

MIP-1 $\beta$  (CCL4): Estudio de su regulación transcripcional y evaluación de las implicaciones del polimorfismo a nivel del locus B

Memoria de la Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en la Universitat Autònoma de Barcelona.

Badalona, Barcelona. Octubre 2002

Patricia Adreani Rizo

Manel Juan i Otero, Professor Associat d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i Metge Especialista en Immunologia a l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,

CERTIFICA

Que la tesis titulada " MIP-1 $\beta$  (CCL4): Estudi de la seva regulació transcripcional i avaluació de les implicacions del polimorfisme a nivell del seu locus B " ha sigut realitzada per Patricia Adreani Rizzo sota la seva direcció i considera que és apta per a ser presentada i optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques per la Universitat Autònoma de Barcelona.

La qual cosa faig constar per als efectes oportuns

en Badalona, a 19 de Juliol del 2002.

Dr. Manel Juan i Otero

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

LIRAD-CTBT / Hospital Univ Germans Trias i Pujol

<b>INDICE</b>	I
<b>INDICE GENERAL</b>	III
<b>INDICE TABLAS</b>	IX
<b>INDICE FIGURAS</b>	XIII
<b>ABREVIATURAS</b>	XVI
	I
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Quimiocinas	5
1.1.1. Clasificación y Nomenclatura	7
1.1.2. Organización Genética	11
1.1.3. Estructura proteica	12
1.1.4. Función de las quimiocinas	13
1.1.5. Receptores de quimiocinas	20
1.2. Familia de las CC quimiocinas	23
1.3. Quimiocina MIP-1 $\beta$	25
1.3.1. Identificación de MIP-1 $\beta$	26
1.3.2. Localización cromosómica	27
1.3.3. Estructura proteica de MIP-1 $\beta$	29
1.3.4. Regulación genética	32
1.3.5. Interacción de MIP-1 $\beta$ con sus receptores	34
1.3.6. Participación de MIP-1 $\beta$ en el tráfico, reclutamiento celular y respuesta inmune	35
1.3.7. Células y tejidos que expresan MIP-1 $\beta$	38
1.3.8. Actividades fisiopatogénicas	38
1.3.9. MIP-1 $\beta$ en la respuesta viral	40
1.4. Quimiocinas y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1)	41
1.4.1. Historia del VIH-1	41
1.4.2. Estructura del VIH-1	42
1.4.3. Ciclo de replicación del VIH-1	43
1.4.4. Receptores del VIH	47
1.4.4.1. CCR5: Correceptor de cepas M-trópicas	51
1.4.4.1.1. Localización genética y Estructura Proteica	51
1.4.4.1.2. Interacción del receptor CCR5 con sus ligandos	53
1.4.4.1.3. Expresión de CCR5 en células y tejidos	54
1.4.4.1.4. Regulación de la expresión de CCR5	55
1.4.4.2: CXCR4: Correceptor de cepas T-trópicas	56
1.5. Polimorfismos que alteran la historia natural de la infección por el VIH.	58

