y el factor de transformación de crecimiento beta, y disminuir la expresión de otros genes incluyendo *bcl-2* y *scya-3* de la quimocina, MIP-1 alfa (16,17)

## **2.2 Rev**

Es una fosfoproteína de unión a secuencias específicas de RNA, de 19 KDa (116 aminoácidos), y codificada por dos exones. Actúa para inducir la transición de la fase temprana a la tardía en la expresión de genes del VIH (16).

El VIH-1 requiere transportar RNA empalmado parcialmente y no empalmado al citoplasma, representando esto un problema para el virus (17) porque normalmente, los RNAs que contiene intrones son retenidos en el núcleo (16). Este problema fue resuelto por el virus a través de la expresión de proteínas virales, Rev (por "regulador de la expresión de proteínas virales") y un elemento de RNA cis-actuante, el elemento de respuesta Rev (RRE) (17). La unión de Rev al RRE facilita la exportación del RNA viral empalmado parcialmente y no empalmado desde el núcleo al citoplasma (19).

Rev es absolutamente requerido para la replicación del VIH-1: provirus que pierden la función Rev son transcripcionalmente activos pero no expresan genes virales tardíos, y de este modo, no producen viriones (16).

### **3. Proteínas Accesorias**

#### **3.1 Nef**

El origen de su acrónimo, factor negativo, fue porque originalmente se reportó suprimiendo la expresión genética de la LTR del VIH. Ahora se conoce su importancia en la patogénesis de los lentivirus (16, 17).

Nef es una fosfoproteína asociada a membrana, de 27 KDa. Al igual que Gag, su unión a membrana es dependiente del ácido mirístico covalentemente unido al extremo N (12, 16, 17).

Entre sus funciones está reducir los niveles de CD4 celular. Nef facilita la entrada del CD4 desde la superficie de la célula y el aparato de golgi al lisosoma, resultando en degradación del receptor y previniendo inapropiadas interacciones con Env, como por Vpu (12).

Otra de las funciones de Nef, es disminuir la expresión sobre la superficie celular de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH, o por sus siglas en inglés MHC) clase I. Esto permite la evasión de las células infectadas del ataque de las células T citotóxicas (CTL) (12, 17).

Nef también estimula la infectividad de los viriones del VIH. Las partículas de VIH-1 producidas en presencia de Nef pueden ser 10 veces más infecciosas que los viriones producidos en la ausencia de Nef, las bases moleculares de este mecanismo no están del todo claras. Nef es empalmado dentro de los viriones, donde es dividido por la PR durante la maduración del virión. Los viriones producidos en la ausencia de Nef son menos eficientes para la síntesis de DNA proviral, aunque Nef no parece influir directamente en el proceso de transcripción reversa. La disminución de CD4 y el efecto sobre la infectividad del virión por Nef son genéticamente distintos como demostró ciertas mutaciones que afectan una de estas dos actividades (16).

### **3.2 Vpr**

El gen *vpr* (por proteína viral r) codifica una proteína de 14 KDa, de 96 aminoácidos, que es incorporado eficientemente dentro de los viriones (Figura #2). Aproximadamente 100 copias de Vpr son asociadas con cada virión. La incorporación de Vpr depende de una interacción específica con un motif rico en leucina localizado cerca del extremo C de p6 (17).

Vpr bloquea la división celular. Se acumula Vpr en las células en la fase G2 del ciclo celular (12, 16, 17).

Otra característica importante de Vpr, es favorecer la infección de células sin división por el VIH; facilitando la localización nuclear del complejo de preintegración (CPI). El Vpr está presente en el CPI. Esta proteína actúa como un factor de transporte nucleocitoplasmático atando directamente el genoma viral a el poro nuclear (12, 16, 17).

### **3.3 Vif**

El gen *Vif* codifica una proteína de 23 KDa y 192 aminoácidos (Figura #2). Importante para la producción de viriones altamente infecciosos. La expresión de Vif es altamente conservada entre los lentivirus. Mutaciones en Vif pueden causar profundos defectos en la infectividad del virus (12, 17).

Vif es esencial para la replicación del VIH en linfocitos de sangre periférica, macrófagos, y ciertas líneas de células. En la mayoría de las líneas celulares, Vif no es requerido, sugiriendo que estas células pueden expresar una proteína que puede completar la función de Vif. Estas líneas celulares son llamadas permisivas para mutantes Vif del VIH. Los viriones generados en células permisivas pueden infectar células no permisivas pero el virus subsecuentemente producido no es infeccioso (16).

### **3.4 Vpu**

El gen *Vpu* codifica una fosfoproteína de membrana integral, de 81 aminoácidos y 16 KDa. Esta proteína solo se encuentra en el VIH-1 y no es codificada por los genomas de VIH-2 o SIV. *Vpu* es expresado desde el RNAm que también codifica a Env.

*Vpu* ejecuta dos principales funciones durante la replicación del VIH-1:

- Mejora la liberación de partículas virales desde la superficie de una célula infectada. En ausencia de *Vpu*, gran número de viriones pueden ser vistos unidos a la superficie de la célula infectada (12).
- Promueve la degradación de CD4. En las células infectadas con VIH-1, las formas complejas entre el receptor viral, CD4, y la proteína de envoltura viral en el retículo endoplasmático causan el arresto de ambas proteínas dentro de su compartimiento. La formación de complejos Env-CD4 intracelulares, por ejemplo, interfiere con el ensamblaje viral (16, 17). Con este, son tres los mecanismos para disminuir la expresión de receptor CD4. Un mecanismo implica el arresto intracelular de CD4 por las glicoproteínas Env, un segundo opera a través de Nef y la tercera es promovida por *Vpu* (17).

#### **3.4.1 Vpx**

La proteína codificada por el gen *vpx* no se encuentra en el VIH-1. Codificada por el VIH-2/SIV<sub>sm</sub>/SIV<sub>mac</sub>. *Vpx* lleva considerables secuencias homólogas con *Vpr*, y, parecida a esta última proteína, es incorporada en niveles relativamente altos dentro de viriones por una interacción con Gag en el extremo carboxílico (C). Su función se ve orientada a la infección de la célula sin división celular, no induciendo la detención del ciclo celular. De esta manera, las funciones propuestas de detención del ciclo celular e



importación nuclear de Vpr del VIH-1 son separadas en dos proteínas (Vpr y Vpx) en los lentivirus VIH-2/SIV<sub>sm</sub>/SIV<sub>mac</sub> (17).

### III. ESTRUCTURA DEL VIH

#### A. Envoltura Viral

Los viriones del VIH maduros tienen forma esférica de 100 – 120 nm en diámetro y consta de una envoltura externa compuesta de una membrana lipídica de origen celular. Embebida en toda la envoltura viral están las proteínas de las células del hospedero, así como 72 copias de un complejo de proteínas del VIH conocido como las glicoproteínas de envoltura (Env). Estas copias de Env sobresalen como púas a través de la superficie del virión. Cada púa está compuesta de tres glicoproteínas de superficie 120 (gp120) unidas no covalentemente a los dominios transmembranales de la glicoproteína 41 (gp41), organizada en simetría triangular, y además ancla la púa a la envoltura viral (7, 8, 9, 10, 11) (Figura #4).

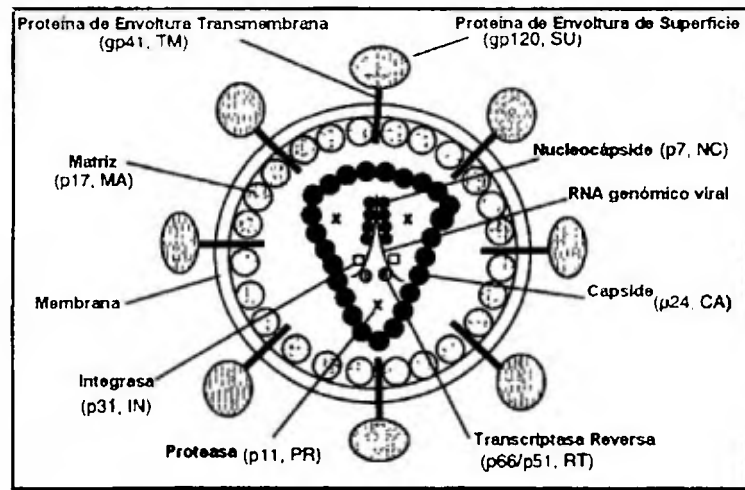


Figura #4 Representación de la estructura del VIH-1 Adaptado de Freed, *et al.*, 2001.

## **B. Nucleocápside Viral**

Dentro de la envoltura viral, las principales proteínas estructurales formando el área del core o nucleocápside son MA o p17, CA o p24, y NC o p7 (7) (Figura #4). MA; forma una cubierta asociada directamente a la cara interna de la membrana por el extremo N-terminal y es importante para la selección de las proteínas precursoras Gag y Gag-Pol a la membrana plasmática antes del ensamblaje viral, es decir, está ubicada entre el cápside viral y la envoltura viral (7, 9, 12). Los dominios N-terminal de CA se ensamblan en aproximadamente 1,500 a 2,000 anillos hexaméricos y 12 declinaciones pentaméricas para constituir la cápside viral con forma de cono, que contiene el material genético del virus de VIH (3, 7, 8, 13), y rodea la nucleocápside y sus enzimas asociadas, transcriptasa reversa (TR), proteasa (PR) e integrasa (IN) (7, 12).

#### IV. ORÍGENES Y DIVERSIDAD

Es generalmente aprobado que el VIH-1 y VIH-2 representen introducciones zoonóticas nuevas en la población humana dentro de los 100 años pasados (4). Hay evidencia de que el lentivirus animal más relacionado al VIH-1 viene a humanos desde el chimpancé (*Pan troglodytes*), el cual alberga el virus de inmunodeficiencia simiano (SIV<sub>cpz</sub>) y vive en África Central (4, 27). Varios genomas del SIV<sub>cpz</sub> se han secuenciado y los que residen en la subespecie de *Pan troglodytes troglodytes* son los más cercanos al VIH-1 (4, 27, 28). Otro SIV (SIV<sub>gor</sub>) fue descubierto en gorilas viviendo en estado salvaje (*Gorilla gorilla gorilla*) tiene muchas de las propiedades biológicas necesarias para la infección en humanos. Evidencia reciente sugiere que el grupo O del VIH-1 pudo haberse originado en gorilas, en que el más cercano pariente de este grupo ha sido identificado (35). Y en el 2009, fue identificada una nuevo VIH-1 cercanamente relacionado al SIV<sub>gor</sub> en una mujer camerunés. Esta nueva variante de VIH-1 es distinta de los tres grupos de VIH-1 establecidos (29). Ahora se tiene identificado en poblaciones humanas, cuatro principales grupos de VIH-1, llamados M, N, O (4, 27, 28) y P (29) (Figura # 5). El grupo M ("main" = principal) comprende la mayoría de los subtipos que se han extendido a través del mundo a causa del contagio epidémico mundial (4, 28); el grupo O ("outlier" = persona u objeto alejado del lugar al que pertenece (30)) es encontrado en Camerún, Gabón y Guinea Ecuatorial; el grupo N ("nonmain and nonoutlier" = no M no O) fue identificado en 1998 en una persona de Camerún (28); y finalmente el grupo P ("putative" = supuesto) identificado en 2009, al igual que el grupo N, en una persona de nacionalidad Camerunés (3, 29). Las secuencias de genes del grupo M, N, y O son tan distintas unas de otras como ellos son del SIV<sub>cpz</sub>. Esto sugiere que ellos derivan de tres introducciones

separadas de chimpancé a humanos, más uno de ellos a llegado ha ser pandémico (4, 28)

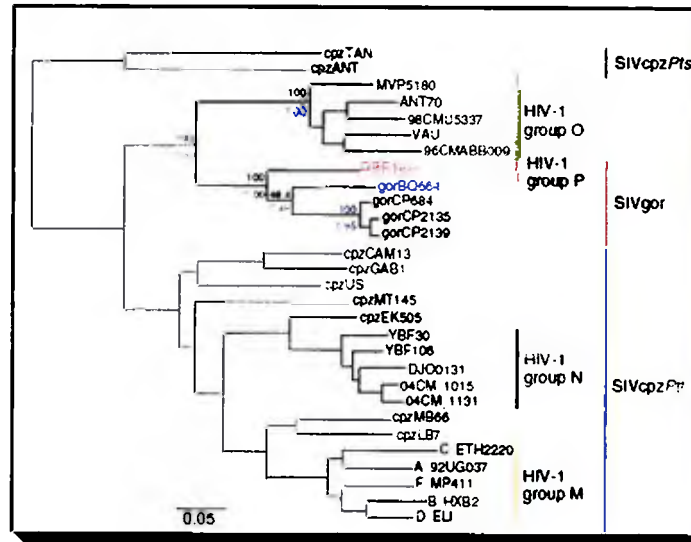


Figura #5. Árbol filogenético mostrando los cuatro grupos de VIH-1. Además se observa en rojo (RBF 168) la cepa de VIH-1 obtenida de la paciente de Camerún. Adaptado de Plantier, *et al.*, 2009.

El caso más antiguo documentado de infección por VIH-1 en humanos fue identificado en una muestra de suero de Kinshasa, Zaire (República Democrática del Congo) almacenada en 1959. Sobre las bases de las secuencias de VIH-1 obtenidas de este y otros numerosos aislados más recientes, ha sido estimado que el grupo M de la cepa VIH-1 diversificó en humanos cerca de 1931 (95% de intervalo de confianza, 1911 a 1941) (4, 28). Similarmente, los ancestros comunes más recientes de los subtipos del VIH-2 han sido datados en los años de 1940 (28, 35).

El VIH-2, cuyo DNA tiene 40 a 60% de homología con el DNA del VIH-1, originado del SIV<sub>sm</sub> del mono mangobeye gris – sooty mangabey – (*Cercocebus atys*) del Oeste de África costera, desde Senegal hasta la Costa de Marfil, el epicentro endémico del VIH-2. El VIH-2 comprende seis distintos linajes filogenéticos, subtipos A al F (3).

En el Oeste y Centro de África, los primates no humanos son mantenidos como mascotas y asesinados por alimento, sugiriendo rutas de transmisión – monos y antropoides, simio a humanos – que están en acuerdo con datos filogenéticos implicando la infección de especies cruzadas (3, 4, 28) (Fig. #6). Estimados de cuando el VIH fue introducido dentro de la población humana, sobre la base de un reloj molecular y la distribución de las secuencias genómicas del SIV entre los chimpancés de África Central, demuestra que es improbable que las vacunas de poliovirus contaminadas fueran la fuente de VIH (28, 36).



**Figura #6.** Chimpancé huérfano, encadenado a la chatarra de un automóvil en un lote de carros en Camerún. El resto de su familia fue cazada y asesinada para vender la carne a una carnicería local como carne de monte. Adaptado de Weiss, *et al*, 1999.

## V. CLASIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIH

El grupo M es el grupo circulante predominante del VIH-1. Ha sido dividido en subtipos, indicados con letras, y sub-subtipos, indicados con números. Los subtipos y sub-subtipos A1, A2, A3, A4, B, C, D, F1, F2, G, H, J, y K son actualmente reconocidos. Los subtipos del VIH-1, también llamados clades, son cepas de VIH-1 filogenéticamente unidas que están a la misma distancia filogenética aproximadamente una de la otra, en algunos casos, los subtipos están epidemiológicamente o geográficamente unidos. Las variaciones genéticas dentro de un subtipo pueden ser 15 a 20%, mientras las variaciones entre subtipo es usualmente 25 a 35%. En la década pasada, avances en la secuenciación completa del genoma del VIH-1 ha conducido a la identificación de formas recombinantes circulantes y formas recombinantes únicas (CFRs y UFRs, respectivamente). Esos son el resultado de recombinaciones entre subtipos dentro de una persona infectada doblemente, de quien las formas recombinantes son entonces transmitidas a otras personas. La progenie recombinante son clasificadas como formas recombinantes circulantes si ellas son identificadas en tres o más personas con ninguna unión epidemiológica directa; si no ellas son descritas como formas recombinantes únicas (36) (Tabla # 3).

Esas definiciones ha ido evolucionando en la pasada década. La nomenclatura en la literatura publicada varía, y ciertos subtipos se encontraron más complejos después de que su genoma completo fuera secuenciado. Por ejemplo, que fue previamente descrito como subtipo "E", circulando en el sureste de Asia, resultó ser una forma recombinante circulante conteniendo componentes del subtipo A y fue redefinido como CRF01\_AE en 1998.

**Tabla 3. Clasificación Filogenética del VIH-1 (Adaptado de Taylor, *et al.*, 2008)**

Clasificación	Definición	Ejemplos
Subtipos o Clados	Las cepas del VIH-1 genéticamente relacionadas que son filogenéticamente equidistantes esencialmente, generando un estrellado, más bien parecido a un árbol, filogenia.	Los subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, y K son actualmente conocidos; A hasta D son altamente prevalente, los otros tienen prevalencia baja y distribución geográfica definida.
Sub-subtipos	Linaje bien diferenciado dentro de un subtipo; la distancia genética entre sub-subtipos es más pequeña que entre subtipos.	Los subtipos A y F son subdivididos en subtipos A1 hasta A4 y F1 y F2, respectivamente; principalmente esos circulan en África Central y Oeste.
Formas Recombinantes Intersubtipos	Cepas mosaico con segmentos de dos o más subtipos alterno cruzando el genoma	Común en epidemias de mezcla de subtipos; se piensa resulta de la infección de una persona con más de un subtipo de VIH-1.
Formas Recombinantes Circulantes	Las formas recombinantes específicas que son esparcidas en una población, nuevas formas son definidas cuando tres o más personas sin unión epidemiológica directa se encuentran infectadas; el nombre asignado refleja la composición de la secuencia descubierta y el subtipo, con "cpx" indica formas conteniendo tres o más subtipos.	Actualmente, 43 formas son descritas; CRF01_AE y CRF02_AG son encontradas principalmente en el sureste de Asia y África Occidental, respectivamente; los otros tienen distribuciones más limitadas.
Formas Recombinantes Únicas	Formas recombinantes únicas recuperadas de sólo una persona.	Cientos de formas han sido descritas en base a secuencias parciales o completas del genoma; su potencial de expansión epidémica es desconocido.
Linajes Geográficamente Definidos	Los linajes, a menudo específicos de país, que son filogenéticamente característicos, los subtipos diferentes, ellos no son filogenéticamente equidistantes dentro de subtipos.	B de Tai, C de hindú, D de África Occidental y Oriental, y A de la antigua Unión Soviética.

La distribución global de subtipos y formas recombinantes circulantes reflejan la complejidad de la epidemiología molecular del VIH-1 (Fig. # 7). El virus CRF1\_AE fue primero identificado en Tailandia a finales de la década de los 80. Esta cepa y su cercanía familiar en África central ha tenido muchas diferencias. CRF01\_AE domina en el sudeste de Asia, mientras en África, su forma recombinante circulante permanece relativamente raro. Dos nuevas formas recombinantes circulantes, combinando la cepa de Tailandia B y la hindú C afines pero con estructuras de mosaico bien diferenciado, apareciendo al sur de China entre usuarios de drogas intravenosas (UDI) y extendiendo, entre varias rutas de tráfico de drogas, cruzando el país. Una cepa de baja diversidad del subtipo A, y una nueva forma recombinante circulante derivada de esta, CRF03\_AB, surge en la antigua Unión Soviética. Más recientemente, CRF014\_BG surgió entre UDI en España y Portugal y continúa extendiéndose.

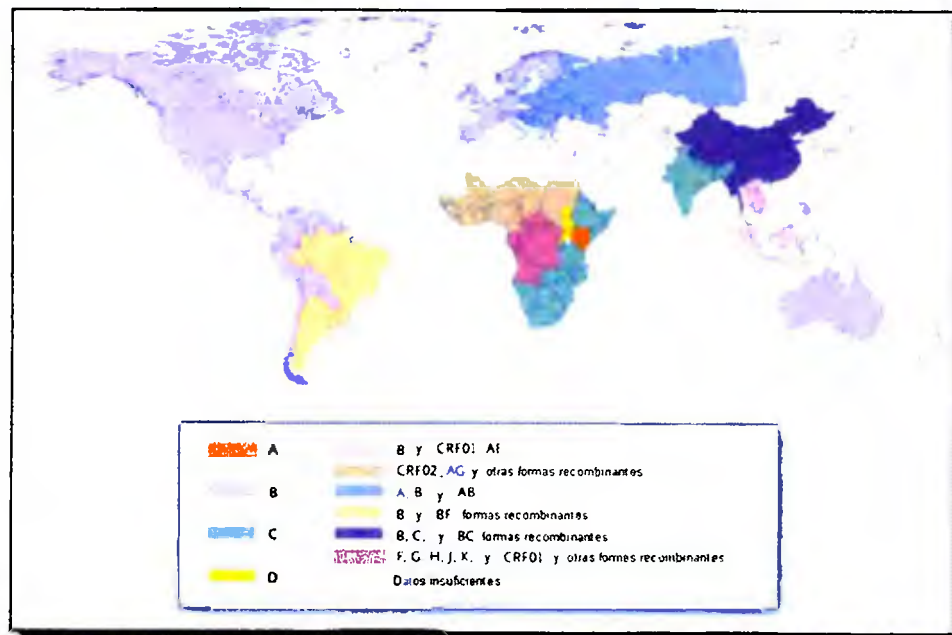


Figura #7. Distribución Global de los Subtipos y Formas Recombinantes del VIH-1. Adaptado de Taylor, *et al.*, 2008.



El subtipo F, raro en África central, aparece en América del Sur en la forma de cepas recombinantes BF; el subtipo F progenitor de estos recombinantes nunca ganó prevalencia significativa. Finalmente, la epidemia de VIH-1 en Afganistán e Irán, alimentado principalmente por los UDI, demostró estar unido ambas a la cepa CRF35\_AD recién aparecida.

## VI. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1

El ciclo de vida del VIH-1 envuelve una serie de pasos para el éxito de la infección en determinados tipos de células. Algunos eventos ocurren en un modo simultáneo o coordinado, con propósitos de docencia se presenta de manera gradual y ordenada. Los números arábigos explican las fases del ciclo de replicación viral de la figura #8.

### a **Entrada viral**

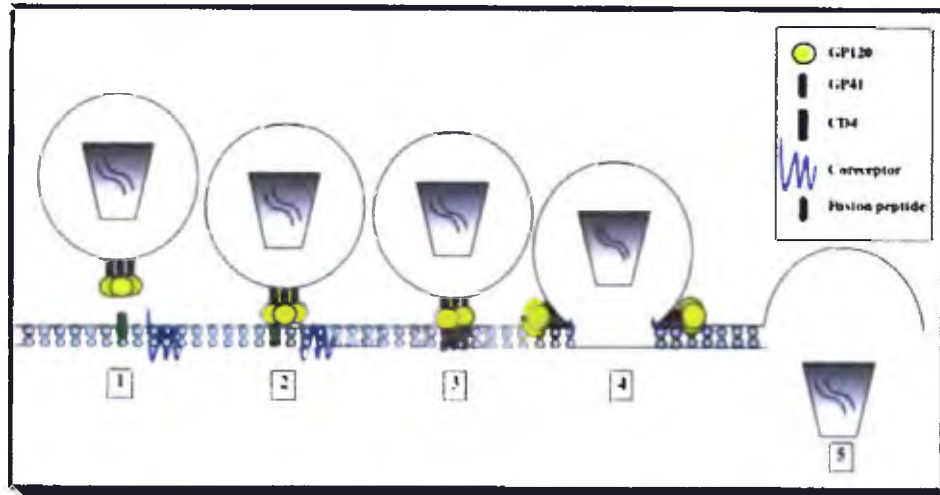
El virus se fusiona con la superficie de la célula hospedera (Fig. #8 y 9-1):- Los virus envueltos presentan dos vías de entrada a la célula diana: i) endocitosis, ii) fusión mediada por receptor. La endocitosis puede ser dependiente o independiente del pH, en el primero se conoce que el virus acidifica el endosoma y esto provoca la fusión de las membrana viral con la del endosoma liberando el genoma viral al citoplasma; y en el último caso, la endocitosis se da por interacción de residuos de hidratos de carbono expresados en la membrana del virus con ciertas proteínas de la membrana del hospedero. No es considerada una unión mediada por receptor por no ocurrir cambios de estructuras conformacionales (14, 17, 21).

La entrada del VIH-1 en las células ocurre mediante la interacción con dos tipos de receptores. El primer receptor es común a todos los subtipos de VIH, la molécula del CD4, y el segundo tipo, se ha caracterizado una serie de correceptores del VIH que corresponden a distintos receptores de quimiocinas (7, 14, 17) (Fig. # 9 - 1).

### b **Internalización de la cápside y liberación del RNA genómico viral**

Entrada del RNA y proteínas virales a la célula hospedera (Fig. #9 - 2):- El proceso de descapsidación del RNA genómico viral se origina en el citosol y para que este fenómeno se produzca los retrovirus tienen que escapar al bloqueo que genera

una serie de proteínas de la célula hospedera y que son específicas de especie. Algunos autores consideran estos mecanismos de interferencia y restricción mediados por proteínas celulares como un sistema de inmunidad innata intracelular al que pertenecerían TRIM5 $\alpha$  que como factor de restricción que actúa en un paso de post-entrada el cual previene infección cruzada de especies e interfiriendo en el proceso de descapsidación, ciclofilina A cuyo papel no está bien definido pero que podría colaborar con TRIM5 $\alpha$  (14, 21) y APOBEC3G (7, 14) que interfieren en el proceso de retrotranscripción.



**Figura #8.** Entrada esquemática del VIH-1. Los trimeros Env del VIH-1 reconocen y se unen a las moléculas receptor CD4 sobre la superficie de la célula blanco (1). Después de un cambio conformacional, gp120 puede entonces unir moléculas del coreceptor (2), desencadenando la inserción del péptido de fusión gp41 dentro de la membrana de la célula blanco (3). Esto causa la formación de un haz de seis hélices conduciendo a la fusión de la membrana (4), así permitiendo a la cápside viral entrar a la célula (5). Adaptado de Gómez, *et al.*, 2005.

### c. Retrotranscripción, transporte e integración

DNA viral es formado por transcripción reversa (o retrotranscripción) (Fig. #9 - 3):-

Una vez realizada la descapsidación del genoma viral se produce en el citosol el proceso de retrotranscripción del RNA viral mediante la acción de la transcriptasa

reversa o inversa (TR) que es transportada en el propio virión. La retrotranscripción supone un complejo proceso que se produce en el citoplasma celular mediante el cual la TR genera una doble hebra de DNA que duplican los LTR que se supone en ambas extremidades del genoma proviral (7, 14, 17, 31).

DNA viral transportado por la integrasa al núcleo (Fig. #9 - 4):- Una vez sintetizado el DNA es transportado al núcleo y se integra al genoma celular mediante la acción de la integrasa viral constituyendo lo que se denomina la forma “proviral” del VIH (14).

En el proceso de transporte participan activamente proteínas virales como Vpr y p17. También se ha descrito que la proteína Nef, que es transportada también en el virión, aumenta la eficiencia de retrotranscripción. Asimismo, se ha demostrado que el proceso de retrotranscripción e integración es dependiente no solo de factores virales, sino también de factores celulares inducidos en el curso de procesos de activación celular (7, 14, 17, 31). En linfocitos T CD4 en reposo, una vez internalizado, el genoma viral es retrotranscrito de forma incompleta y no se produce la finalización de la retrotranscripción y la integración a menos que la célula sea activada. De hecho, se ha demostrado en linfocitos de sangre periférica de pacientes seropositivos la existencia de DNA proviral no integrado que es susceptible de integración y replicación si dichas células son activadas. Estas formas provirales no integradas pueden permanecer en el citosol celular hasta una semana y constituyen tanto un reservorio potencial del VIH como un marcador de infección celular reciente (14, 31).

d. **Replicación del VIH (Fig. #9 - 5)**

Una vez integrado el VIH en el genoma de la célula infectada, éste puede seguir un comportamiento variable: permanecer latente, replicarse de forma controlada o

experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático en la célula infectada. La replicación del VIH es un proceso secuencial que depende de la acción de factores celulares y virales y que puede sistematizarse en los siguientes pasos:

- Iniciación de la transcripción. La iniciación de la transcripción supone el comienzo de la síntesis de RNAm del VIH a partir del DNA proviral integrado en el genoma celular. El paso de la situación de “silencio” a la de “actividad” transcripcional no depende de proteínas virales, sino de factores celulares que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en el LTR viral. Estos factores que actúan en las secuencias de regulación genética, como el enhancer y el promotor del VIH permiten la formación del complejo transcripcional primario (RNA polimerasa II y factores asociados) que realiza la transcripción génica (14, 17).
- Transcripción completa del genoma viral. La transcripción completa del genoma viral requiere la participación de la proteína viral Tat. Esta proteína actúa esencialmente como un RNA enhancer o mejorador que permite la elongación completa del RNA viral (14, 17).
- Procesamiento del RNAm. La transcripción desde el LTR viral conduce a la generación de un gran número de RNA viral. Estos se diferencian en tres clases principales: i) RNA no empalmado, los cuales funcionan como el RNAm para los precursores de las poliproteínas Gag y GagPol, y que son empacados dentro de los viriones como RNA genómico viral, ii) RNAm parcialmente empalmado, estos codifican las proteínas Env, Vif, Vpu y Vpr, y iii) RNAm empalmado pequeños, los cuales son traducidos en Rev, Tat, y Nef. El RNAm del virus se sintetiza y debe ser transportado al citosol por la

proteína reguladora viral, Rev, que tiene una localización preferentemente nuclear. En ausencia de Rev, el RNAm viral se acumula en el núcleo.