1.5.1. Polimorfismo del receptor CCR5	58
1.5.2. Polimorfismo de la CXC quimiocina SDF-1	60
1.5.3. Polimorfismo del receptor de CC quimiocinas CCR2	60
1.6. Resultados previos de nuestro laboratorio	61
1.6.1. Antecedentes	62
1.6.2. Resultados de nuestro grupo	63
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>65</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
<b>4. SUJETOS Y METODOLOGÍA</b>	<b>73</b>
4.1. SUJETOS	75
4.1.1. Individuos Sanos	75
4.1.2. Pacientes	75
4.1.2.1. Pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune	75
4.1.2.2. Pacientes Diabéticos	76
4.1.2.3. Pacientes con VIH+	76
<b>4.2. METODOLOGÍA</b>	<b>76</b>
4.2.1. Aislamiento Celular	76
4.2.1.1. Obtención de células mononucleadas de sangre periféricas (PBMCs).	76
4.2.1.2. Aislamiento de células T CD8+	77
4.2.2. Cultivo Celular	78
4.2.2.1. Línea celular U-937	79
4.2.2.2. PBMCs y células T CD8+	79
4.2.3. Análisis por citometría de flujo (expresión del receptor CCR5)	80
4.2.4. Extracción de DNA genómico	81
4.2.5. Métodos de extracción de RNA	83
4.2.5.1. Método de Chomczynsky	83
4.2.5.2. Extracción de RNA (Kit RNAqueous™-4PCR de Ambion)	85
4.2.6. Tratamiento con DNAasa-I de las muestras de RNA	86
4.2.7. Ajuste de la concentración de las muestras de RNA por precipitación	87
4.2.8. Retrotranscripción	88
4.2.9. PCR Genérica	88
4.2.9.1. PCR Específica	89
4.2.9.2. PCR Genérica	90
4.2.10. RT-PCR	90
4.2.10.1. Normalización del cDNA	90
4.2.10.2. PCR Semicuantitativa	92
4.2.11. PCR a tiempo real	94
4.2.12. Hibridación	96
4.2.13. Diseño de un Estándar Interno	98
4.2.14. Electroforesis de ácidos nucleicos	107
4.2.15. ELISA para MIP-1β	110
4.2.16. Estadística	113
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>115</b>
5.1. Determinación del Polimorfismo del locus B de MIP-1β en distintas poblaciones.	117

5.1.1. PCR Específicas	117
5.1.2. Hibridación post-PCR genérica	120
5.1.3. Secuenciación post-PCR genérica	125
5.1.4. Análisis Multiparamétrico de los pacientes VIH+	128
5.2. Otros polimorfismos que intervienen en la historia natural de la infección por el VIH+	134
5.2.1. Polimorfismo del receptor CCR5	134
5.2.2. Polimorfismo de la quimiocina SDF-1	136
5.3. Diseño de un estándar interno que permita el estudio de expresión diferencial de los loci A y B de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$ .	138
5.3.1. Generación de un Estándar Interno que controla la RT-PCR y coamplifica con el cDNA de MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$ .	139
5.3.2. Cuantificación en número de copias del gen de interés a partir de la PCR competitiva	142
5.3.3. El Estándar Interno actúa como control de la digestión utilizando la enzima de restricción MspI.	144
5.3.4. Uso de la RT-AFLP para evaluar la expresión génica de MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$ .	147
5.3.5. Comparación de las cinéticas del Estándar Interno con respecto a los cDNAs de MIP-1 $\beta$ en la reacción de amplificación por rt-PCR.	149
5.4. Estudio de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ luego de la estimulación con IL-2 y PHA.	151
5.4.1. Estudio de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ en PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ tras la estimulación con IL-2 y PHA.	153
5.4.1.1. Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ de genotipo BB.	153
5.4.1.2. Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ de genotipo	156

	Bb.	
5.4.1.3.	Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ de genotipo bb.	159
5.4.2.	Estudio de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ en linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ tras la estimulación con IL-2 y PHA.	163
5.4.2.1.	Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ de genotipo BB.	163
5.4.2.2.	Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de linfocitos T CD8+ en individuos control y pacientes VIH+ de genotipo Bb.	167
5.4.2.3.	Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de linfocitos T CD8+ en individuos control y pacientes VIH+ de genotipo bb.	171
5.5.	Determinación de los niveles de MIP-1 $\beta$ producidos por PBMCs y linfocitos T CD8+ estimulados con IL-2 y PHA.	175
5.5.1.	Determinación de los niveles de MIP-1 $\beta$ producidos por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+.	176
5.5.2.	Determinación de los niveles de MIP-1 $\beta$ producidos por linfocitos T CD8+ purificados de individuos control y pacientes VIH+.	178
5.6.	Estudio de la expresión del receptor CCR5 en PBMCs y linfocitos T CD8+ purificados, estimulados con IL-2 y PHA de individuos control y pacientes VIH+.	181
5.6.1.	Estudio de la expresión del receptor CCR5 en monocitos estimulados con IL-2 y PHA.	181
5.6.2.	Estudio de la expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD4+ de PBMCs estimulados con IL-2 y PHA.	183