En resumen, el nuevo RNAm es utilizado como RNA genómico viral y para hacer las proteínas virales.

e. **Formación y maduración de viriones (Fig. #9 – 6,7)**

Nuevo RNA viral y proteínas movidos a la superficie celular para formación de nuevas partículas virales inmaduras (Fig. #9 – 6):- Una vez sintetizadas las proteínas virales deben llevadas cerca de la superficie celular junto con el RNA genómico viral; en este caso Vpu reúne las proteínas del virus cerca de la membrana celular del hospedero y potencia la producción de virus (14, 17). Además, la proteína viral Vif interacciona con la proteína APOBEC3G del huésped impidiendo así su incorporación en los viriones producidos. APOBEC3G representa un mecanismo de inmunidad antiviral innata activo contra retrovirus y probablemente otras familias virales. En ausencia de Vif, APOBEC3G se incorpora en el virión e interfiere en el proceso de retrotranscripción en las células que son infectadas en el siguiente ciclo viral. El carácter mutagénico de APOBEC3G aumenta la tasa de error (hipermutación letal) de la TR que sintetiza así moléculas de DNAc virales defectuosas que no pueden integrarse y replicar en forma eficaz (4, 7, 21, 33, 34).

Maduración del virión por acción de la proteasa viral (Fig. #9 – 7):- La proteasa viral desempeña una función importante en la producción de partículas virales maduras al procesar los precursores proteínicos Gag y Gag-Pol en la proteínas de la nucleocápside, la transcriptasa inversa del virus y la propia proteasa viral (14).

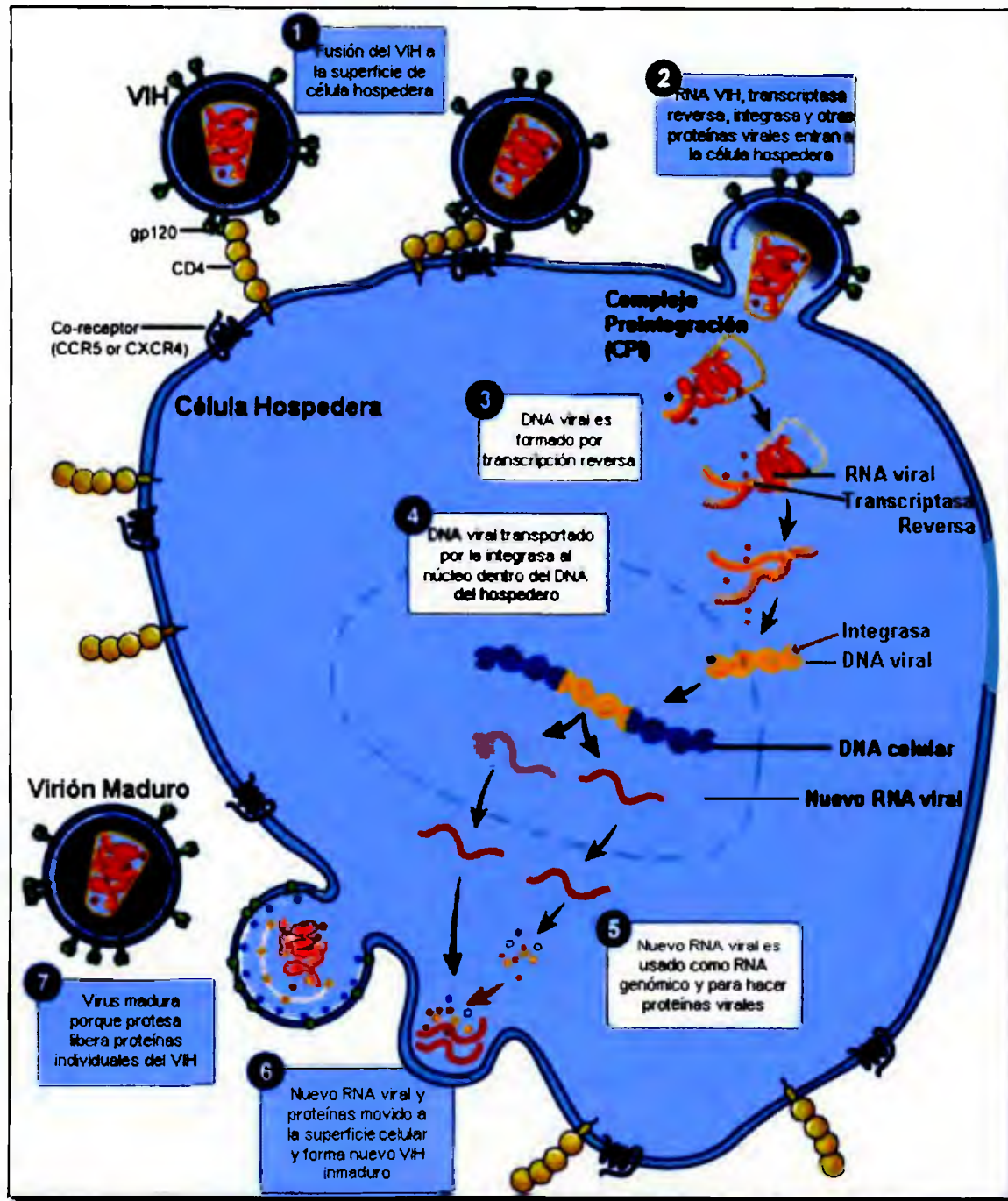


Figura #9. Esquema del Ciclo Replicativo del VIH-1. Adaptado del sitio del NHI <http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/hivReplicationCycle.htm>

## VII. Domicilio Celular del VIH

Las células utilizadas por VIH-1 para su replicación en el ser humano son las que representan los brazos innatos y adaptativos del sistema inmune. Es por ello, que este virus causa el SIDA después de un período relativamente largo de infección. A continuación presentaremos las células usadas como residencia del VIH en los seres humanos:

1. Células T CD4:- Una característica distintiva de la infección con VIH-1 es una profunda pérdida de células T CD4, el principal domicilio del VIH. La pérdida dramática de las células T CD4 explica muchas de las manifestaciones de la enfermedad por VIH. El uso de citometría de flujo policromática para clasificar subtipos múltiples de células T, seguido por cuantificación del DNA del VIH en las células clasificadas, ha confirmado que la población predominantemente infectada consiste de las células T CD4 de memoria; y las células T CD4 maduras vírgenes son infectadas a una baja frecuencia. Las células T CD4 de memoria que tienen una historia más larga de proliferación *in vivo* de hecho contienen poco VIH, así la evidencia indirecta proporcionada que la infección de las células T por VIH acorta su período de vida *in vivo* (27).

El VIH replica más eficientemente en las células T CD4 activadas, por lo que la población de células T CD4 específica a VIH llegará a infectarse más frecuentemente que la población general de células T CD4. Por este medio, el número de células T CD4 ayudadoras específicas a VIH decrecerá, resultando en la pérdida del control inmune de la replicación viral (27).

2. Células Dendríticas:- Estas células capturan antígenos en el tejido periférico, transportándolas a los órganos linfoides, digiriéndolos y mostrando los péptidos resultantes a las células T. Las células dendríticas son moderadamente sensibles a la



infección del VIH *in vitro* probablemente porque ellas expresan bajos niveles de los receptores CD4, CXCR4, y CCR5. Seguramente, la infección de las células de Langerhans, las cuales pertenecen a la familia de las células dendríticas, depende de los niveles de CCR5 que ellas expresan. Las primeras células en infectarse por el VIH, pueden ser las células T CD4 y no las dendríticas. No obstante, las células dendríticas pueden jugar un rol en las fases iniciales de la infección del VIH porque ellas expresan una lectinas de superficie celular específica (DC-SIGN), las cuales capturan una porción de carbohidratos sobre la gp120 del VIH y media la agrupación de las células dendríticas con las células T. El DC-SIGN actúa concentrando virus en las células dendríticas o transmitiendo VIH unido a las células T CD4 que expresan el receptor de superficie CXCR4 o CCR5. El DC-SIGN ni provoca la fusión del VIH con las células T ni evita los requerimientos para los receptores del VIH sobre las células blanco, pero permite la infección eficiente por agregación de virus sobre la superficie de las células dendríticas (27).

3. Macrófagos:- Las células del linaje de los macrófagos son un importante blanco del VIH, y los macrófagos infectados productivamente han sido encontrados en pacientes no tratados y en aquellos recibiendo terapia antirretroviral (TARV) (27).

4.- Células T CD8:- Ha habido reportes de células T CD8 infectadas con VIH, particularmente en pacientes en enfermedad en estado tardío (27).

5.- Células T Asesinas Naturales:- Las células T CD4 asesinas expresan CCR5 y son altamente susceptibles a la infección con cepas de VIH con tropismo a CCR5, lo que puede explicar la depleción de estas células durante la infección con VIH (27).

6.- Células Asesinas Naturales:- Estas no requieren sensibilización previa para reconocer y matar blancos; expresa CD4 y pueden ser infectadas productivamente con cepas con tropismo hacia CCR5 o CXCR4 *in vitro*. El DNA viral persiste en las células

asesinas naturales aún después de uno o dos años de TARV efectiva. Estos hallazgos sugieren que las células asesinas naturales actúan como un reservorio viral (27).

## VIII. MECANISMO DE TRANSMISIÓN

El riesgo de transmisión del VIH aumenta cuando se exponen las membranas mucosas más porosas, tales como; la de los genitales, el ano, y el recto, las cuales son barreras ineficientes contra el VIH.

Las principales rutas de transmisión del VIH son:

- ✘ Por contacto sexual con una persona infectada. Los grupos de alto riesgo son las mujeres trabajadoras sexuales y los hombres que tienen sexo con hombres (2). Sin embargo, la mayoría de las infecciones del VIH-1 resultan de la transmisión heterosexual (2).
- ✘ Contacto directo con sangre, el cual puede ocurrir al compartir agujas, transfusiones, trasplantes de órganos, accidentes laborales en los trabajadores de la salud, o ciertos productos sanguíneos.
- ✘ De madre a hijo, *in utero* o durante el nacimiento o a través de la leche materna (3).

La mayoría de la transmisión *in utero* ocurre durante el tercer trimestre. Sin embargo, el VIH-1 ha sido aislado de fetos abortados tan temprano como de 8 semanas de gestación, indicando que la transmisión *in utero* temprana también toma lugar. No se conoce porque la transmisión *in utero* no es más frecuente (89).

Una proporción alta de los eventos de transmisión de madre a hijo del VIH-1 ocurren durante el parto porque el neonato pasa a través del canal de parto y es expuesto a sangre materna y secreciones genitales infectada del VIH-1 (89).

La transmisión del VIH-1 a través de la leche materna es conocida desde muy temprano en la epidemiología del SIDA, sin embargo gran número de mujeres eligen alimentar a sus hijos con la leche materna por estas razones: i) estigmas sociales

asociados con la no lactancia materna, ii) el costo de los métodos de alimentación alternativos, y iii) falta de acceso a agua segura (89).

El VIH puede estar presente en una persona infectada en estos fluidos corporales:

- ✘ Sangre
- ✘ Semen
- ✘ Secreciones vaginales
- ✘ Leche materna

# **CAPÍTULO II**

## FACTORES GENÉTICOS DEL HOSPEDERO

La historia natural del VIH es definida como la progresión no tratada desde el tiempo de la transmisión a la muerte. El curso típico de la infección es caracterizada por tres fases: fase de infección primaria o aguda, fase asintomática, y SIDA. La fase primaria a menudo comienza con un síndrome retroviral agudo sintomático que inicia 2-3 semanas después de la transmisión y con una duración de 2-4 semanas adicionales. La fase asintomática, en contraste, es prolongada con una duración que varía mucho. Mientras hay poco consenso en cómo dividir a los pacientes basados en su duración de fase asintomática, múltiples grupos clínicos han sido descritos en la literatura incluyendo progresores rápidos, progresores típicos, no progresores de largo plazo, y controladores élite. Aproximadamente del 5-15% de los sujetos asintomáticos experimentan un declive súbito en el conteo de las células T CD4+ progresando a SIDA dentro de 2-5 años. Los progresores típicos usualmente progresan a SIDA dentro de 5-10 años de infección. El 5-15% de los pacientes definidos como no progresores de largo plazo presentan un decrecimiento muy lento de las células T CD4+ manteniendo con el tiempo niveles normales por más de diez años. A pesar de experimentar un declive lento en el conteo de las células T CD4+, la mayoría de los no progresores a largo plazo tendrán viremias bajas pero detectables y eventualmente experimentaran progresión de la enfermedad del VIH. Algunos investigadores definen un grupo pequeño de "controladores élite" caracterizado por persistentes cargas virales de VIH indetectables en ausencia de tratamiento antirretroviral, algunos por más de 25 años. Las definiciones y técnicas de estudio varían, pero este grupo puede constituir el 0.1% a 1% de la población infectada con VIH.

La historia natural de la enfermedad del VIH varía considerablemente no solo de persona a persona sino de región geográfica en el mundo. Sobre una perspectiva a nivel

de paciente, hay algunos quienes progresan a SIDA dentro de 2-3 años de infección y otros permanecen libres de SIDA por más de 12-13 años. Sobre una perspectiva a nivel de población, pequeñas pero diferencias importantes también existen. Factores sociales, geográficos, virales y del hospedero (edad, género, grupo de exposición, antecedentes genéticos e inmunológicos) todos pueden influir en la historia natural de la infección del VIH a un nivel individual o poblacional.

Para los fines de este proyecto nosotros ampliaremos los factores genéticos del hospedero. Por lo que presentaremos, el rol de la quimiocina SDF1, y los correceptores de quimiocinas CCR5 y CCR2 en la infección del VIH-1.

## **I. CORRECEPTORES DEL VIH**

### **A. EL ROL DE LOS CORRECEPTORES**

Como se menciona en el capítulo I, por unión del VIH al receptor CD4, la gp120 experimenta cambios conformacionales, conduciendo a la exposición de los dominios ocultos del gp120 que interactúa con los receptores de quimiocinas; los cuales funcionan como correceptores del VIH. La interacción el complejo gp120/CD4 con co-receptores estabilizan la unión del virus, provocando cambios conformacionales en gp41, el cual conduce a la inserción de la porción amino-terminal hidrofóbica del gp41 (el péptido de fusión) dentro de la membrana de la célula hospedera y eventualmente la formación de un poro de fusión y entrada viral (17, 48, 61)

Las quimiocinas constituyen una familia de proteínas de bajo peso molecular, con cuatro residuos de cisteína conservados, que incluye al menos 70 proteínas que se clasifican en 4 subfamilias: XC, CXXXC, CXC y CC. Estas proteínas son mediadores solubles que actúan en los fenómenos de respuesta inflamatoria atrayendo a los leucocitos de la sangre a los tejidos. Además de esta función, las quimiocinas están

implicadas en otros procesos como la angiogénesis, el desarrollo embrionario, la migración y diferenciación de precursores hematopoyéticos y la formación de metástasis (14, 42, 62, 65, 66). Las quimiocinas  $\alpha$  (CXC) y las quimiocinas  $\beta$  (CC) se distinguen por la posición de sus dos primeros residuos de cisteína, que pueden ser adyacentes (CC) o estar separados por un aminoácido (CXC) (4, 42, 62, 66). Un número pequeño de quimiocinas tiene una cisteína única (XC) o dos cisteínas separadas por tres aminoácidos (CXXXC o CX3C) (4, 45, 65, 66)

Quince distintos receptores para quimiocinas CC (llamadas CCR1 a CCR11) y seis para quimiocinas CXC (llamadas CXCR1 a CXCR6) han sido identificados hasta el momento (4, 65, 66). Los receptores de quimiocinas son expresados sobre leucocitos, y exhiben especificidad traslapada para quimiocinas dentro de cada subfamilia, y el patrón de expresión celular del receptor determina cual tipo de célula responde a cual quimiocina. Esta característica es vista en otros receptores con siete dominios transmembranosos (7M) que son acoplados a proteínas unidas a trifosfato de guanósina trimérico (GTP), y tales receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Fig. #10). Cuando está ocupado por el ligando, esos receptores actúan como proteínas de intercambio GTP, catalizando el reemplazo del difosfato de guanósina (GDP) por GTP. La forma asociada GTP de esa proteína G puede activar una variedad de enzimas celulares, incluyendo algunos que estimulan la locomoción celular (4, 42, 62, 66).

Más de siete diferentes receptores de quimiocinas y otros receptores acoplados a GPCR relacionados han sido descritos sobre la base de una fusión *in vitro* y ensayos de infección. Sin embargo, la mayor parte de los datos patofisiológicos concernientes al ciclo de vida *in vivo* son consistentes con el uso de dos principales correceptores, CCR5 y CXCR4 (Fig. #11).



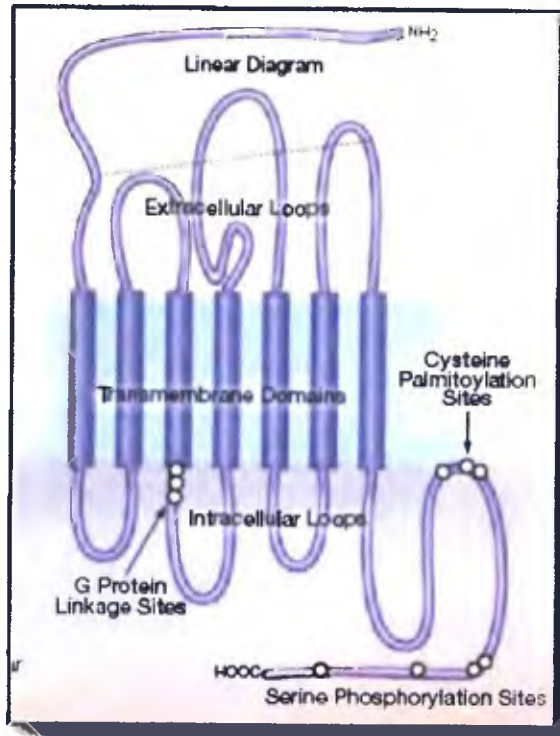
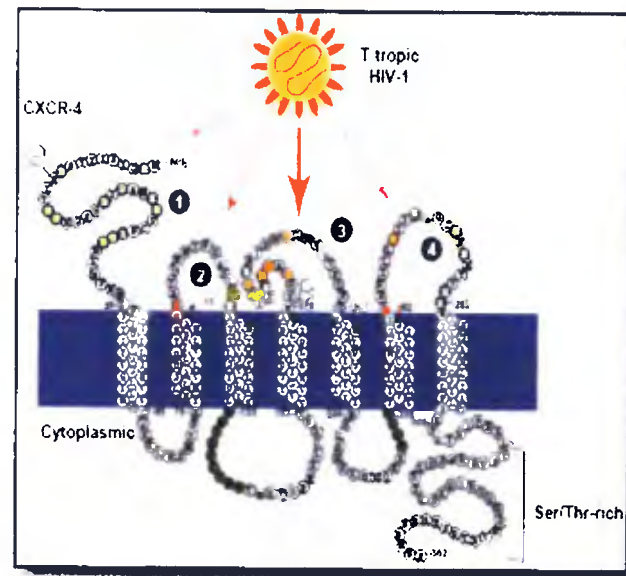


Figura #10. Diagrama del receptor de quimiocina (CC). Consta de 7 dominios transmembranosos, 3 lazos extracelulares y 4 lazos intracelulares, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular.

Figura #11. Secuencia primaria y topología de receptor CXCR4. Los dominios en verde están envueltos en la unión de la proteína G. Las cepas del VIH-1 R4 o R5R4 con los cuatro dominios extracelulares, aunque estudios señalan que el lazo o dominio más importante es el tercer, seguido por el segundo (números en círculo). Adaptado de Horuk, 1999.



El uso de receptores secundarios, o correceptores es un determinante principal del tropismo celular viral usados por cepas del VIH-1 no inductoras de sincicio (NSI), previamente llamadas cepas de VIH trópicas a macrófagos (M). Estas cepas son recuperadas durante los primeros años siguientes de la seroconversión, y son por eso consideradas como responsables por la transmisión de la enfermedad. CXCR4 es usado por cepas que inducen sincicio (SI), previamente llamadas trópicas a T y aislados primarios que se propagan preferencialmente durante los estados tardíos de la enfermedad. Sobre la base de uso de correceptor, el tropismo viral a sido redefinido como R5 y X4 para, respectivamente, cepas usando CCR5 y CXCR4. Algunas cepas son capaces de usar ambos correceptores alternativamente, y son por eso reportadas como tropismo dual, o R5X4 (Fig. #12) (4, 48, 67).

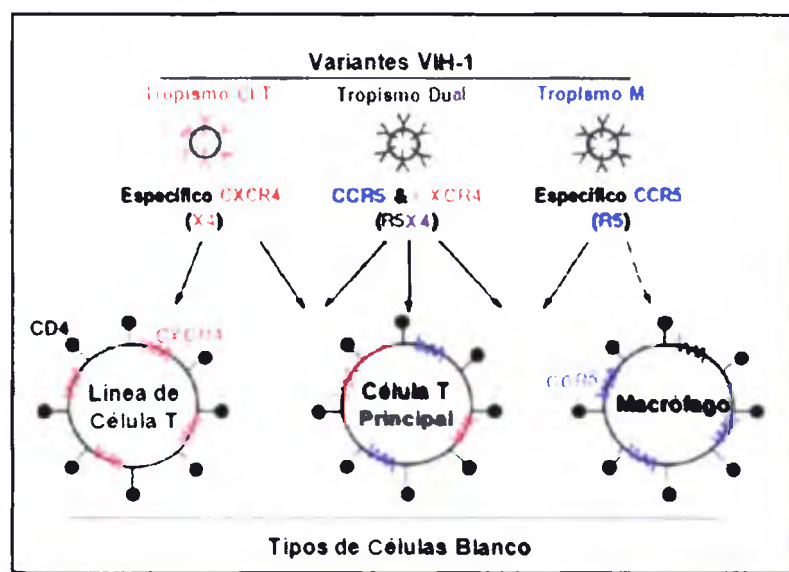
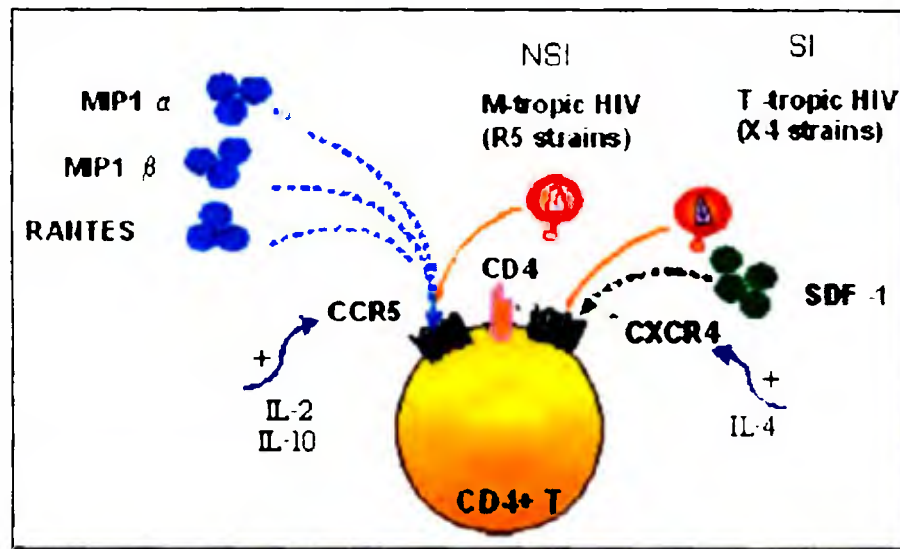


Figura #12. Uso del correceptor y tropismo del VIH-1. Adaptado de Alkhatib G, Berger E; 2007.

## B. INHIBICIÓN DE LA INFECCIÓN DEL VIH POR LIGADOS DE CORRECEPTORES

El CCR5 fue primero descrito como un receptor para las tres CC-quimocinas relacionadas MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 y RANTES/CCL5 (Fig. #13). Dos variantes

adicionales, codificadas por CCL3L1 y CCL4L1, los genes resultantes de la duplicación de CCL3 y CCL4, también se unen al CCR5. El CCL3L1 aparece como el más potente antagonista natural del CCR5 e inhibidor de la cepa VIH R5. Luego, MCP-2/CCL7 y HCC-1/CCL14 fueron también descritos como antagonista de elevada afinidad, MCP-4/CCL13 como un antagonista débil, y MCP-3/CCL8 como un antagonista natural del receptor. El papel del CCR5 como correceptores del VIH fue propuesto siguiendo la identificación de proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) – 1 $\alpha$ , MIP – 1 $\beta$  y quimiocina  $\beta$  RANTES como principales factores supresivos del VIH y este rol fue rápidamente confirmado (Fig. #13) (42, 48, 67).



**Figura #13.** Representación diagramática de la unión del VIH-1 a los correceptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 expresado sobre la célula T CD4. El nivel de expresión del receptor de quimiocina CCR5 y sus ligandos MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , y RANTES, y el receptor CXCR4 y su ligando SDF1 pueden mejorar o suprimir el riesgo de la infección del VIH Adaptado de Kaur G, Mehra M. 2007.

El CXCR4 fue reportado primero como LESTR, un receptor huérfano relacionado a los receptores de quimiocinas, y después renombrado como fusina, fue el primer correceptor identificado como tal (17). El SDF1 o CXCL12 fue reportado como el ligando de CXCR4, y es hasta ahora el único ligando conocido para este receptor (Fig. #13) (17,

42, 48, 67). Como los ligandos de CCR5, las moléculas unidas a CXCR4 son capaces de impedir la entrada de las cepas VIH-X4 por ocupación del receptor CXCR4 (48, 67).

Además la competición con la unión de la glicoproteína de envoltura gp120 del VIH, la ocupación del CXCR4 o CCR5 por antagonistas conduce a la internalización rápida de los receptores, los cuales contribuyen grandemente a los efectos inhibitorios del VIH (17, 48).

### **C. FISIOPATOLOGÍA DEL CXCR4 y CCR5**

El SDF-1 es una quimiocina esencial envuelta en una multitud de procesos celulares, tales como el desarrollo de la linfopoyesis B, migración de neuronas cerebelar, desarrollo de gónadas y corazón y vascularización del tracto gastrointestinal. En la vida adulta, se sabe que regula el tráfico de linfocitos y neutrófilos. El SDF-1 y el CXCR4 fueron reportados como actores claves en la anidada de progenitores hematopoyéticos dentro de la médula ósea. El SDF-1 recluta progenitores en reposo, con lo cual contribuye con la homeostasia hematopoyética (17).

Como otros receptores para quimiocinas inflamatorias, el CCR5 esta envuelto en el reclutamiento de varias poblaciones de leucocitos a los sitios inflamatorios. El CCR5 es expresado en la superficie de las células T con un fenotipo efector/memoria, macrófagos y células dendríticas inmaduras y células microgliales en el sistema nervioso central (SNC) (48).

El CCR5 fue mostrado para contribuir al reclutamiento de leucocitos en un número de enfermedades inflamatorias, tales como daño hepáticos asociados con injertos versus enfermedad del hospedero, esclerosis múltiples y artritis reumatoide. Sin embargo, dada la redundancia del sistema de quimiocinas, un modelo de ratón knock – out para CCR5 fue expuesto inicialmente, mostrando sólo una alteración modesta de la función del

macrófago, por la eficiencia reducida de aclaramiento para la infección con *Listeria*, y los homocigotos para los alelos no funcionales de CCR5 en la población humana no parece mostrar un fenotipo abierto o a ser propenso a enfermedades infecciosas o a pérdida de regulaciones inmunes. Análisis más detallados han conducido a través de los años a demostrar que el CCR5 está envuelto en un creciente número de situaciones patofisiológicas específicas (48).

Un papel crítico para el CCR5 en ratones ha sido mostrado en la regulación de la respuesta inmune contra el virus del Nilo Occidental (WNV). El WNV es un patógeno re-emergente que causa encefalitis en varias especies, incluyendo al hombre, con una tasa de mortalidad de aproximadamente 4% (66). La infección por WNV induce la expresión de CCR5 y RANTES/CCL5, y promueve la acumulación de leucocitos T, macrófagos y células NK en el cerebro. La acumulación de leucocitos en cerebro correlaciona con la respuesta antiviral protectora, puesto que los ratones CCR5 homocigotos a la mutación CCR5 $\Delta$ 32 (CCR5<sup>-/-</sup>) no logran acumular los leucocitos, muestran incremento de la carga viral en el SNC y muerte invariablemente, mientras que la transferencia de esplenocitos CCR5 tipo salvaje (CCR5<sup>wt</sup>) dentro de ratones CCR5<sup>-/-</sup> restaura la tasa de supervivencia de animales tipo salvaje. Estos datos experimentales están de conformidad con la frecuencia incrementada de homocigotos CCR5 $\Delta$ 32 encontrada entre individuos infectados con WNV en dos cohortes independientes en EUA, y los incrementos de casos fatales correlacionan con homocigotos CCR5 $\Delta$ 32 en uno de los cohortes (72). Ratones deficientes en CCR5 también muestran incremento en la tasa de mortalidad asociada con una neumonitis severa en respuesta al virus de influenza A (48).

El alelo CCR5 $\Delta$ 32 fue encontrado para ser protector contra el desarrollo de artritis reumatoide (RA) en un estudio de meta-análisis (asociado con mutación  $\Delta$ 32), aunque

estudios individuales fueron incompatibles. El bloqueo del CCR5 en modelos animales de RA (artritis reumatoidea) también resulto en mejoramiento de la artritis (42, 48).

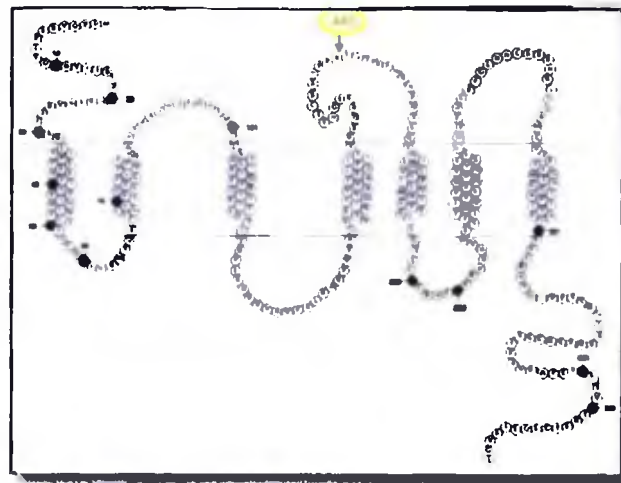
La participación del CCR5 en otro número de enfermedades humanas ha sido también sugerida por estudios genéticos (asociación con la mutación  $\Delta 32$ ). Algunas de las correlaciones descritas sin embargo, no fueron confirmadas en estudios subsecuentes, y muchos de estos datos siguen siendo por eso controversiales. Entre otros, los pacientes homocigotos para CCR5 $\Delta 32$  han sido mostrados para exhibir transplantes renales de sobrevivida más larga que aquellos con otros genotipos (48).

## **II. VARIABILIDAD GENÉTICA DE RECEPTORES DE QUIMIOINAS Y SU INFLUENCIA A LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN DEL VIH SIDA.**

### **A. LA MUTACIÓN $\Delta 32$ DEL CCR5**

El receptor de quimiocina CCR5 está codificado por el gen *CMKBR5* localizado sobre la región p21.3 del cromosoma 3 humano (45). La identificación del CCR5 como un correceptor principal para cepas de VIH trópicas a macrófagos estimuló la búsqueda para mutaciones de los genes que perjudicarían la función del receptor y representaría una base molecular para la resistencia de la infección del VIH caracterizada en algunos individuos (45, 84). Variaciones polimórficas múltiples han sido descritas en el gen CCR5. El polimorfismo CCR5 $\Delta 32$  secuenciado en individuos aleatoriamente expuestos no infectados en 1996, fue el primer alelo mutante del gen CCR5 identificado, y mejor alelo de restricción del hospedero caracterizado asociado con SIDA (49). La mutación consiste en una deleción en una región correspondiente al segundo "loops" extracelular del receptor (Fig. #14). Esta mutación ha sido posiblemente causada por desprendimiento replicativo debido a la presencia de un flanqueo repetitivo de la región delecionada. Este mutante codifica un receptor con sólo cuatro segmentos transmembranosos. Como se

esperaba de la estructura truncada, la mutación  $\Delta 32$  no es funcional como un receptor de quimiocina: este no es expresado en la superficie celular, en poblaciones de leucocitos naturales, o sobre línea de células transfectadas. El receptor truncado inapropiadamente plegado es retenido en el retículo endoplasmático, donde puede ser detectado por anticuerpos monoclonales. El mutante CCR5  $\Delta 32$  es también un receptor defectuoso. Los homocigotos para la mutación  $\Delta 32$  son altamente protegidos contra la infección del VIH y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos homocigotos son no infectadas con cepas de VIH-1 trópico M, mientras la entrada e infección por cepas trópicas-T es inalterado. La resistencia de homocigotos  $\Delta 32$  al VIH ha contribuido grandemente a la demostración del rol central del CCR5 como un correceptor para cepas VIH-R5. La fuerte protección de los homocigotos fue confirmada en estudios subsecuentes, incluyendo situaciones de contacto parenteral masivo con el virus, pero pocos individuos seropositivos han sido reportados como homocigotos para  $\Delta 32$ , demostrando que la protección es incompleta incluso en recién nacidos homocigotos a la mutación  $\Delta 32$  nacidos de madres VIH positivas (48, 49). En algunos de estos casos, la cepa del VIH-1 fue caracterizada usando exclusivamente CXCR4 como correceptor (48, 49, 57).



**Figura #14.** Diagrama de la molécula llave de la membrana, CCR5. La flecha indica el comienzo de la región afectada por la mutación  $\Delta 32$ . Adaptado de Carrington *et al.*, 1997

Estos casos raros de transmisión inicial y propagación de virus VIH-X4 además subraya el papel preponderante jugado por el CCR5 y los virus R5 en la iniciación de la infección por VIH y la paradoja de la transmisión o evolución ineficiente de los virus X4 a pesar de la expresión constitutiva de CXCR4 en las células expresando CD4 y la abundancia de estas células blanco para el VIH (42, 48, 57, 70).

Los heterocigotos para el alelo tienen niveles reducidos de receptor CCR5 cuantificables en su superficie celular y estaban presentes en frecuencias similares en cohortes infectadas y controles no infectados. Los heterocigotos fueron encontrados para mostrar una progresión lenta a estados clínicos de SIDA (44, 45, 46, 47, 48, 57). Esta asociación fue encontrada en la mayor parte de las cohortes, pero no en todas (68, 69). Algunos estudios sugieran que los heterocigotos pueden ser protegidos parcialmente contra la infección VIH, pero esto no fue confirmado en otros numerosos estudios, y este efecto debe ser considerado como leve. Puesto que los heterocigotos para el alelo  $\Delta 32$  representa arriba del 30% en algunas poblaciones, puede haber un impacto significativo sobre la progresión promedio a SIDA en estas poblaciones (44, 45, 46). La heterocigosidad  $\Delta 32$  fue también asociada con una tasa baja de desarrollo de linfomas no Hodgkin en pacientes con SIDA, aunque el mecanismo no es todavía aparente (48).

La frecuencia de la mutación CCR5  $\Delta 32$  fue investigada en la mayoría de las poblaciones alrededor del mundo. La mutación es frecuente en poblaciones europeas, con un gradiente en declive de Norte a Sur. Las frecuencias del alelo más altas (15 – 16%) son encontradas en la Rusia nórdica, Finlandia, Suecia e Islandia. Las frecuencias alélicas alrededor del 10% son encontradas cruzando los principales países del Oeste y Centro de Europa (45, 74), mientras las frecuencias más bajas (4 – 6%) son encontradas en los países del Sur como Portugal y Grecia (45). Las frecuencias de alelos son cerca de 2% en el Norte de África y la mutación  $\Delta 32$  no es encontrada en el Oeste y Centro de



África (74). Las frecuencias también caen hacia el Este. Las frecuencias bajas son encontradas en el Oriente Medio, India y este alelo está ausente en China y Japón (74). En otras partes del mundo, la mutación  $\Delta 32$  es encontrada como una medida de inmigración y lo mezcla con poblaciones de origen europeo. En afro-americanos, una frecuencia del alelo de cerca de 2% es atribuida a la mezcla (48).

La distribución limitada del alelo  $\Delta 32$  sugiere que esta mutación ocurrió sólo una vez en la historia de las poblaciones humanas, y relativamente reciente. Esta hipótesis fue probada por análisis genético de marcadores polimórficos localizados en la vecindad del gen CCR5. El estudio de microsatélites localizó 11Kb "corriente arriba" y 68Kb "corriente abajo" de la deleción del CCR5 permitiendo demostrar un desequilibrio de unión fuerte, el alelo  $\Delta 32$  será asociado a una frecuencia alta con alelos microsatélites que fueron de otro modo raros en la población (45). Está confirmado el origen único de la mutación y permite estimar la edad del gen mutante desde el número de cruzamientos y mutaciones de microsatélites que han ocurrido a través de la historia sobre los cromosomas que llevan el alelo  $\Delta 32$ . Esto conduce a un aproximado de cerca de 2000 años desde el evento mutacional original (42, 48). Otro estudio basado en el análisis de marcadores polimórficos localizados a gran distancia de CCR5, y sobre un análisis estadístico de haplotipos proporcionó un estimado de cerca de 700 años (42, 74). Otro análisis genético ha desde entonces confirmado que el alelo  $\Delta 32$  es claramente reciente en la evolución de los haplotipos CCR5 al contrario del alelo V64I de CCR2 (48). Datos recientes han demostrado la existencia de la mutación  $\Delta 32$  en los restos de un esqueleto humano de 2,900 años de edad, encontrados en sitios de entierros diferentes de la Edad de Bronce en el Centro de Alemania y al Sur de Italia, demostrando que el alelo es algo más viejo que el deducido del primer análisis genético (73).

El descenso de la frecuencia del alelo  $\Delta 32$  a través de factores geográfico – climático. Además del origen probable del alelo mutante en Europa del Norte, y la presente distribución con frecuencias altas en Islandia, Reino Unido y Bretaña (región de Francia), ha conducido a la sugerencia que las incursiones de los Vikingos contribuyeron al esparcimiento o diseminación del alelo desde el octavo a décima centuria o siglo (48, 75).

Un elemento a favor de una presión selectiva llegó de estudios de poblaciones israelitas. El alelo  $\Delta 32$  es encontrado en judíos Askenazi con una frecuencia (13%) semejantes a aquellas derivadas en poblaciones de Europa del Norte, mientras es raro (3%) en poblaciones israelitas no Askenazi. La determinación de haplotipo confirmó el origen unitario del alelo  $\Delta 32$  en poblaciones judías y no judías. De estos datos, los autores concluyen que la mutación  $\Delta 32$  debió moverse dentro de las Askenazi por mezcla con las poblaciones en la cual ellos vivieron por siglos en el Norte de Europa. Sin embargo, como la mezcla no pudo responder por la frecuencia alta de  $\Delta 32$  (cuando comparó otros genes que han sido estudiados en este contexto), la selección del alelo es esperada teniendo lugar en paralelo para que ocurra en nativos europeos del norte (48, 75).

La naturaleza de la presión selectiva sin embargo ha permanecido especulativa. La pandemia de VIH es ciertamente también reciente para haber ejercido una presión selectiva. La presión impuesta por otros patógenos infecciosos sobre la selección del alelo  $\Delta 32$  ha sido sugerida. La plaga Bubónica, la cual golpeó a Europa en epidemias largas (Muerte Negra y la Gran Plaga, siglos XIV y XVII respectivamente) que provocaron la muerte a un estimado de 25 – 40% de la población europea general (Muerte Negra), ha sido incriminada (48, 74, 77). Sin embargo, a pesar de la tasa de mortalidad alta y víctimas debidas a la plaga en Europa, es improbable que la infección que se extendió sobre un período relativamente corto de tiempo (aproximadamente 4 siglos) y

virtualmente desapareció de Europa a mediados del siglo XVIII pudiera elevar la frecuencia del alelo a los niveles actuales. Dos reportes recientes mostraron que no hay diferencia en la supervivencia al reto con *Yersinia pestis*, el agente causal de la peste bubónica, en ratones deficientes de CCR5 cuando se comparó a animales tipo salvaje a CCR5, aunque en uno de los reportes se encontró una captación reducida de *Y. pestis* por macrófagos deficientes de CCR5 *in vitro* (76). Es más, la frecuencia de la variante  $\Delta 32$  en víctimas de la plaga pandémica del siglo XIV en Alemania no fue significativamente diferente de aquella observada antes de la pandemia, o al presente en la misma región, sugiriendo que la plaga no contribuyó a la selección, y si las hay, ocurrió más temprano que el siglo XIV (74, 76).

La posibilidad que la selección positiva para el alelo  $\Delta 32$  fue la consecuencia de epidemias debido a infecciones virales fue propuesta más recientemente (74, 76). En el rol jugado por un virus letal y hemorrágico, usando CCR5 para entrar a células hospederas, que habría golpeado a Europa durante la Edad Media fue especulado, sin mucha evidencia apoyando esta hipótesis. Ejemplo de virus que afectaron a Europa tenemos, la viruela *Variola major* que infectó poblaciones europeas al menos por más de 2,000 años y la epidemia afligió particularmente poblaciones escandinavas. La viruela se disemina directamente entre humanos e induce un debilitamiento con presencia de bubas o úlceras en toda la piel provocando un debilitamiento especialmente entre los individuos más jóvenes, inmunológicamente vírgenes de la población. Notablemente el CCR5 es usado del mismo modo que el VIH, como un receptor por mixoma, un poxvirus que infecta leucocitos. Se piensa que la viruela comparte el uso del CR5 con el mixoma y por eso, el mutante CCR5  $\Delta 32$  puede conferir una ventaja selectiva contra la infección de la viruela. Así la persistencia de la infección de la viruela hasta el siglo XX y la alta mortalidad entre individuos con el potencial reproductivo más alto, han sido propuestas

para responder la selección positiva del mutante  $\Delta 32$  y la frecuencia alélica alta observada en poblaciones caucásicas, particularmente los países nórdicos (74, 76).

La hipótesis con respecto a la selección del alelo CCR5  $\Delta 32$  fue apoyado por su origen reciente y desequilibrio de unión en el locus. Sin embargo, un reporte reciente desafió abiertamente la selección positiva del mutante CCR5  $\Delta 32$ , basada en datos obtenidos de genotipificación de polimorfismos de nucleótidos únicos de alta densidad (SNP) alrededor del CCR5 en poblaciones múltiples. La evolución de datos con la ayuda de nuevos mapas genéticos sugiere que el CCR5  $\Delta 32$  no difiere del resto del genoma en términos de distribución de frecuencia alélicas, diferenciación de población o desequilibrio de unión. Este trabajo situó el origen de la mutación 5,000 años antes de Cristo. Por lo que concluyen que sus datos no apoyan la existencia de una selección fuerte del mutante  $\Delta 32$ , aunque tal selección no pudo ser excluida. Una alternativa a la selección ha sido también propuesta en relación a la migración de poblaciones humanas. Fue claramente descrito que una mutación originada en el frente de la onda de una población delatada puede viajar con este frente de onda y generando poblaciones llevando el alelo mutante con frecuencias altas en sitios distantes de la locación donde ocurrió la mutación (48).

#### **B. CCR2-64I**

Una sustitución de valina a isoleucina en la posición 64 (V64I o G190A) en la primera región transmembranosa de CCR2 ha sido asociada con demora de la progresión a SIDA por aproximadamente 2 a 4 años que los individuos homocigotos portadores del alelo salvaje (48, 50, 53, 67). La frecuencia del alelo no varió mucho entre poblaciones con una frecuencia promedio de 6 - 17% (47, 83). El CCR2-64I no ha influido en la incidencia de la infección del VIH, pero los heterocigotos para este alelo fueron encontrados

mostrando progresión lenta a SIDA que los homocigotos para el alelo tipo salvaje (52). Algunos estudios han confirmado la asociación del alelo CCR2-64I con la lenta progresión de la enfermedad (52, 53, 78, 80), otros no (79). Un estudio reportó un efecto protector de la variante 64I en afroamericanos, pero no en caucásicos (52). Aunque el efecto del alelo CCR2-64I ha sido controversial, una meta-análisis colectando todos los estudios disponibles en 2001 concluyó un efecto significativamente protector de este alelo en la progresión de la enfermedad (48). La magnitud de la protección entre heterocigotos y homocigotos combinado fue en el mismo rango que la observada para heterocigotos CCR5  $\Delta$ 32 (46, 47, 48).

Como el CCR2 es usado como un correceptor sólo por unas pocas cepas, es imposible que el efecto de la mutación sea semejante al del CCR5  $\Delta$ 32. Por otra parte, la sustitución V64I en un dominio de transmembrana es conservado, y el CCR5 contiene una isoleucina en la posición correspondiente, así que la primera  $\alpha$ -hélice del mutante CCR2 es idéntico a ese del CCR5-1. El CCR2-64I fue mostrado para mantener su propiedad funcional en términos de unión a quimiocinas activación de la cascada intracelular y la función de correceptor. Los leucocitos expresan niveles normales de mutante CCR2, y la expresión CCR5 no fue modificada en células co-expresando CCR2-64I (81). Análisis cuidadosos no permiten demostrar una asociación entre el alelo V64 y el nivel de expresión del CCR5, en ensayos *in vivo* o *in vitro* (48).

### **C. LA ORGANIZACIÓN DEL GEN CCR5 Y LAS VARIANTES DE SU PROMOTOR**

Polimorfismos adicionales en la región 5' reguladora *cis* ha sido definido que afecta la susceptibilidad a la infección del VIH-1 y desarrollo a SIDA. Los polimorfismos de nucleótidos únicos, predominantemente en la región del promotor de CCR5, el gen ha sido organizado dentro de un número de haplotipos (Fig. #15). La variante  $\Delta$ 32 no

explica la mayoría de los individuos expuestos no infectados, ni los no progresores de largo término. La expresión del CCR5 es conocida por ser altamente variable y la eficiencia de la infección *ex vivo* ha sido claramente correlacionada con niveles de expresión del CCR5, ilustrado *in vivo* por la progresión lenta de heterocigotos para la mutación  $\Delta 32$ . Varios grupos han por eso investigado variantes del promotor, y su correlación con la progresión a SIDA, con el objetivo de descubrir el sustrato genético para la variabilidad de la expresión del CCR5 (48, 67).

Un número de variantes del promotor han sido descritas, todas consisten en sustituciones de base única en la región del promotor corriente baja (downstream) - Pd, el primer exón del transcrito mayor o el siguiente intrón (48). Un número de haplotipos fue determinado, y estos fueron asociados con regulación transcripcional diferencial, así como varios polimorfismos afectan los sitios de unión de factores transcripcionales como NF-kB. La frecuencia de los haplotipos del CCR5 en varias poblaciones fue estimado, y su asociación con la progresión a SIDA analizado (48). Incluyendo las variantes  $\Delta 32$  y CCR2 -64I, identificados como los haplotipos principales en caucásicos, uno de ellos (CCR5P1) asociado con progresión a SIDA (85). Los individuos transportando los alelos tipo salvaje CCR5 y CCR2 y homocigotos para CCR5 PI fueron encontrados a progresar más rápidamente a SIDA (48). A pesar de las diferencias sorprendentes en la expresión de CCR5 fue encontrado dentro de individuos transportando cada genotipo, las pruebas comparativas funcionales de las regiones de los promotores codificado polimorfismo, o midiendo directamente la expresión de CCR5 sobre las células blancas del análisis de voluntarios sanos transportando los genotipos P1/ P1, P1/P4 o P4/P4, no permitieron demostrar modificaciones significativas de los niveles de expresión del CCR5 (88). Similarmente, una asociación con progresión de enfermedad fue también reportada para

un polimorfismo A/G localizado en el primer intrón de CCR5 (59029pb, Gen-bank U95626) (88).

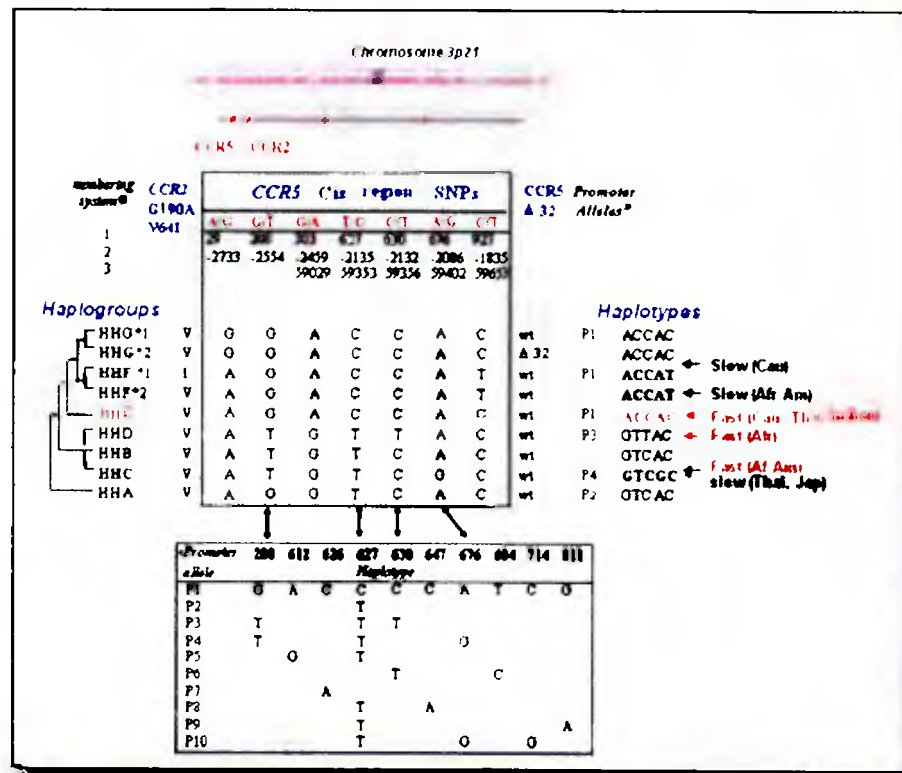


Figura # 15. Organización de los haplotipos CCR2 y CCR5 sobre el cromosoma 3p21 y su asociación con la progresión de la enfermedad. Adaptado de Kaur G, Mehra M; 2007.

En la ausencia de mutaciones  $\Delta 32$  o 64I, los individuos 59029 A/A progresan más rápidamente a SIDA y/o muerte (87, 88). Un sistema de expresión gen-reportero mostró actividad transcripcional reducida para la región del promotor codificando la sustitución 59029G, y este alelo fue asociado con baja expresión de CCR5 sobre PBMC. Como el polimorfismo 59029 A/G es uno de los principales determinantes del alelo P1 (303 Q/G), las conclusiones de estos estudios son esencialmente concordantes (37, 48, 87, 88).

Un polimorfismo A/G en la par de base 59029 en el promotor CCR5 fue identificado y parece afectar la tasa de progresión a SIDA en pacientes infectados con VIH-1. El genotipo CCR5-59029 G/G parece ser relativamente protector que CCR5-59029 A/A, y

su efecto puede ser el resultado de una producción reducida de RNAm. El alelo A exhibe un 50% de expresión más alta de CCR5 *in vitro* y confiere progresión a la enfermedad más rápido que el alelo G. Esos resultados indican que el sitio en el promotor del CCR5 es importante y puede ser un blanco útil para el tratamiento de la infección del VIH-1(48, 57), lo que hoy en día se utiliza como apoyo en el tratamiento contra el VIH/SIDA, bloqueadores de CCR5 – Maraviroc (86).

Otros estudios han identificado haplotipos adicionales que dividen además el haplotipo P1/59029 A: HHG\*1, HHG\*2 (transportando el alelo  $\Delta$ 32), HHF\*1, HHF\*2 (unido al alelo CCR2-64I) y HHE (48, 67) (Fig. #15). Los caucásicos son caracterizados por frecuencias altas de un número pequeño de haplotipos (HHC/P4, HHE y para un grado más bajo HHG\*2 y HHF\*2), mientras las poblaciones originarias de África muestran una distribución de patrones más ampliamente dispersos de haplotipos. El HHG\*2 y HHF\*2 han sido asociados a una progresión lenta en población caucásica y afro-americana posiblemente por el efecto protector de  $\Delta$ 32 y CCR2-64I, respectivamente (67).

Además, otros estudios han mostrado que el espectro de haplotipos CCR5 asociados con aceleración o retardo de la enfermedad difiere entre Afro-Americanos y Caucásicos. Como un ejemplo, el alelo CCR2-64I fue asociado con progresión retrasada a SIDA en afro-americano, pero no en caucásicos. También, el haplotipo HHE (incluido en P1) fue asociado a progresión rápida en Caucásicos, pero no en afro-americano, mientras el haplotipo HHC (P4) fue letal para afro-americanos, pero con progresión lenta de la enfermedad en población tailandesa (48, 67). El efecto fenotipo de  $\Delta$ 32 fue también mostrado dependiente, en gran parte en la identificación del alelo compañero. En acuerdo con esto fue recientemente demostrado que la combinación de los haplotipos



CCR5  $\Delta$ 32/-2459 A y CCR5wt/2459G resulta en expresión relativamente débil de CCR5, y protección significativa contra la transmisión del VIH (48).

Dado el efecto de las variantes del promotor CCR5 sobre la expresión del receptor y potencialmente sobre la defensa del hospedero contra los patógenos, este locus fue analizado para detectar señales de selección en favor de alelos específicos. Variantes y haplotipos fueron caracterizados en la región regulatoria S1 del gen CCR5 en 400 cromosomas de las poblaciones de todo el mundo (48).

La densidad de polimorfismo de nucleótidos únicos (SNPs= single nucleotide polymorphisms) fue más elevada que lo esperado, y caracterizado por un exceso de alelos de frecuencia intermedios. Junto con el análisis de la genealogía de los haplotipos CCR5, estos datos sugieran que la selección balanceada fue aplicada al locus MHC, favorece los heterocigotos sobre los homocigotos, y el mantenimiento a largo término en la población de una variedad de alelos (48). Cuando aplique a CCR5, es el resultado de cambios adaptativos y patógenos sobre la historia del gen. La presión selectiva aplicó a haplotipos del promotor CCR5 fue también sugerida desde la comparación del secuencias del promotor de una variedad de especies de primates (48). A pesar del incremento evidente de los haplotipos CCR5 conectados, la expresión del CCR5 y la progresión de la enfermedad del VIH, es posible que parta de lo observado en la expresión de variantes interindividuales del CCR5, si genéticamente determinado, puede confiar en la actividad de los factores trans-actantes más que la integridad de los elementos cis-regulatorios. Su observación también posible que la haplotipos del promotor CCR5 correlacione con progresión a SIDA represente marcadores genéticos para otras variantes genéticas no identificadas sobre el cromosoma 3 (48).

#### **D. LA VARIANTE SDF1-3'A**

El gen *SDF1* tiene 10 kb de longitud y está localizado en el cromosoma 10p11.1. Existe en dos isoformas: alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) obtenidas como una consecuencia de empalme alternativo (67). El SDF1 es una poderosa citoquina quimio-atrayente, es el ligando natural de CXCR4 (23). El SDF1- $\alpha$  es capaz de hacer una regulación baja del CXCR4 sobre las células por inducción de la endocitosis, bloqueando efectivamente la infección por virus con tropismo T pero no para cepas VIH-1 con tropismo M.

La alteración de la región codificante CCR5 y su relación a la resistencia al VIH-I ha estimulado la búsqueda para otras mutaciones en genes claves codificando correceptores o ligandos de correceptores. Ninguna mutación ha sido reportada afectando la estructura primaria de CXCR4 o SDF-1, de acuerdo con el rol de esas proteínas durante el desarrollo. Una variación en una región no codificante del transcrito codificante SDF-1 $\beta$  fue sin embargo descrita (23). Una transición de G a A (SDF1-3'A) fue encontrado en la posición 801 relativa al codón de inicio ATG, dentro del transcrito de 3,526 pb (23, 67). La hipótesis más simple para la acción del SDF1-3'A está envuelto en un regulación aumentada de la cantidad de proteína SDF1 disponible para la unión a CXCR4 y detener la aparición de cepas de VIH-1 con tropismo a T comunes en el estado tardía de la enfermedad (23). Este alelo fue encontrado para mostrar frecuencias variables en poblaciones mundiales, las frecuencias más altas siendo encontradas en poblaciones Asiáticas (25 – 35%) y particularmente Oceanía (50 – 70%) (82). En el estado homocigoto, SDF1 – 3' A/3' A fue reportado demora en el comienzo de SIDA (23). Los individuos heterocigotos mostraron tasa de progresión similar a los homocigotos para el alelo tipo salvaje (23). Eso sugiere que incrementa la estabilidad de los transcritos de SDFI podría explicar el fenotipo, resultando en producción más alta de SDF-1 e inhibición de la entrada de las cepas usando CCR4. Como tales un efecto sería sin embargo

esperado para ser dominante más que recesivo. Además, las modificaciones de estabilidad o eficiente transducción para las variantes de transcritos SDF-1 podrían no ser demostrados (48).

Otros estudios sugieren una asociación del genotipo SDF1-3'A/3'A con progresión acelerada a SIDA (52), pero sobrevida prolongada siguiendo el diagnóstico del SIDA fue reportados en otro (48). En otros reportes no encuentran ninguna asociación con progresión de la enfermedad por VIH-1 (88). Un meta-análisis colectando información de todos los cohortes disponibles concluyó la ausencia de efecto del alelo SDF1-3'A en la progresión a SIDA, y sugiere que la protección relativa observada en el reporte original fue posiblemente debida a casualidades (48, 88).