5.6.3. Estudio de la expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD8+ de PBMCs estimulados con IL-2 y PHA.	185
--	-----

<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>189</b>
6.1. Metodologías desarrolladas para determinar el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ .	191
6.2. Influencia del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ en pacientes VIH+ y su relación con otros parámetros clínicos.	195
6.3. Utilidad y aplicabilidad del Estándar Interno en la valoración del mRNA de MIP-1 $\beta$ .	199
6.4. Expresión diferencial de MIP-1 $\beta$ en PBMCs y linfocitos T CD8+.	201
6.5. Influencia del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ en la expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD4+, T CD8+ y monocitos.	204
6.6. Relación del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ con los polimorfismos del receptor de quimiocinas CCR5 y de la quimiocina SDF-1, en la población de pacientes VIH+.	207
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>211</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>215</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>241</b>

## **INDICE FIGURAS**

### **INTRODUCCIÓN**

<i>Figura I.1. Alineación de la secuencia aminoacídica de las CXC, CC y C quimiocinas.</i>	14
<i>Figura I.2: Regulación del movimiento leucocitario a través de las quimiocinas.</i>	17
<i>Figura I.3: Estructura general de los receptores de quimiocinas</i>	20
<i>Figura I.4: Representación de la localización cromosómica de MIP-<math>\alpha</math> y MIP-1<math>\beta</math></i>	28
<i>Figura I.5: Representación esquemática de la estructura tridimensional de MIP-1<math>\alpha</math> y MIP-1<math>\beta</math></i>	31
<i>Figura I.6: Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo I</i>	43
<i>Figura I.7: Ciclo de vida del VIH simplificado</i>	44
<i>Figura I.8: Estructura del receptor CCR5</i>	52
<i>Figura I.9: Estructura de la variante <math>\Delta 32</math> del receptor de CCR5</i>	59

### **RESULTADOS**

<i>Figura R.1: Amplificación de las muestras con cebadores específicos</i>	119
<i>Figura R.2: Amplificación de las muestras con cebadores genéricos</i>	121
<i>Figura R.3: Re-amplificación de las muestras con cebadores genéricos</i>	121
<i>Figura R.4: Hibridación de membranas con sondas para el alelo b y B</i>	122
<i>Figura R.5: Secuenciación con sonda específica para el alelo b</i>	126

<i>Figura R.6: Esquema del Estándar Interno</i>	139
<i>Figura R.7: Coamplificación del EI con MIP-1<math>\alpha</math> y MIP-1<math>\beta</math></i>	141
<i>Figura R.8: Cuantificación de la reacción competitiva</i>	143
<i>Figura R.9: Digestión del Estándar Interno y MIP-1<math>\beta</math> con MspI</i>	146
<i>Figura R.10: Estimulación de la línea celular U-937 con LPS, PMA e Ionomicina</i>	148
<i>Figura R.11: Cinéticas de amplificación del EI y MIP-1<math>\beta</math> por rt-PCR</i>	150
<i>Figura R.12: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en PBMCs de individuos control (BB)</i>	153
<i>Figura R.13: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en PBMCs de pacientes VIH+ (BB)</i>	155
<i>Figura R.14: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en PBMCs de individuos control (Bb)</i>	156
<i>Figura R.15: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en PBMCs de pacientes VIH+ (Bb)</i>	158
<i>Figura R.16: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en PBMCs de individuos control (bb)</i>	160
<i>Figura R.17: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en PBMCs de pacientes VIH+ (bb)</i>	161
<i>Figura R.18: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control (BB)</i>	164
<i>Figura R.19: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (BB)</i>	166
<i>Figura R.20: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en linfocitos T CD8+ de individuos control (Bb)</i>	168
<i>Figura R.21: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (Bb)</i>	170
<i>Figura R.22: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en linfocitos T CD8+ de individuos</i>	172