# **CAPÍTULO III**

## **DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **I. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la distribución de los polimorfismos en SDF1-3'A, CCR5-Δ32, CCR5-59029, y CCR2-V64I en personas infectadas con el VIH-1 y los efectos de la progresión de la enfermedad en sujetos panameños infectados con VIH-1 por vía perinatal.

### **II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer la frecuencia de los polimorfismos en SDF1-3'A, CCR5-Δ32, CCR5-59029, y CCR2-V64I en personas infectadas con el VIH-1.
2. Correlacionar los polimorfismos en SDF1-3'A, CCR5-Δ32, CCR5-59029, y CCR2-V64I con el grado de disminución inmune en los sujetos infectados por vía perinatal.
3. Correlacionar polimorfismo SDF1-3'A, CCR5-Δ32, CCR5-59029, y CCR2-V64I con la replicación viral en los sujetos infectados con VIH-1 perinatalmente.
4. Evaluar el efecto de los polimorfismos en SDF1-3'A, CCR5-Δ32, CCR5-59029, y CCR2-V64I y su relación con la progresión a muerte en los sujetos infectados con VIH-1 perinatalmente.

### **III. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La presencia de polimorfismos SDF1-3'A, CCR5-Δ32, CCR5-59029, y CCR2-V64I disminuye la progresión de la enfermedad en pacientes VIH positivos por transmisión perinatal.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El estudio se centra en conocer la frecuencia genotípica de ciertos polimorfismos genéticos en sujetos infectados con el VIH por transmisión perinatal y en sujetos adultos infectados con VIH-1 en Panamá. Al mismo tiempo, determinar si la presencia de alguno de los polimorfismos confiere a los pacientes VIH positivos algún grado de protección en la progresión de la enfermedad con respecto a paciente que no la posean. Para determinar algún tipo de relación debemos conocer alguna de las variables que servirán de herramienta estadística para la obtención de curvas de supervivencia tales como, conteo de CD4, presencia de infecciones oportunistas, carga viral VIH-1, tiempo de infección, y uso de tratamiento antirretroviral para el VIH-1.

Este es el primer estudio que se realiza en América Central y Panamá para determinar presencia de factores genéticos y sus efectos en la progresión de la enfermedad a SIDA o muerte en individuos infectados perinatalmente. Con este estudio hay el compromiso de publicar los datos relevantes para beneficio de los pacientes que desde el inicio de su existencia son infectados con el VIH-1, para que pueda ser usado como herramienta para el clínico como factor pronóstico genotípico de la infección del VIH-1.

Existen muchos factores genéticos que pueden influir en la historia natural del VIH-1, analizaremos cuatro para tener un conocimiento preliminar y esperamos aportar información relevante para un mejor manejo de los pacientes que en ocasiones por desconocimiento de los padres o por carecer de un adulto responsable que los conduzca a las instalaciones de salud no son atendidos con la regularidad que su enfermedad requiere, siendo su herencia lo único que los mantiene con vida hasta que acudan a recibir la atención adecuada y si lo amerita, el tratamiento correspondiente.

## **V. METODOLOGÍA**

### **A. Tipo de Estudio**

Retrospectivo de cohorte. Las muestras de archivo correspondían a niños y adolescentes infectados con VIH perinatalmente desde 1992 a junio de 2009 y que no recibieron terapia antirretroviral (TARV) desde el momento de nacer, si no desde que presentaron un problema clínico por lo que requirieron su uso. Además de muestras de archivo de sujetos adultos infectados con VIH-1, desde 2001 a 2009.

### **B. Universo de Estudio:**

Hijos de mujeres VIH positivas nacidos de 1992 a junio de 2009 y a quienes se les compruebe infección por VIH-1 transmitida por vía perinatal y adultos infectados con VIH-1.

### **C. Sujetos de Estudio**

El Hospital del Niño es el centro de atención infantil más complejo en Panamá y el mayor número de los pacientes de nuestro estudio provienen de su Unidad de Infectología Pediátrica, la cual es responsable de la atención de los niños y adolescentes infectados con VIH/SIDA. Los otros niños o adolescentes del estudio son pacientes del Hospital Materno-Infantil José Domingo de Obaldía de la Provincia de Chiriquí y Albergue María y el Hospital José Amador Guerrero de la Provincia de Colón. Del Hospital Santo Tomás fueron enviados los sujetos adultos VIH-1 positivos.

Las 74 muestras de sangre usadas para la determinación de los polimorfismos en SDF1-3'A, CCR5-Δ32, CCR5-59029, y CCR2-V64I fueron muestras de archivo que provenían de pacientes infectados por transmisión perinatal y con un adecuado historial de seguimiento de las clínicas de VIH de los respectivos Centros de Atención Médica.

Las muestras de los pacientes fueron divididos en tres grupos; asintomático, sintomático y SIDA, según los criterios de CDC para infantes viviendo con VIH/SIDA basados en el conteo de CD4 y enfermedades oportunistas (Anexo 1 y 2). Los datos obtenidos de los pacientes inician desde el año 1992 hasta el 2009. Durante el tiempo del estudio, 10 pacientes fallecieron debido a enfermedades relacionadas a SIDA (síndrome de desgaste). Los registros médicos y resultados de carga viral, CD4 y genotipaje fueron manejados a través de códigos anónimos introducidos en una base de datos confeccionada en el programa de Access de Microsoft Office.

Las doscientos veintitrés muestras de sangre de los sujetos adultos usadas para la determinación de los polimorfismos en SDF1-3'A, CCR5-Δ32, CCR5-59029, y CCR2-V64I fueron muestras de archivo que provenían de pacientes infectados con VIH-1.

#### D. Consideraciones Éticas

Este estudio es parte del **Protocolo valor pronóstico de la Neopterin en el progreso de la infección por VIH y su correlación con otros marcadores en pacientes VIH positivos de Panamá**, iniciado en el año 2005 y aprobado por el Comité Nacional de Bioética de la Investigación (Anexo 3). Como el protocolo en mención es retrospectivo de cohorte y evalúa muestras de archivo, no se necesita el consentimiento informado por parte del paciente. La confidencialidad será mantenida durante y después del estudio, y por ello, se trabajarán las muestras por código. Al final del estudio, se harán presentaciones para socializar con personal médico e investigadores los aportes de la investigación en lo concerniente a progresión de la enfermedad en pacientes viviendo con VIH/SIDA a nivel nacional e internacional.



#### E. Colección de sangre y procesamiento

La sangre periférica fue colectada en tubos con EDTA. Uno de los tubos fue utilizado para el conteo de los CD4, los otros dos fueron colectados y centrifugados para separar plasma y capa de glóbulos blancos. El plasma fue utilizado para llevar a cabo la determinación de la carga viral VIH-1 y los glóbulos blancos para la extracción de DNA genómico a utilizarse en los análisis genéticos de los polimorfismos. Todas las muestras de carga viral y genotipaje fueron almacenadas a -70 °C en ultra congeladores.

#### F. Conteo de CD4 y Estimación de la Carga Viral VIH-1

El conteo de linfocitos T CD4 fue determinado por citometría de dos colores (Cy5 - PE, CD3; y PE, CD4) usando anticuerpos monoclonales de Becton Dickenson; y citometría de dos colores (FITC, CD45; y PE, CD4, metodología Panleucogating) usando anticuerpos monoclonales de Beckman Coulter.

La carga viral de VIH-1 de cada paciente se establece a través de la determinación de los niveles de RNA VIH-1 ubicados en el plasma sanguíneo de los sujetos haciendo uso de la metodología de PCR tiempo real desarrollada por Roche (Cobas Ampliprep/TaqMan).

#### G. Extracción de DNA y Genotipificación

Para la extracción de DNA genómico de las muestras de glóbulos blancos congeladas utilizamos el protocolo comercial del kit de purificación de DNA genómico Wizard® (Promega Parte # TM050) (22), con algunas adecuaciones y que detallamos a continuación.

### Protocolo de Extracción de DNA

1. Adicione 900µl de solución de lisis de células a un tubo de microcentrífuga a 300µl de sangre.
2. Agite en el vortex por 10 segundos para mezclar la sangre con la solución de lisis de células.
3. Incube la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente (invirtiendo 3 veces durante la incubación) para lisar las células rojas. Pasado los 10 minutos, centrifugue a 13,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.
4. Remueva tanto sobrenadante como sea posible sin perturbar el sedimento blanco. Aproximadamente 10 - 20µl de líquido residual permanecerá en el tubo.
5. Repita el paso 1 al 4 una vez más hasta que el sedimento sea blanco. Este paso extra es muy común al usarse muestras congeladas.
6. Agite fuertemente en un vortex hasta que el sedimento blanco de glóbulos blancos esté resuspendido (15 segundos).
7. Adicione 300µl de solución de lisis de núcleo al tubo conteniendo las células resuspendidas. Homogenice la mezcla utilizando la misma punta de pipeta, suba y baje la mezcla 6 veces. Incube a 37 °C toda la noche con agitación de 500 rpm.
8. Al día siguiente, retire los tubos de la incubadora y adicione 100µl de solución de precipitación de proteínas al lisado nuclear, y agite fuertemente en un vortex por 20 segundos.
9. Centrifugue a 13,000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente.
10. Transfiera el sobrenadante a un microtubos de 1.5ml conteniendo 300µl de isopropanol a temperatura ambiente.
11. Suavemente mezcle por inversión hasta que aparezca hebras blancas de DNA y se forme una masa visible.

12. Centrifugue a 13,000 x g por 1 minutos a temperatura ambiente. El DNA se observa como un sedimento blanco.
13. Decante el sobrenadante, y adicione 300µl de etanol al 70% al sedimento de DNA. Invierta el tubo para lavar el sedimento de DNA y la superficie interna del microtubo. Centrifugue a 13,000 x g por 1 minutos a temperatura ambiente.
14. Cuidadosamente elimine el sobrenadante con una pipeta de transferencia. Luego, invierta el tubo sobre papel absorbente limpio y espere aproximadamente 15 minutos para que el sedimento de DNA seque completamente.
15. Adicione 100µl de solución de rehidratación al tubo y rehidrate el DNA incubando a 65°C por 1 hora con una agitación constante de 300 rpm.
16. Almacene el DNA a -70°C hasta el momento de su uso.

#### H. Amplificación, Corte Enzimático, Detección y Secuenciación

Todas las muestras extraídas fueron amplificadas con los cebadores específicos para cada marcador genético. En cada reacción de PCR se incluyeron dos controles negativos para asegurar que ningún contaminante fuera introducido en la PCR inicial.

Los cebadores usados en el estudio fueron:

CCR5d32F: 5'-GTGGTGACAAGTGTGATCAC-3'

CCR5d32R: 5'-TTGTAGGGAGCCCAGAAGAG-3'

SDF1-3AF: 5'-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3'

SDF1-3AR: 5'-AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC-3'

CCR2-V64IF: 5'-TTGTGGGCAACATGATGG-3'

CCR2-V64IR: 5'-CTGTGAATAATTTGCACATTGC-3'

CCR5\_59029F: 5'-CCCGTGAGCCCATAGTTAAACTC-3'

CCR5\_59029R: 5'-TCACAGGGCTTTTCAACAGTAAGG-3'.

La mezcla de reacción consiste de buffer de PCR, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de dNTPs, 0.5mM de cada cebador, y 0.625 unidades/reacción de TaqDNA polimerasa (Promega). Las condiciones de reacción fueron para (a) CCR5Δ32 una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, y entonces 35 ciclos a 92°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, y 72°C por 30 segundos y extensión final de 72°C por 10 minutos (23, 26), (b) las condiciones de la PCR para SDF1-3'A como en el caso anterior con temperatura de anidamiento de 58°C. Los productos de PCR fueron digeridos por 5 unidades de MspI/reacción de 20μl (Promega) a 37°C por 4 horas (23, 24), (c) las condiciones de PCR para CCR2-V64I como en el caso anterior con temperatura de anidamiento de 52°C. Los productos de PCR fueron digeridos por 5 unidades de BsaBI/reacción de 20μl (New England BioLabs®/Inc.) a 60°C por 4 horas (23, 25) y (d) las condiciones de PCR para CCR5-59029G/A como en el caso anterior con temperatura de anidamiento de 60°C. Los productos de PCR fueron digeridos por 5 unidades de Bsp1286I/reacción de 20μl (Promega) a 37°C por 4 horas (23, 37). Los productos de digestión de CCR5-59029G/A, SDF1-3'A, y producto de la PCR de CCR5Δ32 fueron visualizados en electroforesis de geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio. La digestión de CCR2-V64I fue visualizada en electroforesis de geles de agarosa al 3% con bromuro de etidio. Productos de PCR para el genotipaje de SDF1-3'A, CCR2-V64I, y CCR5-59029 fueron seleccionados al azar para el análisis de secuencia de nucleótido automatizada (Applied Biosystems Analizador Genético 3130) para asegurar la exactitud de las determinaciones por PCR-RFLP.

### I. Análisis Estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas que se encuentren serán comparadas y las diferencias evaluadas usando la prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y el equilibrio de Hardy-

Weinberg. Los valores de la actividad viral (carga viral) y el conteo de CD4 se compararán por las pruebas de Kruskal Wallis. Para comparar los valores de linfocitos T CD4 y carga viral del VIH-1 antes y después del tratamiento, se utilizará la prueba de Mann-Whitney. Finalmente, para determinar si existe relación entre los polimorfismos y el tiempo a desarrollar SIDA o muerte se analizarán a través de las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier y el modelo de regresión de Cox univariado utilizando como punto final el inicio del tratamiento. Cualquier valor de P menor o igual de 0.05 será considerado estadísticamente significativo.

# **CAPÍTULO IV**

## I. RESULTADOS

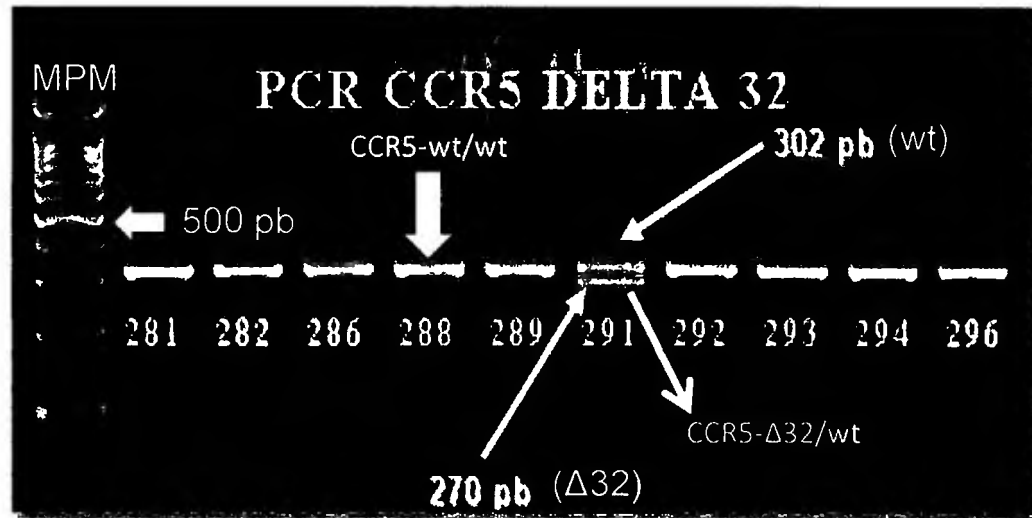
Un total de 74 pacientes VIH-1 por transmisión perinatal fueron seleccionados para determinar su genotipo a CCR5Δ32, CCR5-59029A/G, CCR2-V64I, y SDF1-3'G/A, de este total 32 correspondían al sexo femenino y 42, al masculino. La mediana para la edad fue de 8.5 (9 años), con un rango que va de 1 a 17 años (Tabla #4).

Cuarenta y tres pacientes (58.1%) fueron clasificados en la categoría clínica de sintomático; y cuarenta y dos (56.8%) en la categoría inmunológica uno (ver Anexo 1 y 2).

**Tabla #4. Características demográficas y clínicas de la población de estudio.**

<i>Número total de individuos (N)</i>	<b>74</b>	
<i>Género masculino</i>	42	
<i>Género femenino</i>	32	
<i>Edad media (rango)</i>	9 (1 – 17)	
<i>Categoría Clínica</i>	<b>N</b>	<b>%</b>
A	5	6.8
B	43	58.1
C	24	32.4
N	2	2.7
<i>Categoría Inmunológica</i>		
1	42	56.8
2	14	18.9
3	18	24.3

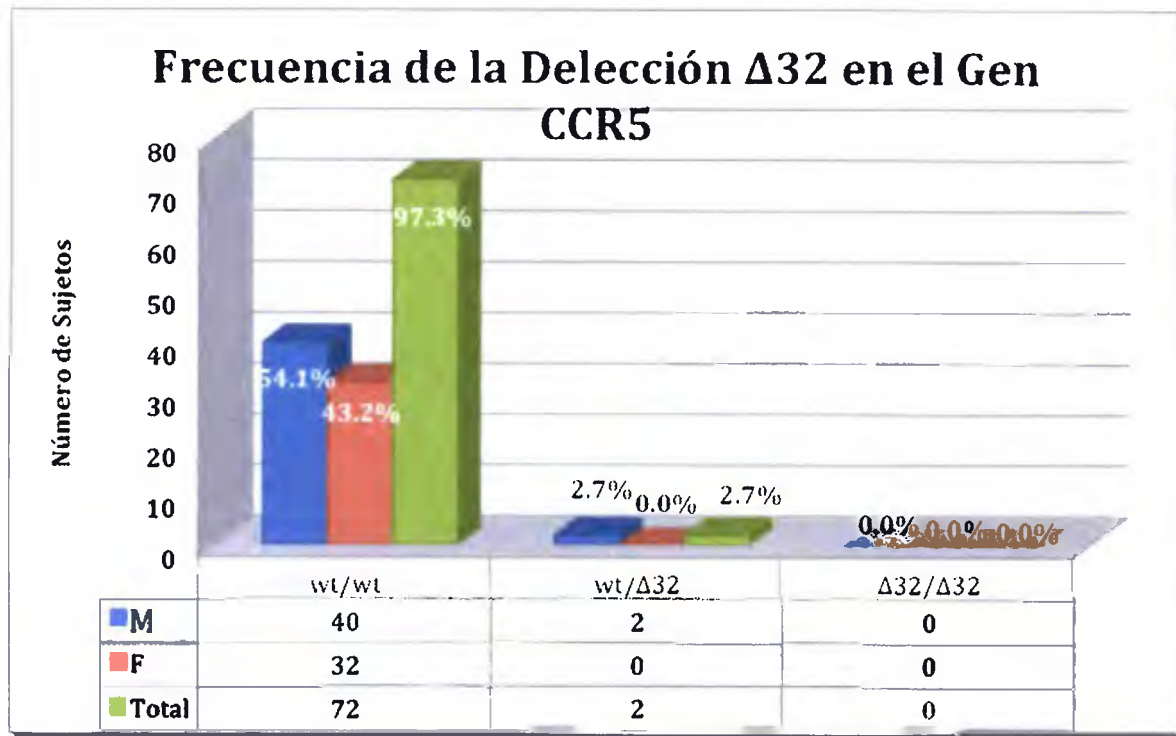
**CCR5 $\Delta$ 32:** Setenta y cuatro muestras fueron genotipificadas para la mutación CCR5 $\Delta$ 32 por PCR-RFLP. Dos heterocigotos (2.7%) fueron identificados, dando la frecuencia del alelo CCR5 $\Delta$ 32 en esta muestra de la población de 0.0135 (Tabla #5). La distribución del genotipo estaba en acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Un resultado típico de los genotipos CCR5wt/wt y CCR5-wt/ $\Delta$ 32 es presentado en la Figura #16. El tamaño del fragmento homocigoto tipo salvaje (wt) es de 302pb. Cuando hay presencia de la delección de 32 pb en el gen CCR5, se observa un fragmento de 270 pb.



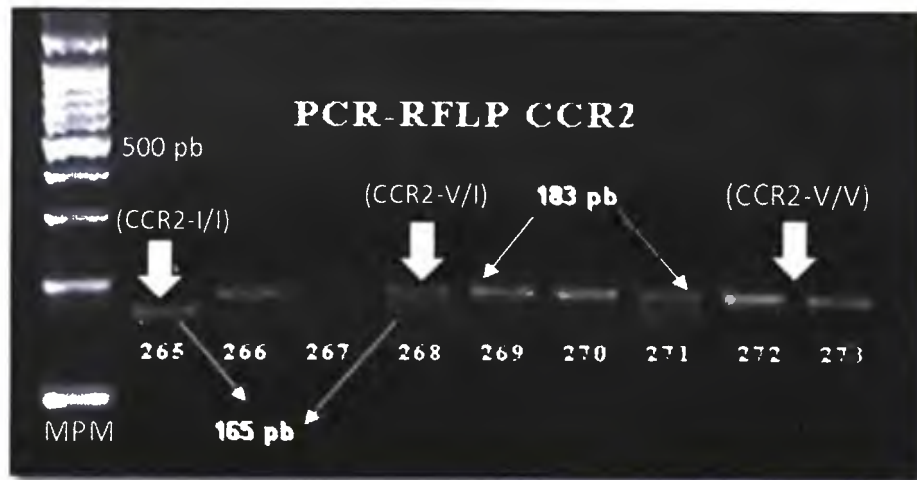
**Figura #16.** Imagen de una corrida electroforética en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio, donde se observa una muestra heterocigota (291) al polimorfismo CCR5 $\Delta$ 32 señalada con la flecha. El alelo wt amplifica un fragmento de 302 pb y el alelo con la delección ( $\Delta$ 32) uno de 270 pb. El marcador de peso molecular (MPM) corresponde a uno de 100 pb [1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500 (mayor intensidad), 400, 300, 200, 100 pb]. Los números del 281 al 296 corresponden al código de cada sujeto del estudio. wt = tipo salvaje



**Tabla #5.** Frecuencia del Polimorfismo delta 32 del gen CCR5 en sujetos infectados con VIH perinatalmente. Se dividió la población infantil en niños (barra azul) y niñas (barra roja), el total de sujetos es representado con la barra verde. Además, en la gráfica se muestran los porcentajes de los polimorfismos en el gen CCR5 para la delección  $\Delta 32$ .

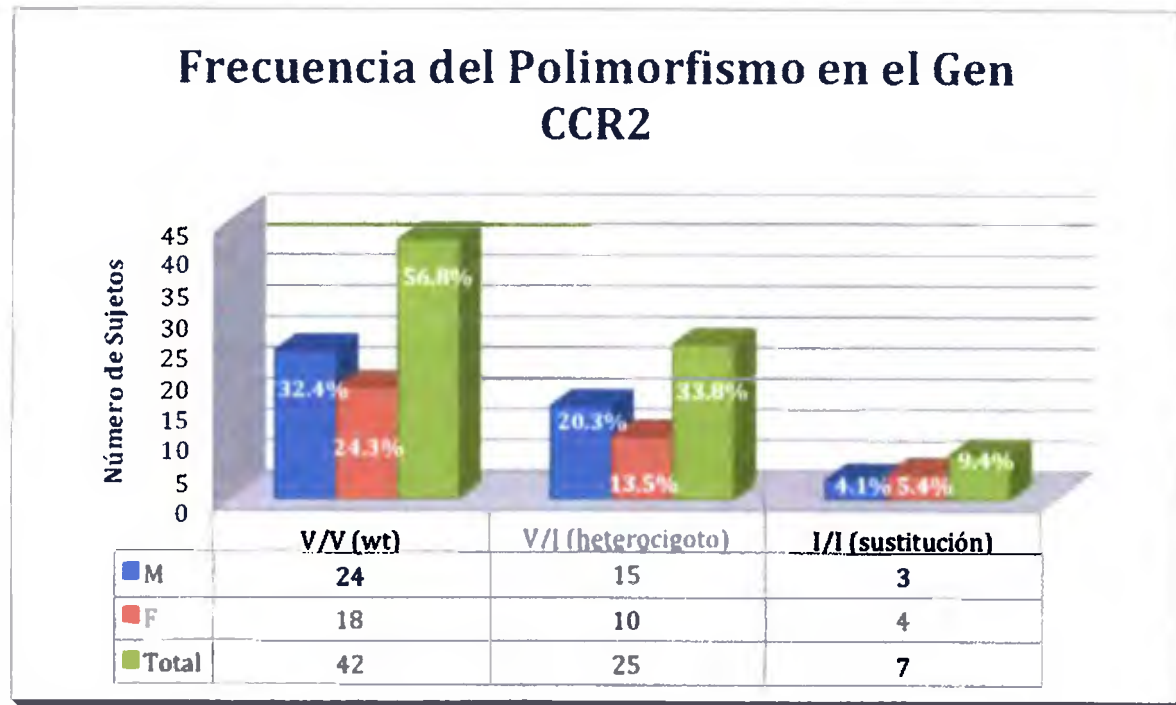


**CCR2-V64I:**- Setenta y cuatro muestras fueron genotipificadas para la mutación CCR2-V64I por PCR-RFLP. Veinticinco (56.7%) heterocigotos y siete (9.5%) homocigotos (Tabla #6) fueron identificados, dando una frecuencia del alelo CCR2-V64I en esta muestra de la población de 0.2635. La distribución del genotipo estaba en acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Un resultado típico de los genotipos CCR2-V/V, CCR2-V/I, y CCR2-I/I es presentado en la Figura #17. El alelo tipo salvaje no es digerido por *BsaBI* observándose un fragmento de 183 pb; y en el caso del alelo mutado si es cortado en dos fragmentos de 165 y 18 pb. Este último fragmento no es observado en el gel de agarosa por su reducido tamaño.

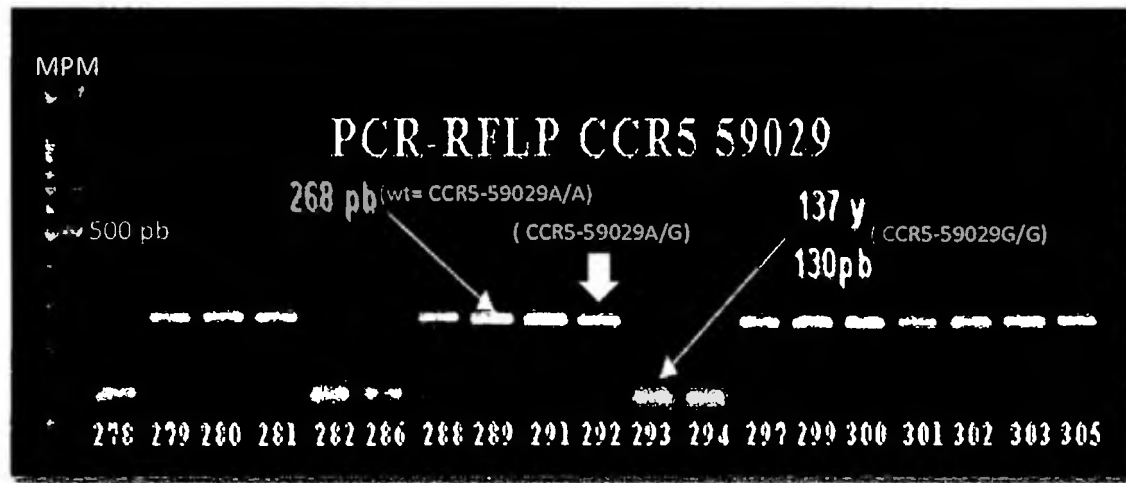


**Figura #17.** Imagen de una corrida electroforética en un gel de agarosa 3% teñido con bromuro de etidio, donde se observan 5 muestras homocigotas a CCR2-V (muestras 266, 269, 270, 272 y 273), 2 muestras heterocigotas a CCR2-V/I (muestras 268 y 271), y una muestra homocigota a CCR2-I (muestra 265). El alelo wt (CCR2-V amplifica un fragmento de 183 y el alelo con la sustitución y digerido con BsaBI, es de 165 pb. Marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb.

**Tabla #6.** Frecuencia del Polimorfismo en el gen CCR2 en sujetos infectados con VIH perinatalmente. Se dividió la población infantil en niños (barra azul) y niñas (barra roja), el total de sujetos es representado con la barra verde. Además, en la gráfica se muestran los porcentajes de los polimorfismos en el gen CCR2.

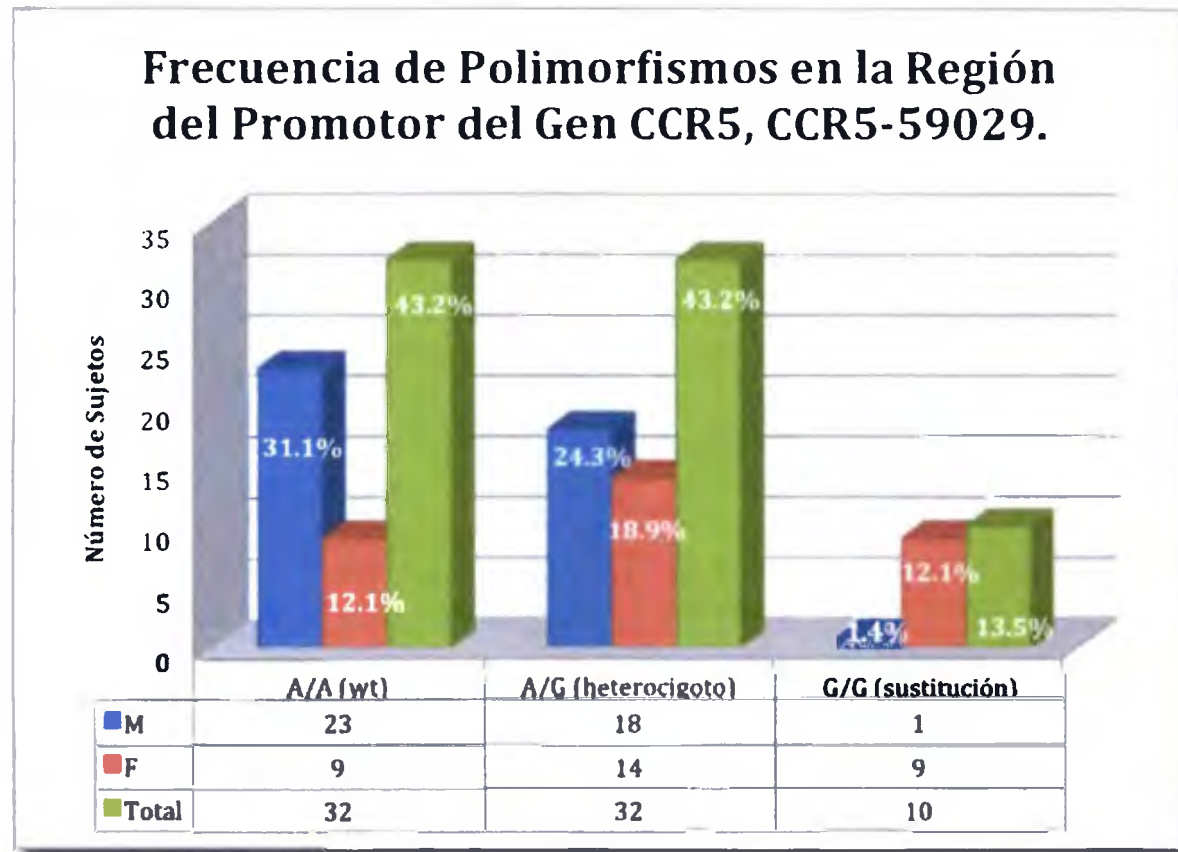


CCR5-59029A/G:- Setenta y cuatro muestras fueron genotipificadas para la mutación CCR5-59029A/G por PCR-RFLP. Treinta y dos (43.3%) heterocigotos y diez (13.5%) homocigotos (Tabla #7) fueron identificados, dando una frecuencia del alelo CCR5-59029G en esta muestra de la población de 0.3514. La distribución del genotipo estaba en acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Un resultado típico de los genotipos CCR5-59029A/A, CCR5-59029A/G, y CCR5-59029G/G es presentado en la figura #18. El alelo tipo salvaje no es digerido por *Bsp1286I* observándose un fragmento de 268 pb; en el caso del alelo mutado este es cortado en dos fragmentos, 130 y 137 pb. Por otro lado en los sujetos heterocigotos se observan tres fragmentos: 268, 137, y 130 pb.



**Figura #18.** Imagen de una corrida electroforética en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio, donde se observan 5 muestras homocigotos (278, 282, 286, 293, 294) a CCR5-59029A, 9 muestras heterocigotas (279, 280, 281, 288, 292, 297, 301, 302 y 305) a CCR5-59029A/G, y 5 muestras homocigotas (289, 291, 299, 300 y 303) a CCR5-G. El alelo wt (CCR5-59029A) amplifica un fragmento de 268 pb y el alelo con la sustitución y digiendo con *Bsp1286I*, dos fragmentos de 137 y 130 pb. Marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb con una banda de 1500 pb.

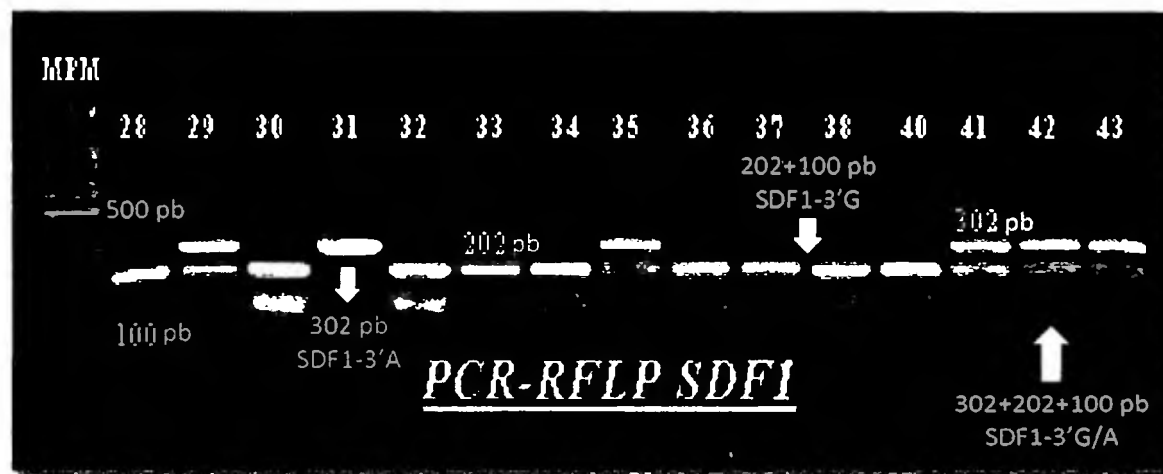
**Tabla #7.** Frecuencia del Polimorfismos en la Región del Promotor del Gen CCR5, CCR5-59029, en sujetos infectados con VIH perinatalmente. Se dividió la población infantil en niños (barra azul) y niñas (barra roja), el total de sujetos es representado con la barra verde. Además, en la gráfica se muestran los porcentajes de los polimorfismos en esta región del promotor del gen CCR5.



**SDF1-3'G/A:-** Entre los 74 sujetos de estudio genotificados para la mutación SDF1-3'A, 24 (32.4%) heterocigotos (Tabla #8) fueron identificados, dando una frecuencia del alelo SDF1-3'A en esta muestra de la población de 0.1622. La distribución de los genotipos está en acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. El resultado típico de los genotipos es presentado en la figura #19. El alelo tipo salvaje es digerido por *MspI* observándose dos fragmentos de 202 y 100 pb; en el caso del alelo mutado este no es digerido por la

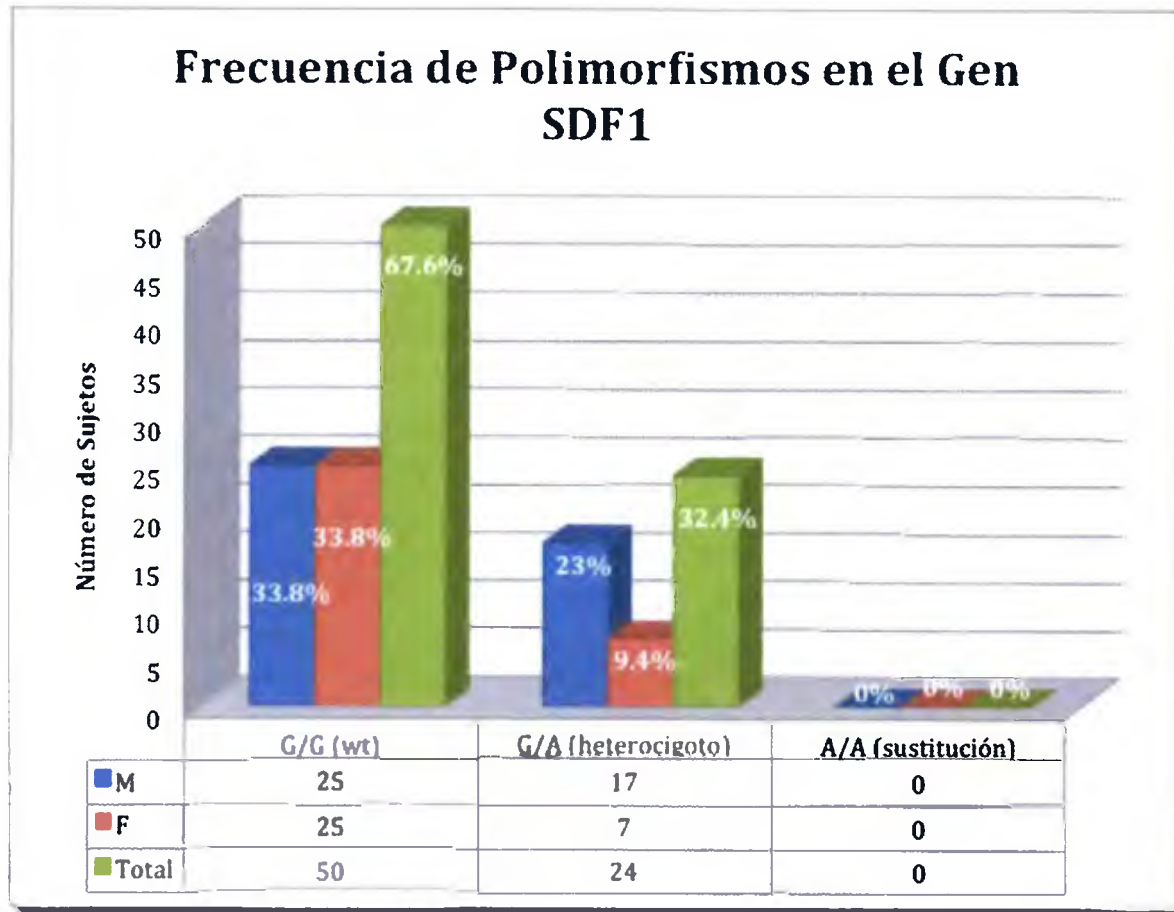
enzima resultando en un fragmento de 302 pb. En los heterocigotos se observan tres fragmentos de 302, 202, y 100 pb.

Una potencial fuente de error en la determinación de este genotipo está asociado al hecho de que la identificación del homocigoto SDF1-3'A es basada en la pérdida del sitio para la restricción de la endonucleasa MspI (HpaII). Así, la presencia de inhibición de la enzima de restricción puede resultar en identificación falsa de homocigotos SDF1-3'A. Por esta razón, fue necesario confirmar el único resultado homocigoto para SDF1-3'A del estudio a través de secuenciación, encontrándose una G en la posición 801 en lugar de una A, esto comprobó que este resultado fue un falso positivo debido a probable inhibición de la enzima de restricción (figura#19).



**Figura #19.** Imagen de una corrida electroforética en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio, donde se observan 9 muestras homocigotas (28, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40) a SDF1-3'G, 5 muestras heterocigotas (29, 35, 41, 42, 43) a SDF1-3'G/A, y una muestra homocigota (31) a SDF1-3'A, este sujeto se detectó inhibición de la enzima por secuenciación) El alelo wt amplificado y digerido con MspI nos muestra dos fragmentos 202 y 100 pb; y el alelo con la sustitución del nucleótido y no digiendo, un fragmento de 302 pb; en el caso de los heterocigotos se observan tres bandas de 100, 202 y 302 pb.

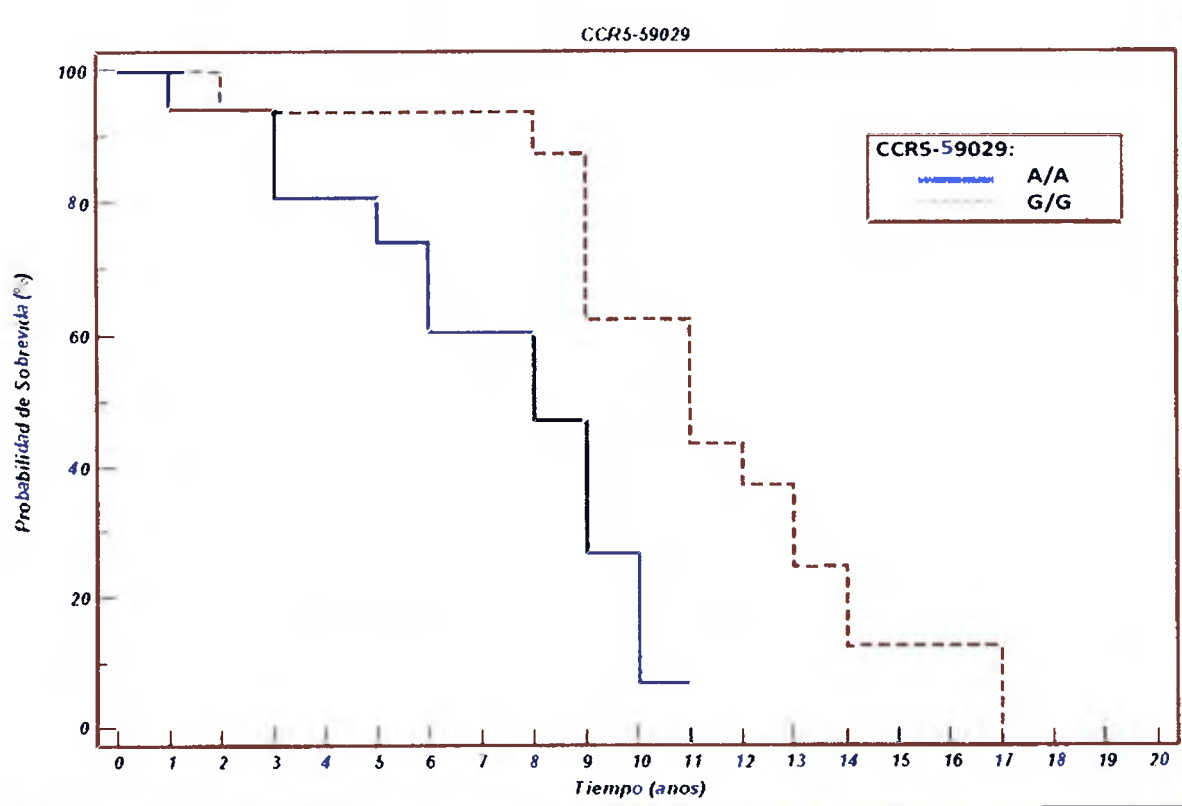
**Tabla #8.** Frecuencia del Polimorfismos en el Gen SDF1 en sujetos infectados con VIH perinatalmente. Se dividió la población infantil en niños (barra azul) y niñas (barra roja), el total de sujetos es representado con la barra verde. Además, en la gráfica se muestran los porcentajes de los polimorfismos en este gen SDF1. El sujeto #31 fue descartado como homocigoto a la sustitución de G (guanina) por A (adenina) a través de la secuenciación de este fragmento de 302 pb.



### **Curvas de Sobrevida**

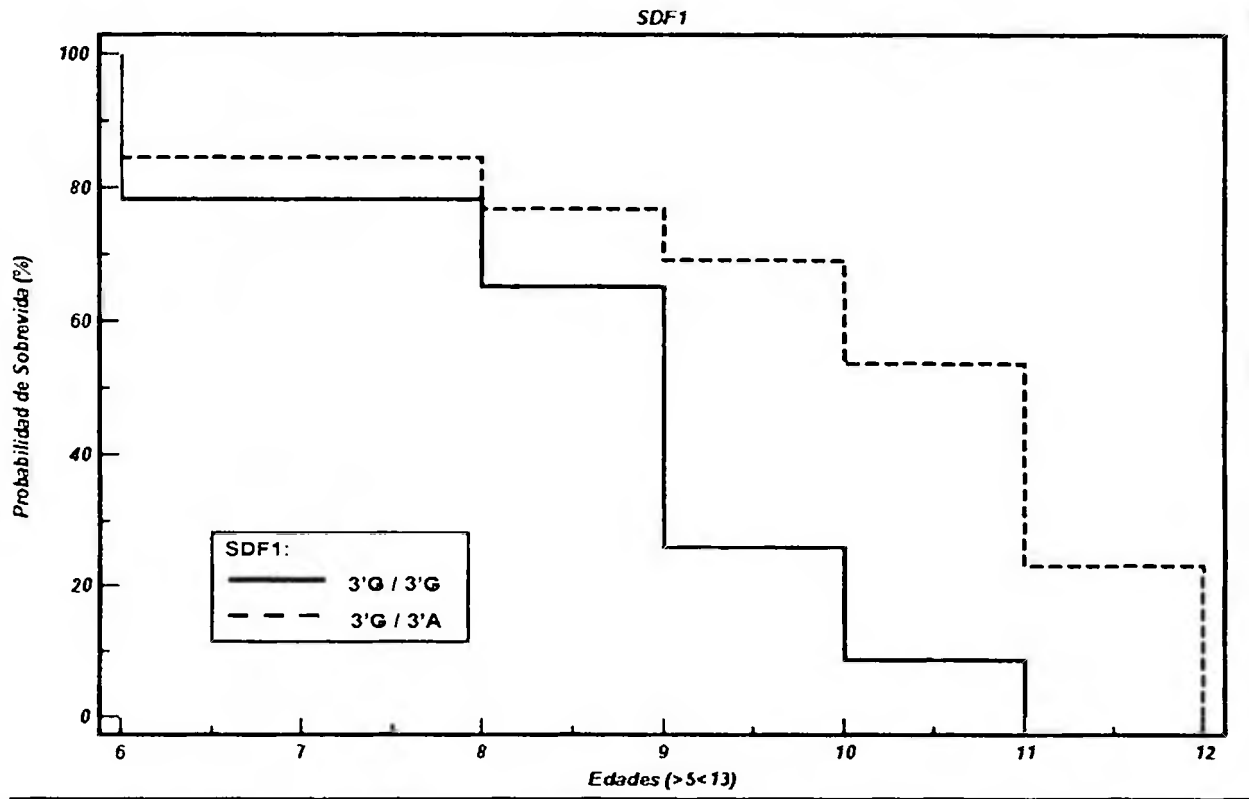
Además de la medición de las frecuencias, se realizó un análisis de Kaplan-Meier para cada polimorfismo donde se evaluó la progresión a muerte. Para esto se tomó en consideración la edad de los sujetos de estudio como tiempo de sobrevida y como punto final la variable de vida o muerte.

En cuanto a los cálculos de sobrevida para los diferentes polimorfismo en CCR2-V64I, SDF1-3'A, y CCR5Δ32 en la totalidad de los sujetos no observamos resultados estadísticamente significativos a la progresión a muerte en los sujetos que presentan uno o dos de los alelos mutado ( $p=0.4946$ ;  $p=0.8122$ , y  $p=0.7254$ ). Solo se observó una diferencia estadísticamente significativa en la progresión a muerte en los sujetos que expresan en sus dos alelos la mutación puntual CCR5-59029G ( $p=0.0025$ ) (Fig. #20). Cuando se analizó la progresión a muerte en los sujetos con la mutación 59029G en uno de sus alelos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.3794$ ).



**Figura #20** Curva de progresión a muerte, según presencia de mutación CCR5-59029G en ambos alelos en todos los sujetos del estudio. Se calcula la curva en base a edad como tiempo de sobrevida y SIDA o muerte, como punto final. Los sujetos con la mutación CCR5-59029G (línea discontinua roja) en ambos alelos tienen una progresión lenta a SIDA o muerte en comparación con los sujetos CCR5-59029A (línea continua azul), esto es estadísticamente significativa,  $P= 0.0025$ , curva de Kaplan-Meier.

Observamos ciertas tendencias en las curvas de sobrevivida, por lo que nos interesó evaluar si había diferencia en la progresión a muerte en los diferentes grupos de edad, para esto, los sujetos del estudio fueron clasificados en tres grupos: i) 1 a 5 años; ii) 6 a 12 años, y iii) 13 a 17 años. Esta división se basó en la clasificación CDC para niños VIH positivos menores de 13 años y se fundamenta en el grado de desarrollo del sistema inmunológico en esas etapas de la vida (60). Al volver a analizar las curvas de sobrevivida por grupo se observó que en los sujetos mayores de 5 años y menores de 13 años, la progresión a muerte en presencia de la mutación SDF1-3'A en uno de los dos alelos se reduce significativamente ( $p= 0.0047$ ) (Fig. #21).



**Figura #21** Curva de progresión a muerte, según presencia de la mutación SDF1-3'A en uno de los alelos (línea discontinua roja), en sujetos con un rango de edad mayor de 5 años y menor a 13 años. Se calcula la curva en base a edad como tiempo de sobrevivida y, vida o muerte como punto final.  $P= 0.0047$ , curva de Kaplan-Meier.



Además se analizaron los polimorfismos CCR2, y CCR5Δ32 pero no se obtuvo una reducción o aceleramiento de la progresión a muerte en estos polimorfismos. Los análisis no detectaron diferencias estadísticamente significativas.

### **Cuantificación de la Influencia de los Polimorfismos**

Para determinar si los polimorfismos CCR5-59029G y SDF1-3'A son un factor de riesgo o protección y que esto no esté ocurriendo de una forma aleatoria, se utilizaron la regresión de Cox univariado. Para la mutación CCR5-59029G (Fig. #22), se analizaron en todos los sujetos en estudio y se obtuvieron resultados significativos ( $p= 0.0066$ ) que indican que este polimorfismo tiene un efecto protector de 70.0 % cuando expresa la mutación en los dos alelos (Tabla #9).

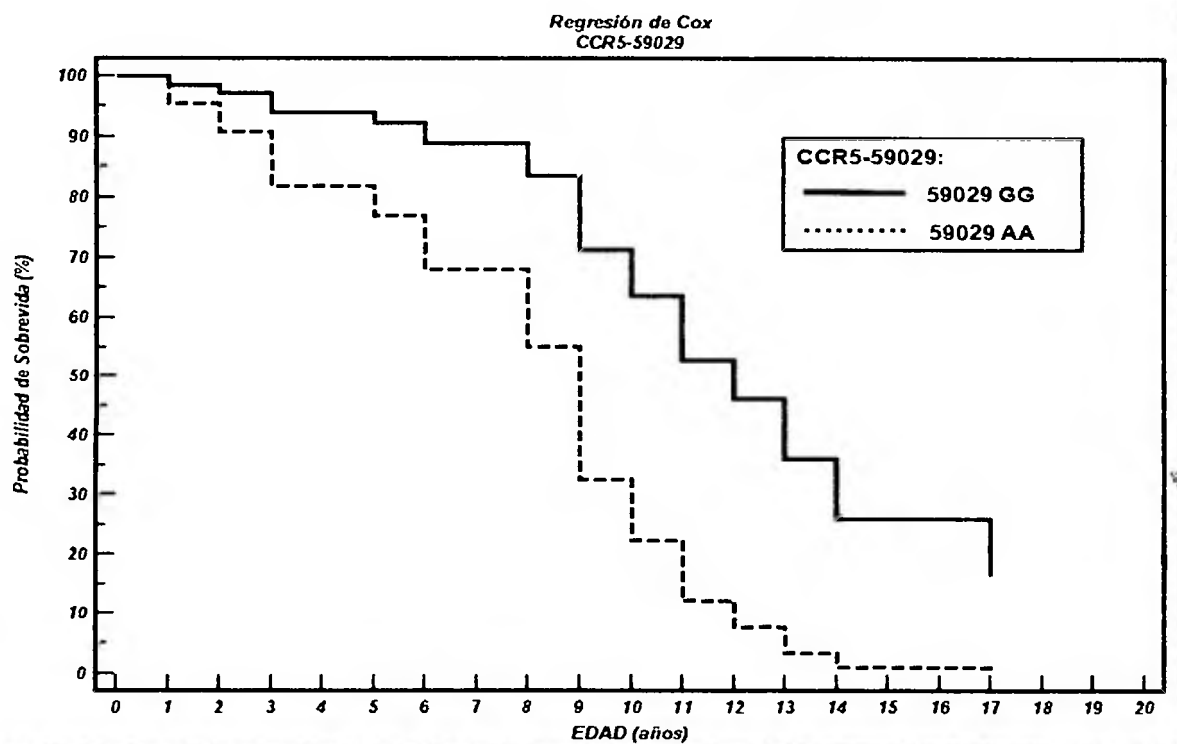


Figura #22 Regresión de Cox que nos ayudó a calcular el porcentaje de riesgo o protección del polimorfismo en la región del promotor CCR5-59029, observándose en los sujetos con la mutación CCR5-59029G (línea continua azul) una mejor probabilidad de supervivida.  $P= 0.0066$ , con un índice de  $b= -1.1965$

Tabla #9. Resultados de la regresión de Cox para CCR5-59029G.

Covariate	b	SE	P	Exp(b)	95% CI of Exp(b)
CCR5_59029_AA_GG	1.1965	0.4496	0.007787	0.3022	0.1258 a 0.7263

Coefficiente y Error Estándar

Al igual que en CCR5-59029G, para SDF1-3'A se utilizó la regresión de Cox para calcular el factor de protección, presentado en porcentaje. Cuando se analizó la variable dependiente SDF1-3'A con la herramienta estadística se obtuvo una significancia estadística significativa en los resultados ( $p= 0.0185$ ) (Fig. #23), observándose un nivel de protección del 60.0% en los niños comprendidos en las edades de 6 a 12 años (Tabla #10).

Para el resto de los polimorfismos no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos y no se observaron tendencias en los análisis estadísticos.

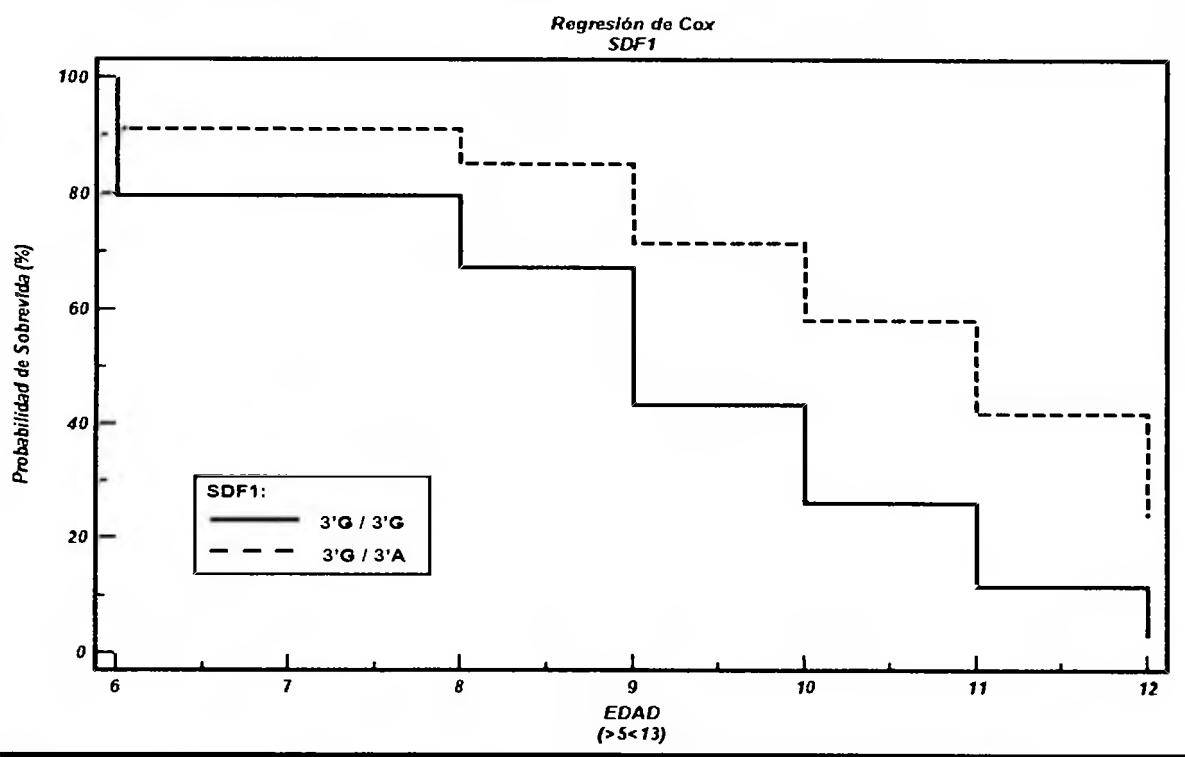


Figura #23 Regresión de Cox univariado, se utilizaron como variante la mutación SDF1-3'A, en sus forma homocigota tipo salvaje (línea continua azul) y heterocigota (línea discontinua roja).  $P= 0.0185$  y los sujetos en el rango de edad de 6 – 12 años.

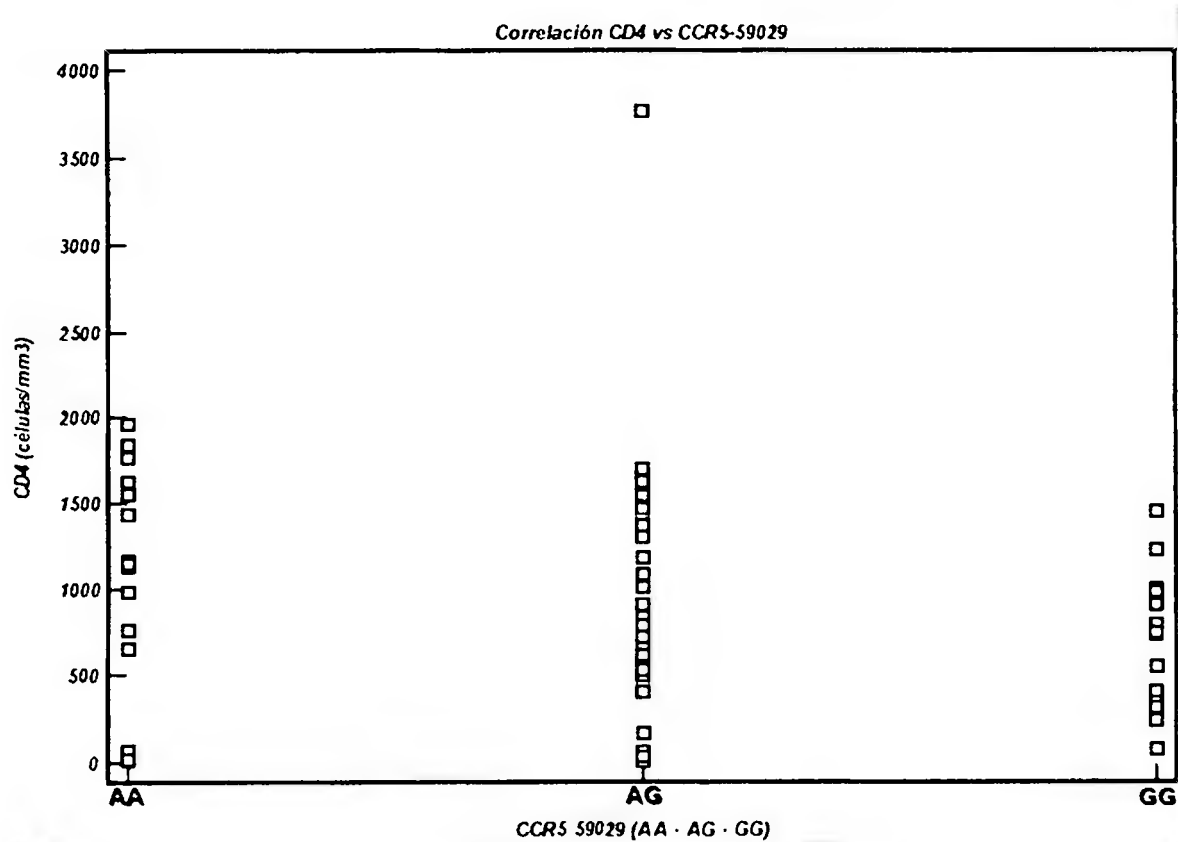
**Tabla #10.** Resultados de la regresión de Cox para SDF1.

Covariante	b	SE	P	Exp(b)	95% CI of Exp(b)
SDF1	-0.9053	0.4005	0.0238	0.4044	0.1852 a 0.8831

*Coefficientes y Error Estándar*

### **CD4 vs Polimorfismos**

Correlacionamos los diferentes polimorfismo en CCR5-59029 con el conteo de los linfocitos CD4 totales, observándose una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0251$ ) con un coeficiente de correlación  $r= -0.2736$ . Este coeficiente de correlación "r" con valor negativo indica que la relación de CD4 es inversamente proporcional al polimorfismo 59029G, como se puede observar en la figura #24.



**Figura #24.** Gráfica que muestra la correlación del número de CD4 vs los polimorfismos en CCR5-59029  $P=0.0251$ ,  $r= -0.2736$

En el resto de los polimorfismos no obtuvimos diferencias significativas al correlacionarlo con el conteo de linfocitos CD4. Sin embargo, el conteo de linfocitos CD4 total de los sujetos que presentaron el polimorfismo CCR5 $\Delta$ 32 fue mayor de 800 células/mm<sup>3</sup>.

Utilizamos la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los valores del conteo total de linfocitos CD4 vs los polimorfismos en la región promotora de CCR5-59029. Observamos una diferencia significativa en los conteos obtenidos para los diferentes polimorfismos del promotor del CCR5 ( $p= 0.0312$ ); dando como resultado conteos de CD4 más bajos en los que presentan la mutación 59029G (Fig. #25).

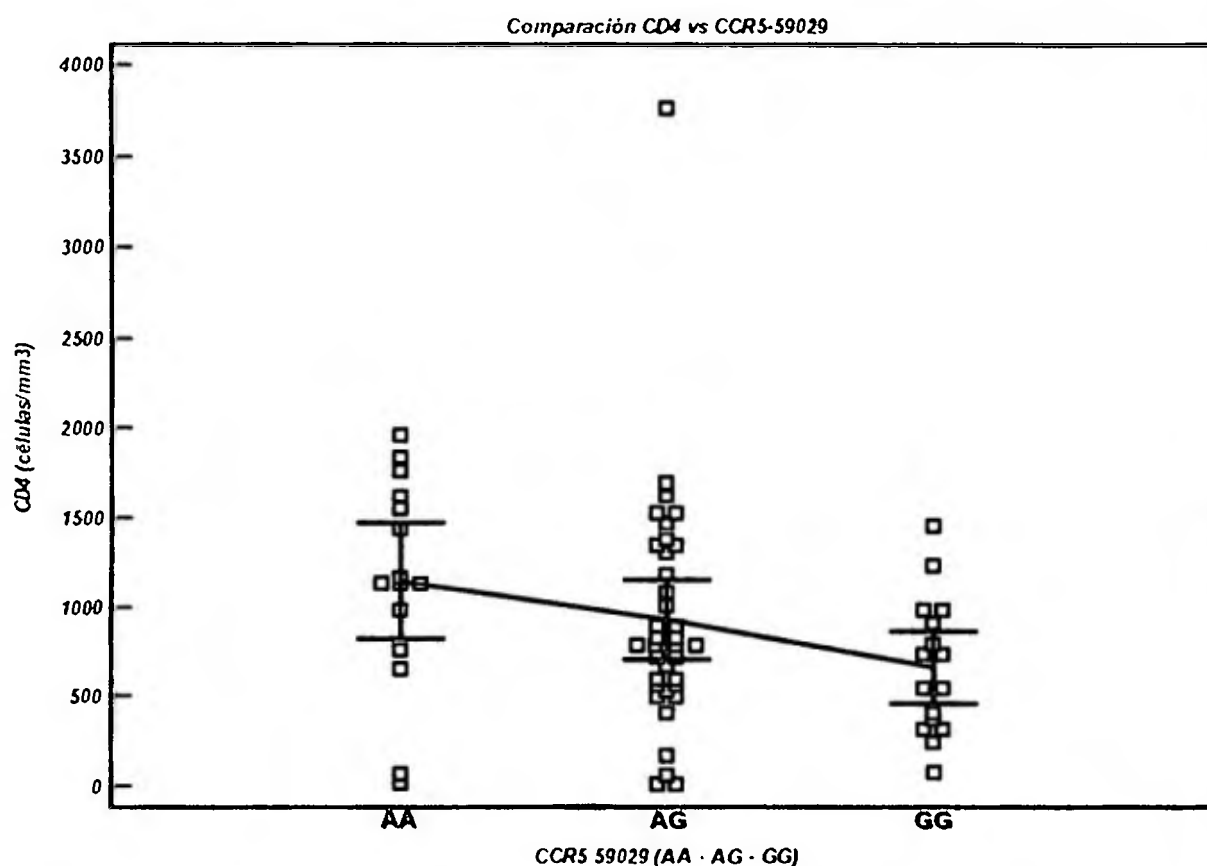
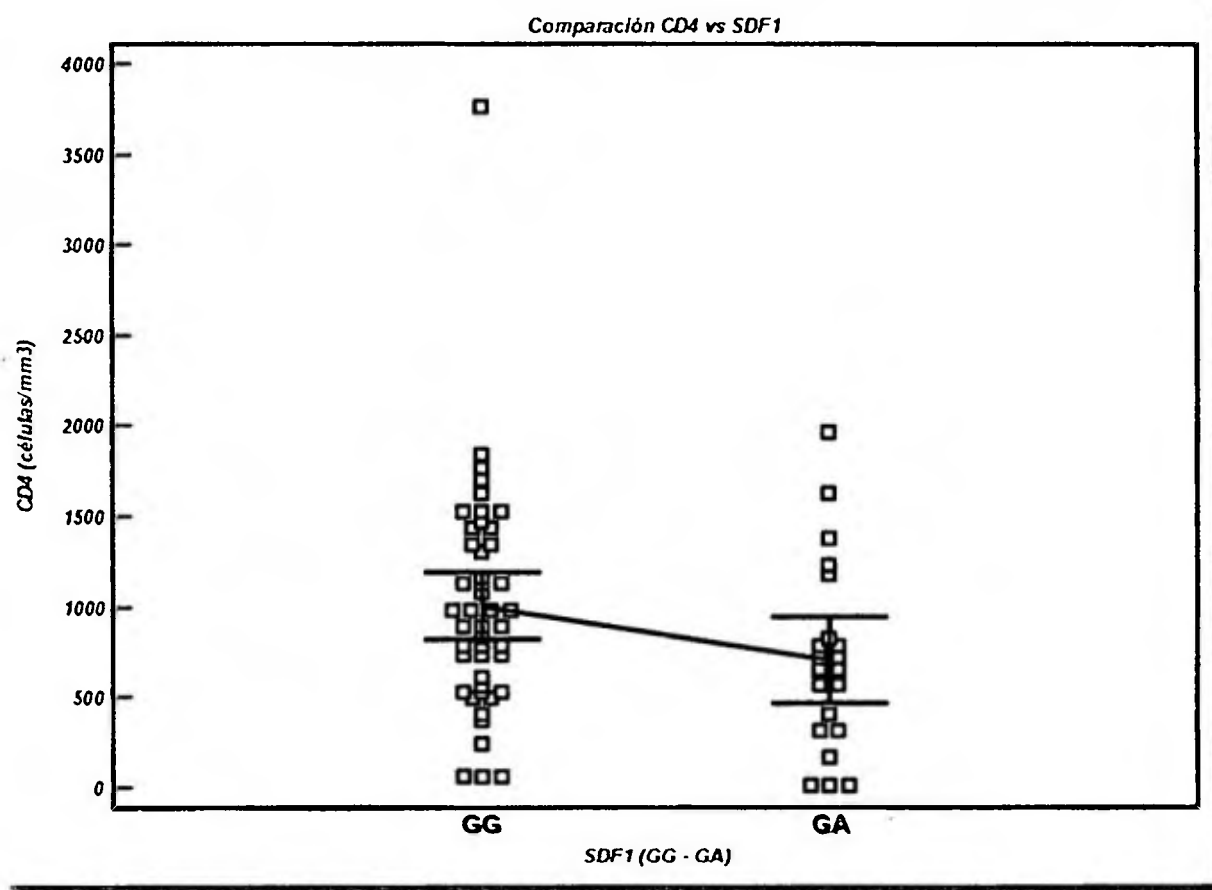


Figura #25 Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el conteo de CD4 total vs el polimorfismo en el promotor de CCR5.  $P= 0.0312$

Al igual que para el polimorfismo CCR5-59029, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis donde se compara el conteo de CD4 vs el polimorfismo en SDF1. En esta prueba obtuvimos una diferencia significativa ( $p= 0.0406$ ), que muestra valores de linfocitos CD4 menores en los sujetos que presentan la mutación SDF1-3'A (Fig. #26).



**Figura #26.** Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el conteo de CD4 total vs el polimorfismo en SDF1.  $P= 0.0406$

No se observaron diferencias significativas en los polimorfismos en CCR2 y CCR5 $\Delta$ 32. A simple vista no se observa una ventaja al poseer los polimorfismos en la región del promotor CCR5 y en el gen SDF1 en el conteo de los CD4. Sin embargo, hay que tener en cuenta la edad del paciente, por lo que correlacionamos la edad de los sujetos con el polimorfismo que presentan para el promotor de CCR5 y SDF1. Para SDF1, no

obtuvimos un resultado estadísticamente significativo ( $p= 0.7675$ ). Pero, para el promotor CCR5 si se observaron diferencias significativas ( $p= 0.0017$ ) y con un coeficiente de correlación  $r= 0.3591$ ; indicando en este último una relación directamente proporcional con el polimorfismo CCR5-59029G (Figura #27).

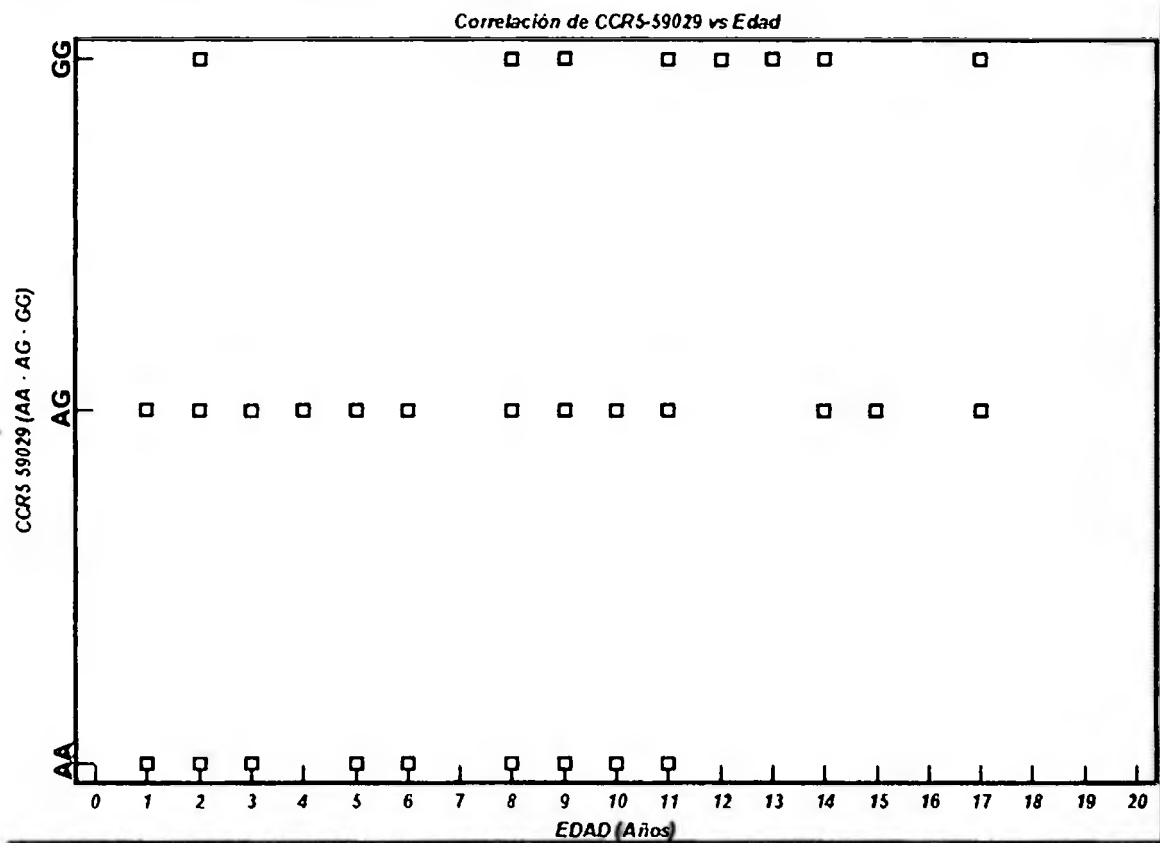


Figura #27 Gráfica que muestra la correlación del polimorfismo en CCR5-59029 vs la edad de los sujetos.  $P= 0.0017$ ,  $r= 0.3591$ .

Por otro lado, determinamos que existía una diferencia significativa en el recobro de los linfocitos T CD4. Utilizamos la prueba de Mann-Whitney para lo cual obtuvimos que hay una recuperación estadísticamente significativa de los CD4 ( $p= 0.0380$ ) en los sujetos que presentaron la mutación 59029G (Figura #28), no observada en los sujetos con el alelo CCR5-59029A (Fig. #29). Con los otros polimorfismos no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

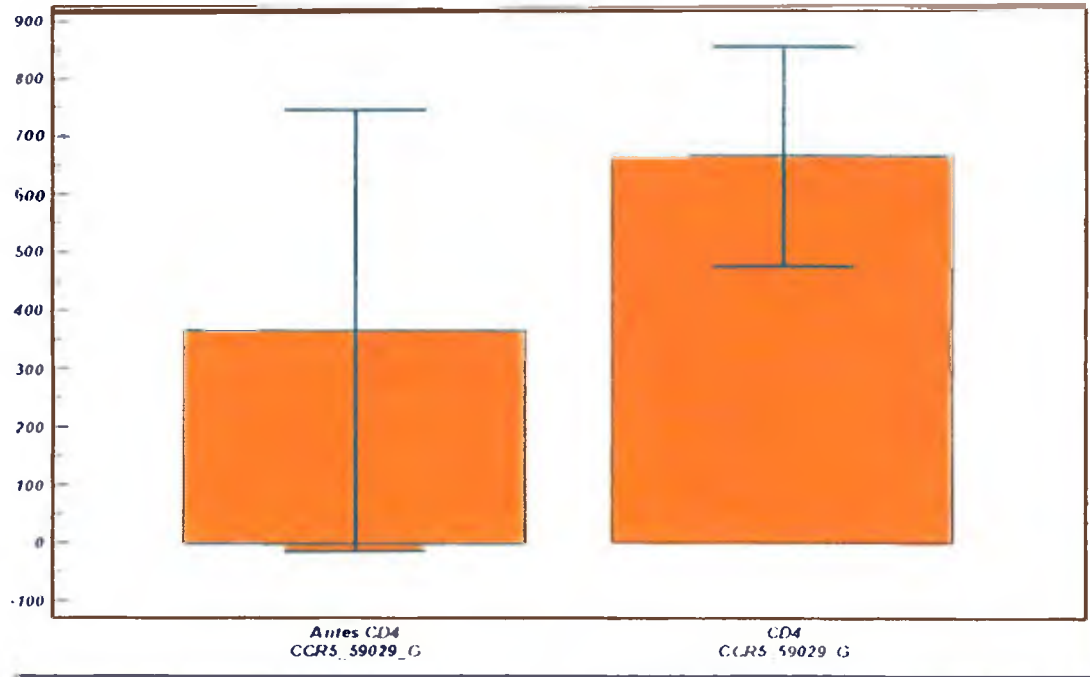
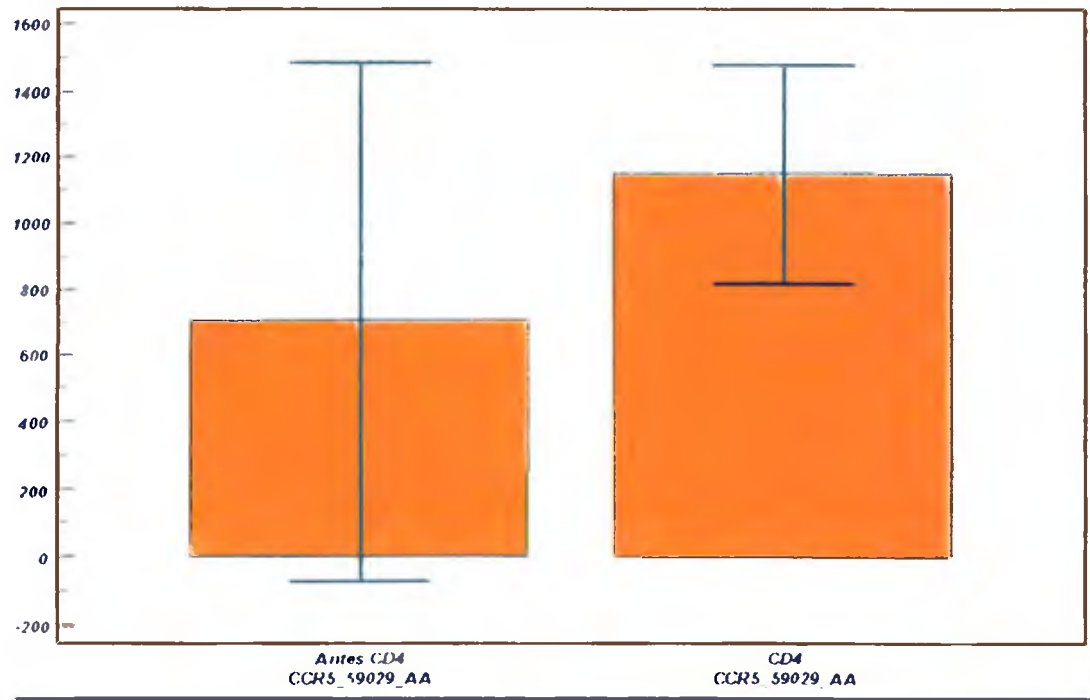


Figura #28. Prueba de Mann-Whitney donde se compara el conteo de linfocitos T CD4 antes del tratamiento y el conteo posterior (promedio) después del tratamiento en sujetos con el polimorfismo CCR5-59029G P= 0.0380

Figura #29. Prueba de Mann-Whitney, donde se compara el conteo de linfocitos T CD4 antes del tratamiento y el conteo posterior (promedio) después del tratamiento en sujetos con el polimorfismo CCR5-59029A P= 0.0380



## **Carga Viral vs Polimorfismos**

Al comparar los valores de carga viral de VIH antes y después del tratamiento con los polimorfismos del CCR5 $\Delta$ 32, y CCR2-64I no se observaron diferencias significativas entre los sujetos con mutaciones y sin ellas utilizando la herramienta estadística no paramétrica (Mann-Whitney). Por otro lado, para los polimorfismos CCR5-59029G y SDF1-3'A si se observaron diferencias significativas. En el caso de CCR5-59029G al presentarse esta mutación los niveles de carga viral de VIH descendieron significativamente al recibir tratamiento en comparación con los valores antes del tratamiento ( $p= 0.0009$ ) (Figura #30). Para el alelo normal del CCR5-59029 no se observó un descenso significativo de las cargas virales ( $p= 0.0963$ ) (Figura #31).

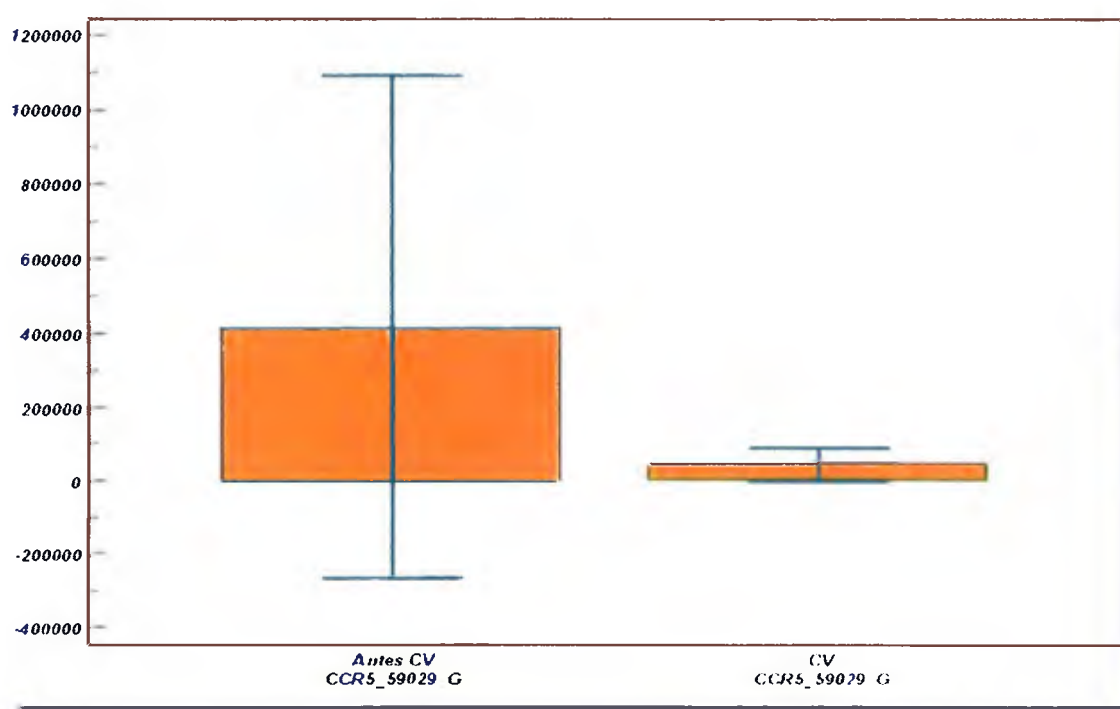
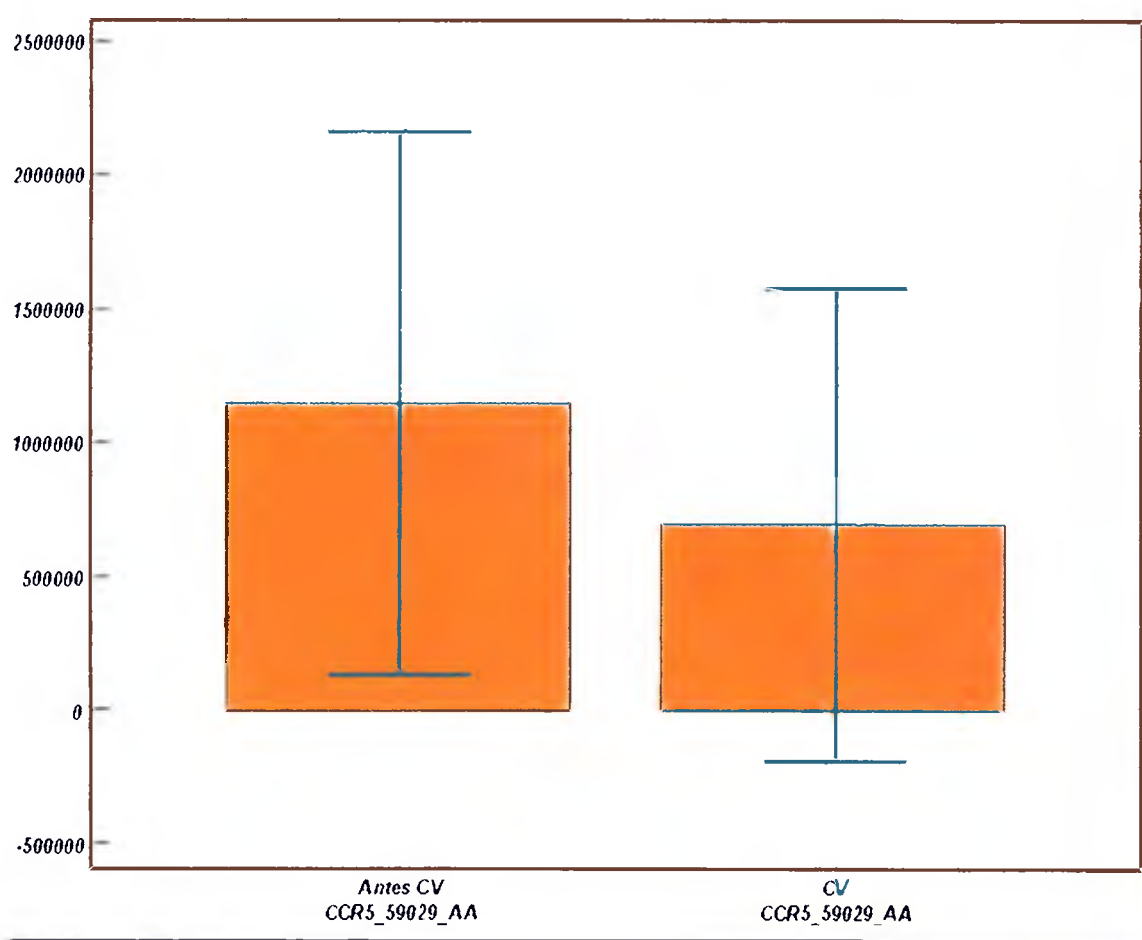


Figura #30 Prueba de Mann-Whitney, donde se compara la carga viral antes del tratamiento y después del tratamiento en sujetos con el polimorfismo CCR5-59029G.  $P= 0.0009$

Inversamente a lo observado con el alelo mutante CCR5-59029G, los sujetos que presentan el alelo normal para SDF1-3'G tienen una disminución estadísticamente



significativa de la carga viral del VIH ( $p= 0.0004$ ) (Figura #33) y, consecuentemente, los sujetos que poseen un alelo mutado para SDF1-3'A, no presentan esta disminución significativa ( $p= 0.2933$ ) (Figura #32).



**Figura #31** Prueba de Mann-Whitney, donde se compara la carga viral antes del tratamiento y después del tratamiento en sujetos con el alelo normal CCR5-59029A. ( $P= 0.0963$ )

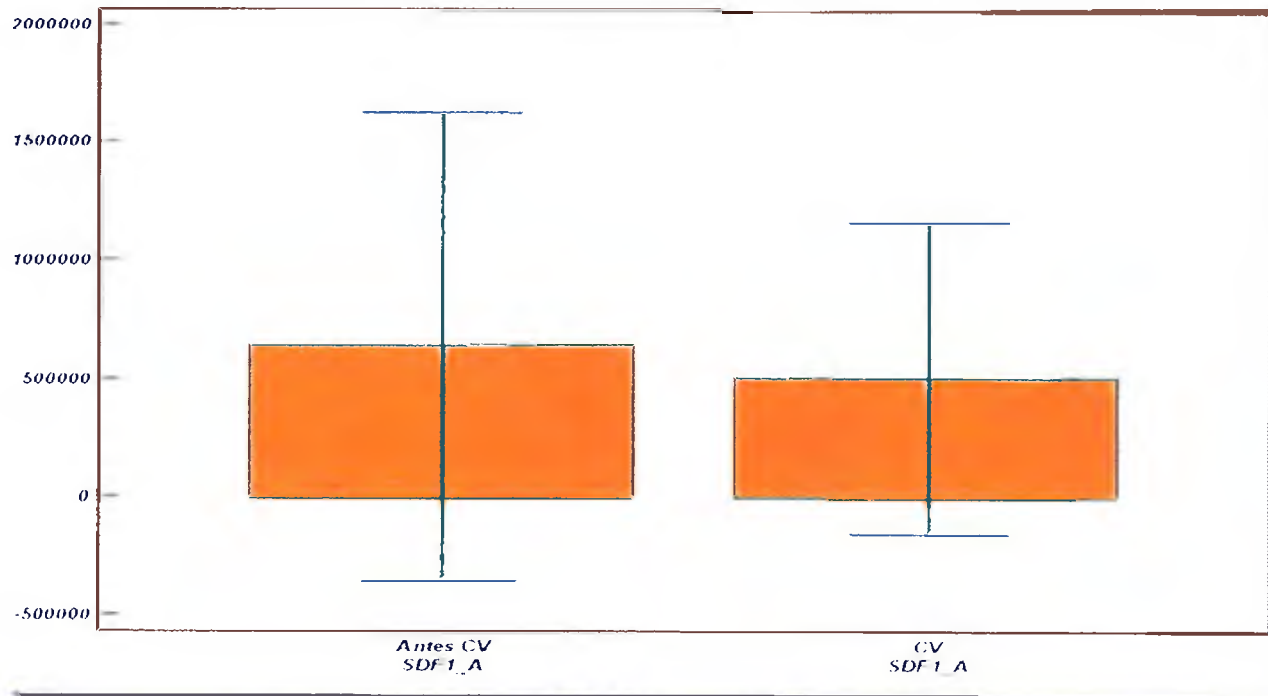
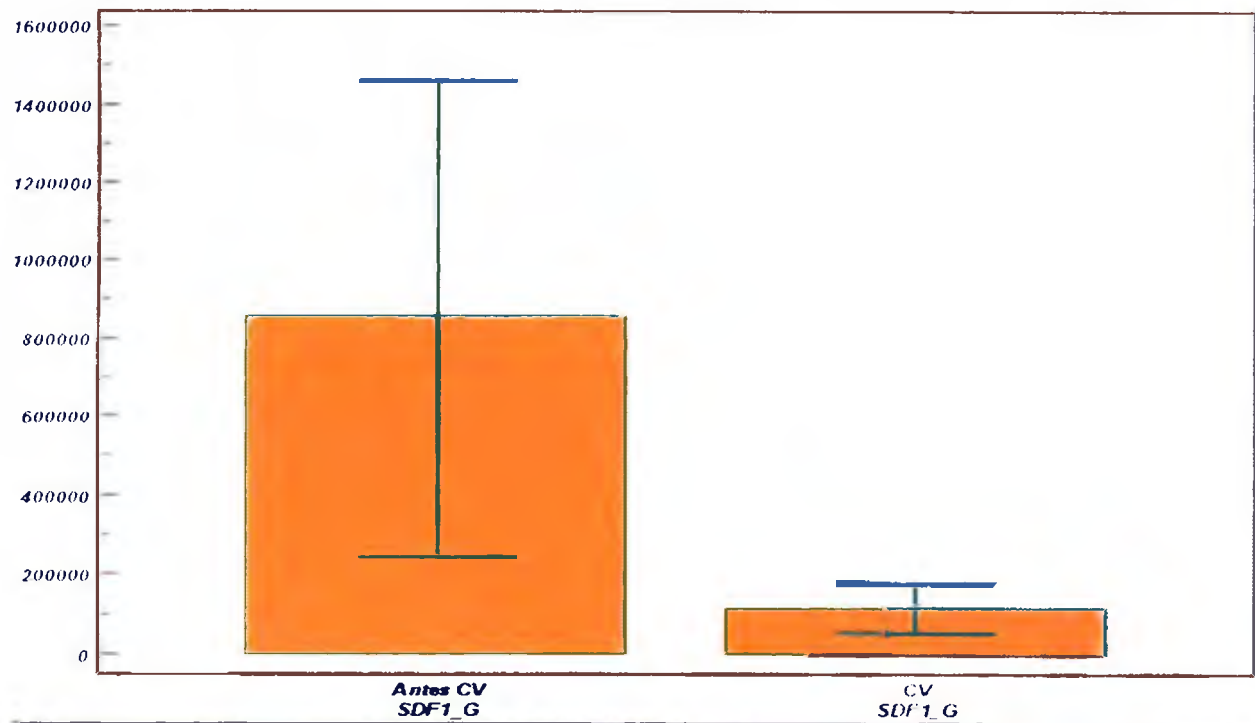


Figura #32 Prueba de Mann-Whitney, donde se compara la carga viral antes y después del tratamiento en sujetos con el polimorfismo SDF1-3 A. P= 0.2933.

Figura # 33. Prueba de Mann-Whitney, donde se compara la carga viral antes y después del tratamiento en sujetos con el alelo normal SDF1-3'G P= 0.0004.



### **Género vs Progresión**

Analizamos la relación de polimorfismo vs género y determinamos que no afecta la tasa de progresión a SIDA y muerte en sujetos infectados con VIH-1 por transmisión perinatal.

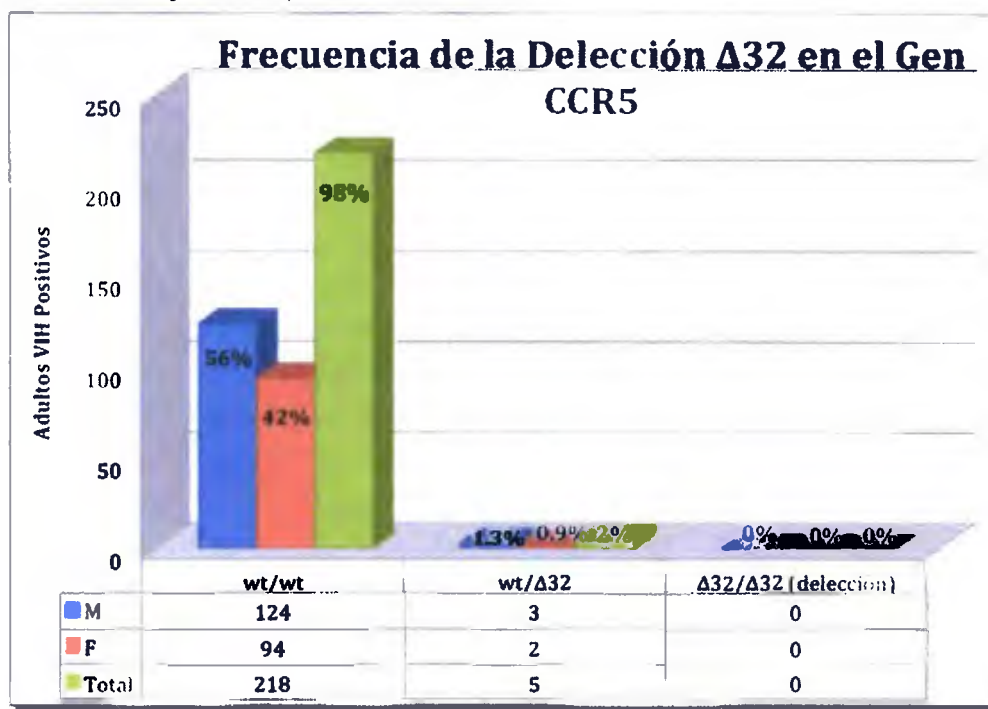
### **Frecuencia de Polimorfismos en Adultos**

Nosotros genotificamos 223 sujetos adultos con antecedentes de infección de VIH-1 sin transmisión perinatal. Noventa y seis correspondían al género femenino y 127, al masculino. A todos se les analizó para los polimorfismos CCR5 $\Delta$ 32, CCR5-59029G, CCR2-64I, y SDF1-3'A, obteniendo los siguientes resultados:

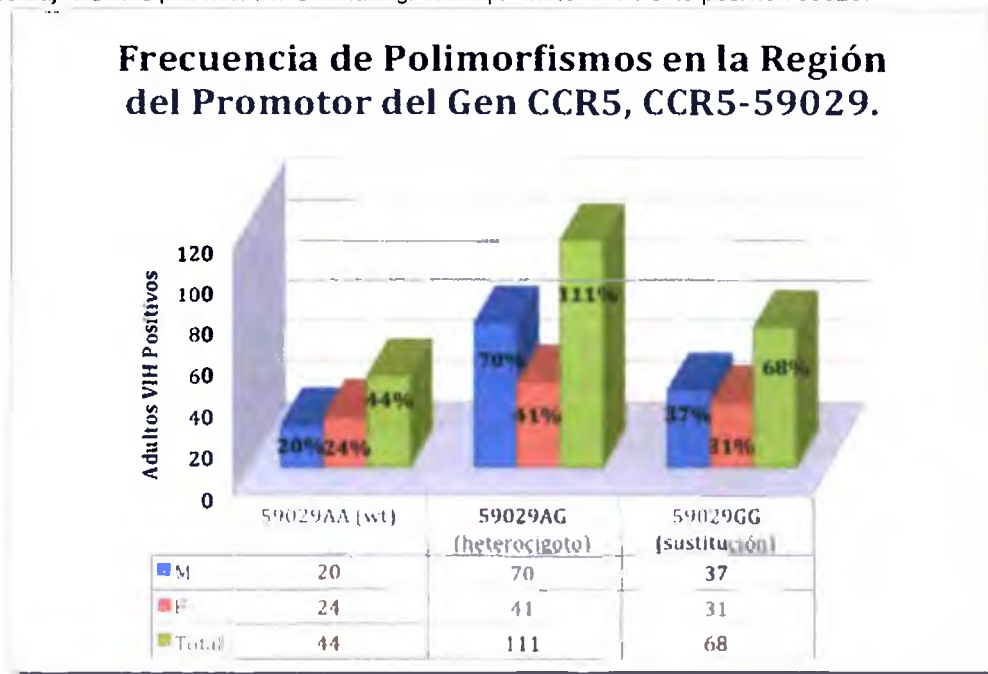
CCR5 $\Delta$ 32:- Doscientos veintitrés muestras fueron genotipificadas para la mutación CCR5 $\Delta$ 32 por PCR-RFLP. Cinco heterocigotos (2.2%) fueron identificados, dando la frecuencia del alelo CCR5 $\Delta$ 32 en esta muestra de la población de 0.0112 (Tabla #11). La distribución del genotipo estaba en acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. La tabla muestra el resultado de frecuencia, y la gráfica los porcentajes de cada polimorfismo.

CCR5-59029A/G:- Doscientos veintitrés muestras fueron genotipificadas para la mutación CCR5-59029A/G por PCR-RFLP. Ciento once (50%) heterocigotos y sesenta y ocho (30.5%) homocigotos fueron identificados, dando una frecuencia del alelo CCR5-59029G en esta muestra de la población de 0.5538. La distribución del genotipo estaba en acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. . La tabla #12 muestra el resultado de frecuencia, y la gráfica los porcentajes de cada polimorfismo.

**Tabla #11.** Frecuencia del Polimorfismo delta 32 del gen CCR5 en adultos VIH positivos. Se dividió la población adulta en hombres (barra azul) y mujeres (barra roja), el total de sujetos es representado con la barra verde para cada polimorfismo. Además en la gráfica se muestran los porcentajes de los polimorfismos en el gen CCR5 para la delección  $\Delta 32$ .



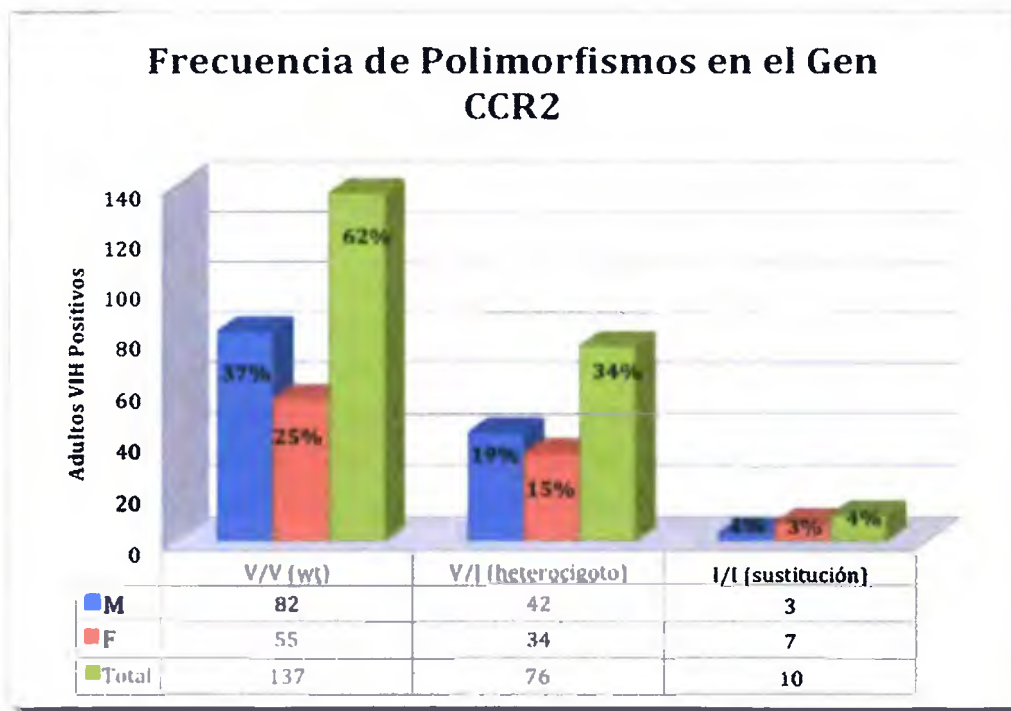
**Tabla #12.** Frecuencia del Polimorfismo CCR5-59029 en el promotor CCR5 en adultos VIH positivos. Se dividió la población adulta en hombres (barra azul) y mujeres (barra roja), el total de sujetos es representado con la barra verde para cada polimorfismo. Además en la gráfica se muestran los porcentajes de los polimorfismos en la región del promotor del CCR5 posición 59029.



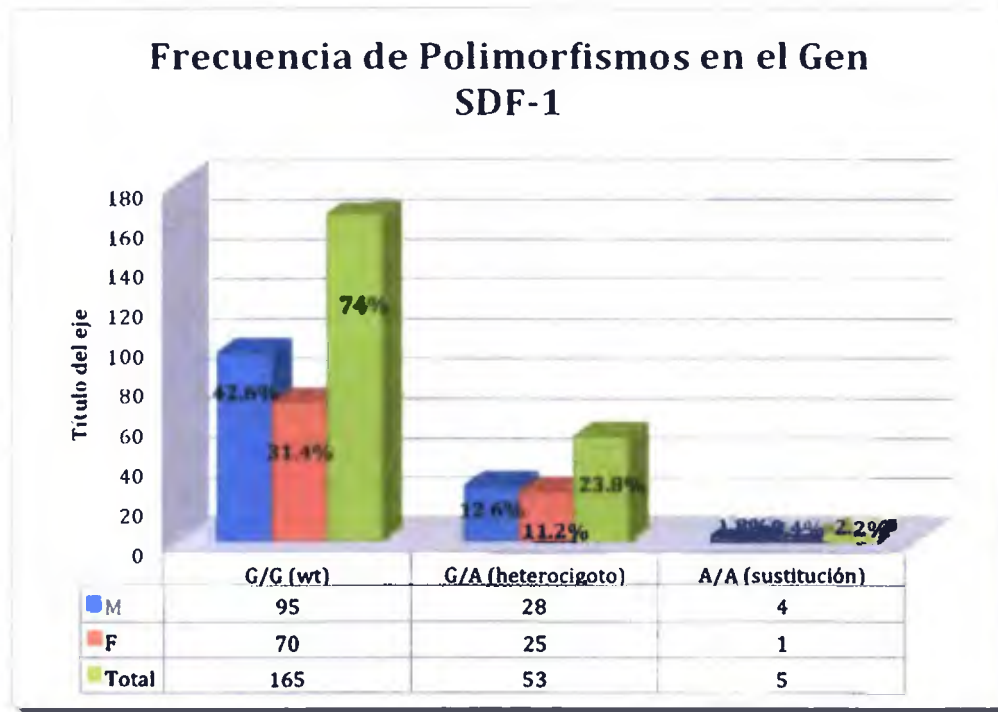
**CCR2-V64I:**- Dos cientos veintitrés muestras fueron genotipificadas para la mutación CCR2-V64I por PCR-RFLP. Setenta y seis (34%) heterocigotos y diez (4%) homocigotos fueron identificados, dando una frecuencia del alelo CCR2-V64I en esta muestra de la población de 0.2152. La distribución del genotipo estaba en acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. La tabla # 13 muestra el resultado de frecuencia, y la gráfica los porcentajes de cada polimorfismo.

**SDF1-3'G/A:**- Entre los 223 sujetos de estudio genotipificados para la mutación SDF1-3'A, 53 (23.8%) heterocigotos fueron identificados, dando una frecuencia del alelo SDF1-3'A en esta muestra de la población de 0.141. La distribución de los genotipos está en acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. La tabla #14 muestra el resultado de frecuencia, y la gráfica los porcentajes de cada polimorfismo en adultos.

**Tabla #13.** Frecuencia del Polimorfismo CCR2-64I en adultos VIH positivos. Se dividió la población adulta en hombres (barra azul) y mujeres (barra roja), el total de sujetos es representado con la barra verde para cada polimorfismo. Además, en la gráfica se muestran los porcentajes de los polimorfismos en el gen CCR2.



**Tabla #14.** Frecuencia del Polimorfismo SDF1 en adultos VIH positivos. Se dividió la población adulta en hombres (barra azul) y mujeres (barra roja), el total de sujetos es representado con la barra verde para cada polimorfismo. Además, en la gráfica se muestran los porcentajes de los polimorfismos en el gen SDF1



# **CAPÍTULO V**

## I. DISCUSIÓN

Existen en la actualidad gran número de estudios que investigan los efectos de los factores genéticos del hospedero, al igual que los centrados en la genética del VIH, y estos sugieren que estos dos factores son importantes determinantes de la progresión de la enfermedad del VIH-1 en adultos, adolescentes y en niños (35, 71, 88). Este estudio es el primero que se desarrolla con estas características en Panamá y Centroamérica. Además, los factores genéticos del virus y del hospedero tienen un efecto en la transmisión si ésta ocurre por contacto vía sexual o transmisión vertical de una madre a su hijo (2, 79, 88).

A continuación examinaremos las frecuencias alélicas en los genes CCR5, CCR2, SDF1 y en la región del promotor CCR5 en la posición 59029, tanto de los sujetos nacidos de madres VIH-1 positivas y los adultos infectados con VIH-1 y discutiremos si los factores genéticos en los polimorfismos de quimiocinas y los receptores de quimiocinas han ejercido algún efecto sobre los sujetos que desde su nacimiento han sido infectados con VIH-1.

### CCR5 $\Delta$ 32

Encontramos la presencia de la mutación CCR5 $\Delta$ 32 en dos de los sujetos nacidos con VIH-1 y en 5 adultos que adquirieron la infección del VIH después, en forma heterocigota. Estos resultados concuerdan con los presentados en otras investigaciones, que especifican que el alelo  $\Delta$ 32 está presente principalmente en población caucásica del Norte de Europa (40, 41, 42, 43, 44, 45). Este hecho probablemente se debe a la dispersión del alelo desde Islandia, Reino Unido y Bretaña (región de Francia) por las incursiones de los Vikingos en estas zonas (48) y el nivel de endogamia que se presentó



después de la diseminación del alelo, por ejemplo: los Askenazí (13% frecuencia  $\Delta 32$ ) (45, 48). Por otra parte, el alelo  $\Delta 32$  ha estado ausente en pobladores de China, Japón, Korea, Venezuela, Arabia Saudita, y entre algunas poblaciones de indios americanos (Plueblo Cheyenne, y Pima). Tampoco está presente en poblaciones negras del Oeste de África, por mencionar algunos ejemplos (42, 44, 45). Este fenómeno es debido a que el alelo no fue dispersado por inmigraciones importantes, y estudios poblacionales han demostrado que el alelo va diluyéndose a medida que descendemos al sur (45). Sin embargo, nuestra población es una mezcla de razas, en donde los componentes genéticos europeo e indígena están presentes en una proporción importante de nuestra herencia (comunicación personal del Dr. Juan M. Pascale), hecho que explica la presencia diluida del alelo CCR5 $\Delta 32$  presentándose en sólo 2.7% de los sujetos nacidos con VIH-1 y 2% en adultos infectados con VIH-1. La frecuencia de esta mutación en Panamá, es similar a la obtenida en estudios hechos en voluntarios de bancos de sangre del territorio nacional donde se observó la mutación en un 3.1% (92) de los encuestados.

Al hacer los análisis de sobrevida en los sujetos nacidos con VIH-1 a través de las curvas de Kaplan-Meier, no se observó que la presencia de la mutación en forma heterocigota brindara una ventaja a estos individuos. Sin embargo, los dos sujetos presentan conteos de linfocitos T CD4 por arriba de 800 células/mm<sup>3</sup>. Ambos sujetos presentan cargas virales menores a 2,000 copias/ml. En estudios previos realizados en personas VIH positivos, los individuos heterocigotos reducen la capacidad de replicación del VIH-1 (4 – 10 veces menos producción de virus) y por ende reducen su progresión a SIDA. Esto está asociado a una disminución de los niveles de expresión del receptor en la membrana de macrófagos o linfocitos T (43, 46, 47, 49). Probablemente el tamaño reducido de la muestra y la baja frecuencia del polimorfismo no permitieron mostrar una asociación significativa entre el genotipo y la infección. La mutación  $\Delta 32$  ha sido

asociada en algunos estudios con un riesgo reducido a asma, cursos menos severos de artritis reumatoide e inicio más tardíos de esclerosis múltiple (65). Mientras se pensaba que la ausencia funcional del CCR5 era inocua, otros hallazgos recientes indican un papel protector del alelo tipo salvaje del CCR5 en el control de la neuropatogenicidad del virus del Nilo Occidental (64). Y por lo antes expuesto, es importante seguir buscando asociaciones favorables y desfavorables en relación a la mutación  $\Delta 32$  debido a que en la actualidad se utilizan bloqueadores del receptor CCR5 como tratamiento antirretroviral para disminuir los niveles de RNA del VIH en plasma de aquellos pacientes que no tienen opciones terapéuticas debido a resistencia a los esquemas de tratamiento propuestos.

En concordancia con otros estudios, portar la mutación  $\Delta 32$  en forma heterocigota, no previno la infección del VIH-1 en niños al momento del parto (49, 50, 93), pero como lo muestra nuestro estudio los dos niños infectados presentaron cargas virales bajas y conteo de linfocitos T CD4 mayores de 800 células/mm<sup>3</sup>. Estudios han demostrado que in vitro la eficiencia de entrar del VIH-1 y su replicación está disminuida en las células T CD4 de pacientes heterocigotos a la delección delta 32 del CCR5 (43, 93). Nuestros resultados respaldan el efecto in vivo de la expresión reducida del correceptor CCR5 viral sobre la replicación en niños (93).

### **CCR2-V64I**

En nuestra población infectada de VIH-1 vía perinatal, encontramos un 33.8% de heterocigotos y 9.4% de homocigotos para el alelo mutado CCR2-64I; y en los adultos de 34% en los heterocigotos y 4% en los homocigotos a CCR2-64I. La frecuencia alélica de esta mutación entre nuestros sujetos de estudio fue de 0.2636 en niños y 0.2152 en adultos. Estas frecuencias alélicas son similares a la observada en población asiática (0.250) y mayor a la observada en caucásicos, africanos e hispanos (0.098, 0.150, y

0.172; respectivamente) (46). Estudios hechos en población amerindia de Brazil, encontraron frecuencias alélicas para CCR2-64I fueron 0.26 en la tribu Tiriyó y 0.30 en la tribu Waiampi, estas dos tribus habitan regiones aisladas al Norte de este país (95), esto explica nuestra frecuencia alélica debido a nuestra herencia amerindia en todos los panameños (comunicación personal Dr. Juan Miguel Pascale). Como esta mutación se presenta en todos los grupos étnicos sin distinción, se ha sugerido que la mutación CCR2-64I tiene mucho mayor tiempo de estar en la evolución humana que la mutación  $\Delta 32$  del CCR5 (46, 82).

En el caso de los sujetos con infección VIH-1 perinatal, no se observó un efecto sobre la progresión de la enfermedad. No se observaron diferencias significativas cuando se analizaron por separado las curvas de progresión a muerte para sujetos sin la mutación CCR2-64I y con la mutación CCR2-64I en uno o en los dos alelos. Los efectos de la mutación CCR2-64I sobre la progresión de la enfermedad a SIDA son muy discordantes. En un estudio en niños infectados por VIH-1 por vía perinatal, encontraron que la mutación CCR2-64I retardó la progresión a SIDA y muerte, y además, encontraron que tiene un efecto protector al evitar la transmisión vertical del VIH-1 (50). Otra cohorte realizada en niños infectados con VIH-1 por transmisión vertical, no mostró ningún efecto en la progresión de la enfermedad. Cohortes en adultos mostraron que la mutación CCR2-64I no ejerce ninguna influencia sobre la incidencia de la infección del VIH-1, sin embargo los individuos infectados con VIH-1 que poseen el alelo CCR2-64I progresan a SIDA en 2 a 4 años más tarde que los individuos homocigotos para el alelo común (46). El hecho de que el CCR2 es un correceptor esporádico para cepas de VIH-1 con tropismo M y que la mutante CCR2-64I no parece afectar la expresión de CCR2, no aporta elementos de juicio para entender el efecto protector observado en ciertos estudios (46). Otros señalan que el efecto protector del mutante CCR2-64I es indirecto.

Como el gen que codifica CCR2 está localizado cerca del gen CCR5 en el cromosoma 3, en dos estudios encontraron la mutación CCR2-64I en fuerte desequilibrio de unión con polimorfismos localizados en la región 5' que flanquea el gen CCR5 (52, 53). Experimentos preliminares, encontraron que la presencia de CCR2-64I no afecta significativamente el nivel de expresión de CCR5 sobre la superficie de las células T CD4 *in vitro* (53); sin embargo otros estudios indican que la proteína CCR2-64I pueden preferencialmente dimerizarse con polipeptidos CXCR4 (el receptor del VIH que reemplaza al CCR5 como un receptor de entrada en las etapas tardías), mientras que los péptidos tipos salvajes no lo hacen (96, 97).

### **SDF1-3'A**

Las frecuencias alélicas esperadas para la mutación SDF1-3'A en niños infectados con VIH-1, fue 0.181 para caucásicos, 0.1 en afro-americanos, y 0.167 en hispanos (54). Cinco cohortes de pacientes adultos VIH positivos determinaron la frecuencia alélica de la mutación SDF1-3'A en diferentes grupos raciales; 0.211 en caucásicos, 0.160 en hispanos, 0.057 en afro-americanos, y 0.257 en asiáticos (23). Para Panamá, la frecuencia alélicas de la mutación SDF1-3'A fue de 0.1622 en niños y 0.1412 en adultos, demostrando estrecha correlación con los datos esperados en la población hispana. En general, se han encontrado frecuencias variables en la población mundial, detectándose las frecuencias más elevadas en poblaciones asiáticas (25 – 35%) y particularmente en Oceanía (50 – 70%) (48, 55). Al igual que con CCR264I, el origen de SDF1-3'A puede ser mucho más antiguo, y probablemente pasó antes de que las migraciones humanas modernas salieran de África, lo cual se refleja por sus patrones de distribución ubicuos en la población mundial (82).

Como lo expresamos anteriormente, la mutación SDF1-3'A, no mostró diferencias significativas para evitar la progresión a muerte ( $p > 0.8122$ ) cuando se analizó el grupo como un todo. No obstante, se observó una tendencia de los sujetos que presentan el alelo SDF1-3'A a progresar ligeramente más lento a SIDA con respecto a los que presentan el alelo no mutado. Esta tendencia se remarcó al dividir la muestra de estudio por edades, y en el grupo de edad mayor de 5 años y menor de 13 años se observó un factor de protección de 60.0% en los que expresaron en uno de sus alelos la mutación SDF1-3'A. Lo característico de este grupo es que tienen más de 5 años de estar infectados con VIH-1, y probablemente la cepa del VIH-1 cambió su tropismo hacia el CXCR4 (X4), hecho que puede disminuir la entrada del VIH-1 a las células que expresan CXCR4. Los sujetos que presentaban la mutación SDF1-3'A presentaban disminución significativa de los niveles de CD4 ( $p = 0.0406$ ), pero a la vez se observó una disminución drástica de la carga viral del VIH después de recibir tratamiento ( $p = 0.0004$ ). Un meta-análisis de cinco cohortes muestran una asociación significativa de la mutación SDF1-3'A a evitar la progresión a SIDA (23). La mutación ocurre en la región 3' no traducida del gen transcrito  $\beta$  que codifica el ligando de quimiocina SDF1. Los homocigotos para la mutación SDF1-3'A muestran un nivel de protección notable contra SIDA, sustentando la hipótesis que la variante de SDF1-3'A restringe la emergencia de las cepas VIH-1 X4 debido a una sobreproducción del ligando SDF1, el cual se une y bloquea los receptores CXCR4 requeridos por el VIH-1 X4 para invadir la célula y multiplicarse (23, 57). El efecto protector de la mutación SDF1-3'A es recesiva, lo que quiere decir que sólo es observado en homocigotos y ninguna diferencia es aparente entre homocigotos tipo salvaje y heterocigotos (59). Por otra parte, hay otros estudios que reportan una progresión acelerada a SIDA con esta mutación (48). Una cohorte con niños expuestos perinatalmente con VIH-1 no encontraron ninguna asociación de SDF1-3'A con

transmisión vertical, y en los niños VIH positivos perinatalmente ninguna relación con el curso clínico de la infección (50). En otro estudio pediátrico, la presencia de la mutante SDF1-3'A puede influenciar desfavorablemente la patogénesis del SIDA pediátrico bajo ciertas circunstancias, aumentando la carga viral; y sugieren que anula el efecto protector del CCR5 $\Delta$ 32 (54). Hay estudios que han encontrado que este ligando del CXCR4 ejerce un efecto extra y opuesto en infección con virus VIH-1 X4 y R5 por mejoramiento de la actividad transcripcional de los LTR del VIH mediada por Tat (58). Luego, el efecto del SDF1 sobre el ciclo de vida del VIH-1 puede ser múltiple y opuesto, incluyendo una inhibición de la entrada viral y una estimulación de la expresión del gen proviral (58). Dentro de la búsqueda bibliográfica realizada hasta ahora, no hemos encontrado ninguna asociación con retardo de la progresión a SIDA o muerte en los sujetos que poseen la mutación SDF1-3'A en forma heterocigota, sin embargo, nosotros hemos encontrado la primera asociación de retardo de la progresión a muerte en sujetos de 6 a 12 años que poseen solo un alelo para la mutación 3'A infectados perinatalmente y una disminución de la carga viral rápida. No conocemos por el momento, el proceso desencadenado por el alelo SDF1-3'A en estos pacientes, cuyo efecto es protector y provoca un retardo de la progresión a muerte. Más estudios son necesarios para aclarar la influencia de esta mutación en la progresión de la enfermedad en el VIH-1.

### **CCR5-59029G**

Por último, encontramos una frecuencia alélica de 0.3514 en niños infectados con VIH-1 por vía perinatal y 0.5538 en adultos VIH positivos, siendo la frecuencia más alta encontrada, de los cuatro polimorfismos del estudio. Esto refuerza los hallazgos donde mencionan a la mutación CCR5-59029G como la más comúnmente encontrada a la fecha y sin distinción de raza como en el caso de la mutación  $\Delta$ 32 (37). A diferencia de

las mutaciones en CCR2-64I y CCR5 $\Delta$ 32, éstas son lo suficientemente altas para discernir los efectos de CCR5-59029G sobre la tasa de progresión a SIDA o muerte.

El efecto protector de la mutación CCR5-59029G en nuestro estudio fue independiente de CCR5 $\Delta$ 32, CCR2-64I y SDF1-3'A. Las curvas de supervivencia mostraron una clara significancia en los sujetos que presentaban los dos alelos con la mutación CCR5-59029G ya que disminuía estadísticamente significativa la progresión a muerte. Al hacer los análisis de regresión de Cox obtuvimos que presentar este alelo en doble dosis, le confiere al individuo que lo posea 70.0% de protección a la progresión a muerte. Además en los sujetos que presentan la mutación 59029G, se observó un recobro significativo de los linfocitos T CD4 ( $p= 0.0380$ ), y disminución igualmente significativas de la carga viral ( $p=0.0009$ ) después del tratamiento. Algunos investigadores sugieren que el mecanismo de acción del polimorfismo del promotor es una regulación diferencial de la transcripción del gen CCR5-1. Si el efecto es mediado directamente por un factor cis-actuante, o indirectamente, por unión a otro sitio polimórfico, no se conoce aún (37). Un sistema de expresión gen reportero mostró actividad transcripcional reducida para la región del promotor codificando la sustitución CCR5-59029G, y asociándose la presencia de este alelo con expresión disminuida de CCR5 sobre la membrana de los leucocitos polimorfonucleares (48).

La mutación 59029G en el promotor del CCR5 representa el genotipo más importante identificado y que determina el riesgo para la progresión de la enfermedad en sujetos con el gen CCR5 tipo salvaje hasta ahora hallado en la población infectada por vía perinatal en nuestro país. Además, si comparamos la frecuencia del SDF1-3'A en nuestra población (0.1622 y 0.1412, en niños y adultos respectivamente) con la mutación 59029G del promotor del CCR5 (0.3514 y 0.5538, en niños y adultos respectivamente) el impacto

general sobre la progresión de la enfermedad en niños es mayor en el promotor del CCR5.

La ventaja de nuestro estudio de cohorte retrospectivo de sujetos infectados perinatalmente es que los datos del tiempo de ocurrencia de la infección inicial son conocidos en todos los casos. Además, estos sujetos tienen una fuente de infección única, así evitamos posiblemente diferencias en la evolución de la enfermedad debido a infecciones repetitivas con subtipos diferentes y formas recombinantes del VIH.

Las decisiones terapéuticas para niños infectados son difíciles de calcular. Los factores genéticos relacionados a la progresión de la enfermedad pueden permitir una evolución clínica de la infección en niños VIH positivos y a su vez contribuir a mejores resoluciones terapéuticas.



# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. Este es el primer estudio en la región Centroamericana de los factores genéticos, de la población infectada con VIH-1 por vía perinatal, que correlaciona los factores genéticos del hospedero con la progresión de infección del VIH a SIDA o muerte.
2. La frecuencia de las mutaciones en CCR5, CCR2, SDF1 en la población panameña infectada con el VIH-1 es similar a las descritas en la población hispana infectada con este virus.
3. Poseer el polimorfismo CCR5-59029G retarda la progresión a muerte en los sujetos nacidos con VIH-1. Además, es la mutación que presenta la frecuencia más alta en la población panameña.
4. Los sujetos infectados por vía perinatal con VIH-1 que poseen la mutación 59029G recobran los niveles de linfocitos T CD4 y disminuyen la carga viral de VIH de manera significativa después de recibir tratamiento antirretroviral.
5. Los sujetos entre 6 y 12 años con la mutación SDF1-3'A presentaron una mayor sobrevida, sin embargo, esta no estuvo asociado a un aumento en los linfocitos T CD4 post TARV.
6. Pacientes con la mutación SDF1-3'A en uno de sus alelos presentaron una disminución significativa de la carga viral del VIH después de recibir tratamiento. Podemos señalar que presentar este alelo es asociado a un retardo en la progresión de la enfermedad.
7. No hubo relación significativa entre la presencia de mutaciones en CCR2-64I y CCR5Δ32 con la progresión a muerte de los sujetos estudiados.

# RECOMENDACIONES

## RECOMENDACIONES

1. Recomendamos que futuros estudios en este campo sean prospectivos para incluir todas las variables necesarias que permitan tener información completa para los análisis estadísticos.
2. Profundizar los estudios en el cromosoma 3, en la región responsable de la expresión de los correceptores del CCR2 y CCR5, para conocer los haplotipos más frecuentes en nuestra población y cómo éstos afectan la progresión a SIDA/muerte en los pacientes infectados con VIH-1 en Panamá.
3. Realizar mediciones de los niveles plasmáticos del ligando SDF1 en los sujetos del estudio y se determine si los niveles plasmáticos de SDF1 son afectados en alguna medida por la presencia e la mutación SDF1-3'A

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** 1997. Retroviruses at the National Center for Biotechnology Information. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=rv&part=A7763#A7764>
2. **Wei QU, Robinson M, Fu-Jie Z.** 2008. Factors influencing the natural history of HIV-1 infection. *Chin Med J*; 121:2613-2621.
3. **Hutchinson JF.** 2001. The Biology and Evolution of HIV. *Annu Rev Anthropol*; 30: 85 – 108.
4. **Weiss RA.** 2000. Getting to know HIV. *Tro Med Int. Health*, 5: A10 – A15.
5. **Abbas AK, Lichtman AH.** 2003. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. Elsevier Science, SAUNDERS. Páginas: 464 – 476.
6. **Sierra-García JJ.** 2004. Taxonomía y Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Trop. Med Int Health*, 51: 37-41
7. **Sierra S, Kupfer B, Kaiser R.** 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*, 34: 233 – 244.
8. **Pancera M, Majeed S, et al.** 2010. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 1166 – 1171.
9. <http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/structure.htm>
10. **Liu J, Bartesaghi A, et al.** 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature*, 455: 109 – 114.
11. **Burton D.** 2006. Images from the surface of HIV. *Nature*, 441: 817 – 818.
12. **Frankel AD, Young JAT.** 1998. HIV-1: Fifteen proteins and RNA. *Annu Rev Biochem*, 67: 1 – 25.
13. **Ganser-Pornillos B, Yeager M, Sundquist W.** 2008. The structure biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 18: 203 – 21
14. **Alcamí J.** 2008. Ciclo replicativo del VIH. Dianas terapéuticas consolidadas y dianas potenciales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26: 3 – 10.
15. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik M.** 2001. Immunology. 5<sup>th</sup> Edition. Garland Publishing: Chapter 11

16. **Hope TJ, y Trono D.** 2000. Structure, Expression, and Regulation of the HIV. HIV Insite Knowledge Base Chapter. <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-01-02#>
17. **Freed EO.** 2001. HIV-1 Replication. *Somatic Cell Mol. Genet.* 26: 13 – 33.
18. **Muesing MA, Smith DH, et al.** 1985. Nucleid acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*, 313: 450 – 458.
19. **Mirambeau G.** 2008. Cómo se integra el ADN proviral en el ADN de la célula del huésped y cómo se puede inhibir el proceso. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26: 11 - 16.
20. **Tang H, Kuhen KL, and Wong-Staal F.** 1999. Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet*; 33: 133 – 70.
21. **Gomez C, and Hope TJ.** 2005. The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol*; 7: 621 – 626.
22. <http://www.promega.com/tbs/tm050/tm050.pdf> Manual Técnico Wizard Genomic DNA Purification Kit.
23. **Winkler C, Modi W, Smith MW, et al.** 1998. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science*; 279: 389 – 393.
24. **Passam AM, Zafiropoulos A, Miyakis S, et al.** 2005. CCR2-64I and CXCL12 3\_A alleles confer a favorable prognosis to AIDS patients undergoing HAART therapy. *J Clin Virol*; 34: 302 – 309.
25. **Shieh B, Liau YE, Hsieh PS, et al.** 2000. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CxCR4. *Int Immunol*; 12: 1311 – 1318.
26. **Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, et al.** 1996. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and diseases progression. *Nat Med*; 2: 1240 – 1243.
27. **Stebbing J, Gazzard B, Douek DC.** 2004. Mechanisms of disease: Where does HIV live? *N Engl J Med*; 350: 1872 – 1880.
28. **Weiss RA, Wrangham W.** 1999. From Pan to pandemic. *Nature*; 397: 385 – 386.
29. **Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, et al.** 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*; 15: 871 – 872.
30. Simon and Schuster's Concise International Dictionary. 1975. English/Spanish. Published by Simon and Schuster: 449.
31. **Greene WC.** 1991. The molecular biology of human immunology virus type I infection. *N Engl J Med*; 324: 308 – 315.

32. **Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, et al.** 2004. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *The EMBO J*; 23: 2451 – 2458.
33. **Malim MH.** 2006. Natural resistance to HIV infection: The Vif – APOBEC3G interaction. *C R Biol*; 329: 871 – 875.
34. **Stopak K, Noronha C, Yonemoto W, et al.** 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell*; 12: 591 – 601.
35. **Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, et al.** 2008. The challenger of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*, 358: 1590 – 1602.
36. **Rambaut A, Robertson DL, Pybus OG, et al.** 2001. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature*; 410: 1047 – 1048.
37. **McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, et al.** 1998. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. *Lancet*; 352: 866 – 870.
38. **Tang J, Shelton B, Makhatadze NJ, et al.** 2002. Distribution of chemokine receptor CCR2 and CCR5 genotypes and their relative contribution to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion, early HIV-1 RNA concentration in plasma, and later disease progression. *J Virol*; 76: 662 – 672.
39. **Balota C, Bagnarelli P, Corvasce S, et al.** 1999. Identification of two distinct subsets of long-term nonprogressors with divergent viral activity by stromal-derived factor 1 chemokine gene polymorphism analysis. *J Infect Dis*; 180: 285 – 289.
40. **Díaz FJ, Vega JA, Patiño PJ, et al.** 2000. Frequency of CCR5  $\Delta$ 32 mutation in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-exposed seronegative individuals and in general population of Medellín, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 95: 237 – 242.
41. **Motta P, Cibulsky L, Illovich E, et al.** 2000. Frecuencia del alelo mutado del receptor CCR5 en individuos HIV-1 positivos y negativos en la Provincia del Chaco. *Medicina*; 60: 431 - 434.
42. **Silva E, Stumpf MPH.** 2004. HIV and the CCR5- $\Delta$ 32 resistance allele. *FEMS Microbiol Lett*; 241: 1 – 12.
43. **Liu R, Paxton WA, Choe S, et al.** 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*; 86: 367 – 377.



44. **Sansom M, Libert F, Doranz BJ, et al.** 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*; 382: 722 -725.
45. **Libert F, Cochaux P, Beckman G, et al.** 1998. The  $\Delta ccr5$  mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian population has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet*; 7: 399 – 406.
46. **Smith MW, Dean M, Carrington M, et al.** 1997. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants of HIV-1 infection and disease progression. *Science*; 277: 959 – 965.
47. **Apostolakis S, Baritaki S, Krambovitis E, et al.** 2005. Distribution of HIV/AIDS protective SDF1, CCR5 and CCR2 gene variants within Cretan population. *J Clin Virol*; 34: 310 – 314.
48. **Arenzana-Seisdedos F, Parmentier M.** 2006. Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin Immunol*; 18: 387 – 403.
49. **Romiti ML, Colognesi C, Cancrini C, et al.** 2000. Prognostic value of a CCR5 defective allele in pediatric HIV-1 infection. *Mol. Med*; 6: 28 – 36.
50. **Mangano A, Kopka J, Batalla M, et al.** 2000. Protective effect of CCR2-64I and not of CCR5- $\Delta$ 32 and SDF1-3'A in Pediatric HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr*; 23: 52 – 57.
51. **Teglas JP, N'Go N, Burgard M, et al.** 1999. CCR2B-64I chemokine receptor allele and mother-to-child HIV-1 transmission or disease progression in children. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 22: 267 – 274.
52. **Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, et al.** 1998. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat. Med.*; 4: 786 – 793.
53. **LG, Huang Y, Moore JP, et al.** 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promotor mutation. *Nat. Med.*; 4: 350 – 353.
54. **Sei S, Boler AM, Nguyen GT, et al.** 2001. Protective effect of CCR5  $\Delta$ 32 heterozygosity is restricted by SDF-1 genotype in children with HIV-1 infection. *AIDS*; 15: 1343 – 1352.
55. **Salem AH, Farid E, Fadel R, et al.** 2009. Distribution of four HIV type 1-resistance polymorphisms (CCR5- $\Delta$ 32, CCR5-m303, CCR2-64I, and SDF1-3'A) in the Bahraini. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*; 25: 973 – 977.
56. **Reiche EMV, Watanabe MAE, Bonametti AM, et al.** 2006. Stromal cell-derived factor 1 (SDF1) genetic polymorphism in a sample of healthy individuals,

- seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and patients infected with HIV-1 from the Brazilian population. *Int. J. of Immunogenet*, 33: 127 – 133.
57. **Reiche EMV, Bonametti AM, Voltarelli JC, et al.** 2007. Genetic polymorphisms in the chemokine and chemokine receptor: Impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1). *Curr. Med. Chem*; 14: 1325 – 1334.
  58. **Marechal V, Arenzana-Seisdedos F, Heard JM, et al.** 1999. Opposite effects of SDF-1 on human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol*; 73: 3608 – 3615.
  59. **Voevodin A, Samilchuk E, Dashti S.** 1999. Frequency of SDF-1 chemokine, CCR-5, and CCR-2 chemokine receptor gene alleles conferring resistance to human immunodeficiency virus type I and AIDS in Kuwaitis. *J. Med. Virol*; 58: 54 – 58.
  60. **Tellechea-Rotta N, Legido A.** 2003. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida por transmisión vertical: alteraciones neurológicas. *Rev. Neurol*; 36: 255 – 263.
  61. **Dragic T.** 2001. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J. Gen. Virol*; 82: 1807 – 1814.
  62. **Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Salgado N, et al.** 2000. Los factores genéticos determinantes de la resistencia a la infección por VIH y del control de la progresión al SIDA: Implicaciones sobre la patogénesis y las estrategias terapéuticas para la erradicación del VIH. Una revisión. *Rev. Inves. Clin*; 52: 284 – 295.
  63. **Alkhatib G, Berger E.** 2007. HIV coreceptors: From discovery and designation to new paradigms and promise. *Eur. J. Med. Res*; 12: 375 – 384.
  64. **Lim JK, Glass WG, McDermott DH, et al.** 2006. CCR5: no longer a 'god for nothing' gene – chemokine control of West Nile virus infection. *Trends Immunol*; 27: 308 – 312.
  65. **Dong VM, McDermott DH, Abdi R.** 2003. Chemokines and diseases. *Eur. J. Dermatol*; 13: 224 – 230.
  66. **Allen SJ, Crown SE, Handel TM.** 2007. Chemokines: receptor, structure, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol*; 25: 787 – 820.

67. **Kaur G, Mehra M.** 2007. Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: susceptibility to HIV infection. *Tissue Antigens*; 73: 289 – 301.
68. **Schinkel J, Langendam MW, Coutinho RA, et al.** 1999. No evidence for an effect of the CCR5  $\Delta 32/+$  and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV) – 1 disease progression among HIV-1 – infected injecting drug users. *J. Infect. Dis*; 179: 825 – 831.
69. **Eskild A, Jonassen TO, Heger B, et al.** 1998. The estimated impact of the CCR5  $\Delta 32$  gene deletion on HIV disease progression varies with study design. *AIDS*; 12: 2271 – 2274.
70. **Berger E, Murphy PM, Farber JM.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptor: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunology*; 17: 657 – 700.
71. **Horuk R.** 1999. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol. Today*; 20: 89 – 94.
72. **Glass WG, McDermott DH, Lim JK, et al.** 2006. CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J. Exp. Med*; 203: 35 -40.
73. **Hummel S, Schmidt D, Kremeyer B, et al.** 2005. Detection of the CCR5- $\Delta 32$  HIV resistance gene in Bronze Age skeleton. *Genes Immun*; 6: 371 – 374.
74. **Galvani AP, Slatkin M.** 2003. Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5- $\Delta 32$  HIV – resistance allele. *Proc Natl Acad Sci.*; 100: 15276 – 15279.
75. **Novembre J, Galvani AP, Slatkin M.** 2005. The geographic spread of the CCR5  $\Delta 32$  HIV – resistance allele. *PLoS Biol*; 3: 1954 – 1962.
76. **Mecsas J, Franklin G, Kuziel WA, et al.** 2004. CCR5 mutation and plague protection. *Nature*; 427: 606.
77. **Cohen SK, Weaver LT.** 2006. The Black Death and AIDS: CCR5- $\Delta 32$  in genetics and history. *Q. J. Med*; 99: 497 – 503.

78. **Rizzardì GP, Morawetz RA, Vicenzi E, et al.** 1998. CCR2 polymorphism and HIV disease. *Nat. Med*; 4: 252 – 253.
79. **Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, et al.** 1997. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med*; 3: 1160 – 1162.
80. **Smith MW, Carrington M, Winkler C, et al.** 1997. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat. Med*; 3: 1052 – 1053.
81. **Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, et al.** 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat. Med*; 4: 350 – 353.
82. **Su B, Jin L, Hu F, et al.** 1999. Distribution of two HIV-1 – resistance polymorphisms (SDF1-3'A and CCR2 - 64I) in East Asian and World Populations and its implication in AIDS epidemiology. *Am. J. Human Genet*; 65: 1047 – 1053.
83. **Verma R, Gupta RB, Singh K, et al.** 2007. Distribution of CCR5 $\Delta$ 32, CCR264I and SDF1-3'A and plasma levels of SDF-1 in HIV-1 seronegative North Indians. *J. Clin. Virol*; 38: 198 – 203.
84. **Carrington M, Kissner T, Gerrard B, et al.** 1997. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *Am. J. Hum. Genet*; 61: 1261 – 1267.
85. **Martin M, Dean M, Smith MW, et al.** 1998. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science*; 282: 1907 – 1911.
86. **Hunts J; Romanelli F.** 2009. Maraviroc, a CCR5 coreceptor antagonist that blocks entry of human immunodeficiency virus type 1. *Pharmacotherapy*; 29: 295 – 304.
87. **Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, et al.** 2004. Prevalence of chemokine and chemokine receptor polymorphisms in seroprevalent children with symptomatic HIV-1 infection in the United State. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr*; 35: 309 – 313.
88. **Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, et al.** 2003. Genetics influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related

disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection. *J. Infect. Dis*; 188: 1461 – 1472.

89. **Lehman DA, Farquhar C.** 2007. Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Rev. Med. Virol*; 17: 381 – 403.
90. **Sheppard HW, Ascher MS.** 1992. The natural history and pathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Microbiol*; 46: 533 – 564.
91. **Fätkenheuer G, Pozniak AL, Johnson MA, Plettenberg A, Staszewski S, Hoepelman AI, Saag MS, Goebel FD, Rockstroh JK, Dezube BJ, Jenkins TM, Medhurst C, Sullivan JF, Ridgway C, Abel S, James IT, Youle M, van der Ryst E.** 2005. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med. Nov*; 11(11): 1170-2.
92. **Morgan A, Pimentel J.** 2002. Estudio de la Frecuencia del Polimorfismo del Gen CCR5 para la Mutación Delta 32 en Voluntarios de Bancos de Sangre en Panamá. Tesis de Grado para optar por el título de Licenciado en Tecnología Médica.
93. **Buseyne F, Janvier G, Teglas JP, Ivanoff S, Burgard M, Bui E, Mayaux MJ, Blanche S, Rouzioux, Riviere Y.** 1998. Impact of heterozygosity for the chemokine receptor CCR5 32-bp-deleted allele on plasma virus load and CD4 T lymphocytes in perinatally human immunodeficiency virus-infected children at 8 years of age. *J. Infec. Dis*, Oct; 178(4): 1019-23.
94. <http://www.alonsoroy.com> Canal de Panamá y la Era Republicana Panameña.
95. **Xavier-Acosta A, Grimaldi-Sampaio R, Lima-Spínola J, Galvão-Castro B.** 2003. Distribution of the CCR2-64I allele in three Brazilian ethnic groups. *Genet. Mol. Biol*, 26 (3): 241-243.
96. **Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Martinez AC.** 1999. Chemokine control of HIV-1 infection. *Nature*, 400: 723 – 724.
97. **De Pinho Lott Carvalhaes, Cardoso GL, Vallinoto AC, Machado LF, Ishak MO, Ishak R, Guerreiro JF.** 2005. Frequencies of CCR5-delta 32, CCR2-64I and SDF1-3'A mutations in Human HIV seropositive subjects and seronegative individuals from the State of Pará in Brazilian Amazonia. *Genet. Mol. Biol*, 28 (4): 665 – 669.

# **ANEXOS**

**ANEXO N° 1**  
**SISTEMA DE CLASIFICACIÓN CDC PARA INFECCIÓN DEL VIH EN NIÑOS**  
**MENORES DE 13 AÑOS DE EDAD (REVIADO 1994)**

Definición de Categoría Inmunológica:- Basado en el conteo o porcentaje de linfocitos T CD4, determinamos la categoría inmunológica.

<b>CATEGORÍA INMUNOLÓGICA</b>	<b>EDAD DEL NIÑO</b>					
	<b>&lt; 12 meses</b>		<b>1 – 5 años</b>		<b>6 – 12 años</b>	
	<b><i>μl</i></b>	<b>(%)</b>	<b><i>μl</i></b>	<b>(%)</b>	<b><i>μl</i></b>	<b>(%)</b>
<b>1:</b> Sin evidencia de supresión	≥ 1,500	≥ 25	≥ 1,000	≥ 25	≥ 500	≥ 25
<b>2:</b> Evidencia de supresión moderada	750– 1,499	15 -24	500-999	15-24	200-499	15-24
<b>3</b> Severa supresión	< 750	<15	< 500	<15	< 200	< 15

Si el conteo de CD4 y el porcentaje de CD4 indican diferente categoría de clasificación, el niño debe ser evaluado en la categoría más severa,

Infección Pediátrica de Infección por VIH:- Usando las definiciones de categoría clínica se determinaron.

<b>CATEGORÍAS CLÍNICAS</b>				
<b>CATEGORÍAS INMUNOLÓGICAS</b>	<b>N: No signos/síntomas</b>	<b>A Leves signos/síntomas</b>	<b>B: Moderado signos/síntomas</b>	<b>C: Severos signos/síntomas</b>
<b>1:</b> Sin evidencia de supresión	N1	A1	B1	C1
<b>2:</b> Evidencia de supresión moderada	N2	A2	B2	C2
<b>3:</b> Severa supresión	N3	A3	B3	C3

**ANEXO N°2**  
**SISTEMA DE CLASIFICACIÓN CDC PARA INFECCIÓN DEL VIH EN ADULTOS**  
**(REVISADO 1993)**

Definición de Categoría Inmunológica:- Basado en el conteo o porcentaje de linfocitos T CD4, determinamos la categoría inmunológica.

CATEGORÍA INMUNOLÓGICA	CATEGORÍA CLÍNICA		
	A Asintomático	B Sintomático	C SIDA
>500 cél/mm <sup>3</sup> (≥29%)	A1	B1	C1
200-499 cél/mm <sup>3</sup> (14-28%)	A2	B2	C2
<200 cél/mm <sup>3</sup> (<14%)	A3	B3	C3

(NOTA:- El sombreado gris indica la definición de SIDA-CD4 <200 cél/mm<sup>3</sup> o <14% o categoría C)

DEFINICIÓN DE CASO SEGÚN CDC 1993		
<b>CATEGORÍA A</b> (VIH asintomático)	Infección del VIH asintomático Linfoadenopatía generalizada persistente (PGL) Infección de VIH aguda con acompañamiento de enfermedad	
<b>CATEGORÍA B</b> (VIH sintomático)	Angiomatosis bacilar Candidiasis orofaríngea, vulvovaginal Displasia cervical Leucoplasia vellosa	Herpes zoster Púrpura trombocitopénica idiopática Listeriosis Enfermedad inflamatoria pélvica Neuropatía periferal
<b>CATEGORÍA C</b> (SIDA)	Candidiasis de bronquios, tráquea o pulmones Candidiasis esofágica Cáncer cervical, invasivo Coccidioidomicosis diseminada o extrapulmonar Criptosporidiosis crónica Enfermedad por CMV o retinitis Encefalopatía relacionada con VIH Virus herpes simplex Histoplasmosis diseminada o extrapulmonar	Demencia asociada a VIH Sarcoma de Kaposi Neumonía linfocítica intersticial Tuberculosis Nocardiosis Septicemia por <i>Salmonella</i> Neumonía recurrente Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i> Toxoplasmosis de órganos internos Síndrome de desgaste debido a VIH



**ANEXO N° 3**  
**APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA**



**INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE ESTUDIOS DE LA SALUD**  
**COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA DE LA INVESTIGACION**

Panamá, República de Panamá

No. 921/CNB/ICGES/2005  
30 de noviembre de 2005

Licenciada  
**DALIS MOJICA**  
Investigadora Principal

Estimada Lic. Mojica.

El Comité Nacional de Bioética de la Investigación del ICGES, recibió el 18 de octubre de 2005 y en su sesión del 29 de noviembre de 2005, aprobó el **Protocolo Valor pronóstico de la Neopterina en el progreso de la infección por VIH y su correlación con otros marcadores utilizados actualmente en la evaluación de activación inmune en pacientes HIV positivos en Panamá, para ser realizado en la República de Panamá en voluntarios.**

Me despido con la seguridad de mi más alta consideración y respeto.

**DRA. RUTH GRACIELA DE LEÓN**  
Presidenta del Comité Nacional de  
Bioética de la Investigación

Copia: Dr. Jorge Motta, Director General del ICGES

jessca

**"LÍDERES DE LA INVESTIGACIÓN, COMPROMETIDOS CON LA SOLUCIÓN DE LOS PROBLEMAS DE LA SALUD"**

Ave. Justo Arosemena y Calle 35 • Tel.: (507) 227-4111 Fax: (507) 225-4366 • Apartado Postal N° 0816 02593 Panamá, República de Panamá

e-mail: igorgas@gorgas.gob.pa