<i>control (bb)</i>	
<i>Figura R.23: Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1<math>\beta</math> total en linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (bb)</i>	174
<i>Figura R.24: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ (BB)</i>	177
<i>Figura R.25: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ (bb).</i>	178
<i>Figura R.26: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB)</i>	180
<i>Figura R.27: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (bb)</i>	181
<i>Figura R.28: Expresión de CCR5 en monocitos de individuos control y pacientes VIH+ (bb, Bb, bb)</i>	183
<i>Figura R.29: Expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ de individuos control y pacientes VIH+ (bb, Bb, bb)</i>	185
<i>Figura R.30: Expresión de CCR5 en linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (bb, Bb, bb)</i>	187

## **DISCUSIÓN**

<i>Figura D.1. Estructura dimérica de MIP-1<math>\beta</math></i>	196
---	-----

## INDICE TABLAS

### INTRODUCCIÓN

Tabla I.1. CXC, CC, XC y CXC Quimiocinas y Receptores	9
Tabla I.2: Expresión de MIP-1 $\beta$ en células de cultivo	39

### SUJETOS Y METODOLOGÍA

Tabla M.1: Cebadores y Sondas	91
-------------------------------	----

### RESULTADOS

Tabla R.1: Resultados del polimorfismo a través de la técnica PCR-SSP	120
Tabla R.2: Resultados del polimorfismo a través de la técnica de hibridación.	124
Tabla R.3: Frecuencias alélicas del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$	127
Tabla R.4.A: Análisis multiparamétrico de los pacientes VIH+ BB.	129
Tabla R.4.B: Varianza total explicada	129
Tabla R.4.C: Matriz de componentes	129
Tabla R.5 A: Análisis multiparamétrico de los pacientes VIH+ Bb	130
Tabla R.5.B: Varianza total explicada	130
Tabla R.5.C: Matriz de componentes	130
Tabla R.6.A: Análisis multiparamétrico de los pacientes VIH+ bb	131
Tabla R.6.B: Varianza total explicada	132
Tabla R.6.C: Matriz de componentes	132
Tabla R.7.A: Análisis multiparamétrico de los pacientes VIH+ BB, Bb, bb	133
Tabla R.7.B: Varianza total explicada	133
Tabla R.7.C: Matriz de componentes	133
Tabla R.8: Frecuencias alélicas del polimorfismo de CCR5	135
Tabla R.9: Frecuencias alélicas del polimorfismo de SDF-1	137
Tabla R.10: Longitud (en pb) de los productos de amplificación y	145

*de los fragmentos de restricción tras RT-AFLP para MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ .*

<i>Tabla R.11: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de PBMCs de individuos control (BB)</i>	<i>154</i>
<i>Tabla R.12: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de PBMCs de pacientes VIH+ (BB)</i>	<i>155</i>
<i>Tabla R.13: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de PBMCs de individuos control (Bb)</i>	<i>157</i>
<i>Tabla R.14: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de PBMCs de pacientes VIH+ (Bb)</i>	<i>159</i>
<i>Tabla R.15: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de PBMCs de individuos control (bb)</i>	<i>160</i>
<i>Tabla R.16: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de PBMCs de pacientes VIH+ (bb).</i>	<i>162</i>
<i>Tabla R.17: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control (BB)</i>	<i>165</i>
<i>Tabla R.18: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (BB)</i>	<i>167</i>
<i>Tabla R.19: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ individuos control (Bb)</i>	<i>169</i>
<i>Tabla R.20: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (Bb)</i>	<i>171</i>
<i>Tabla R.21: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control (bb)</i>	<i>173</i>
<i>Tabla R.22: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (bb)</i>	<i>175</i>
<i>Tabla R.23: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ (BB)</i>	<i>176</i>

<i>Tabla R.24: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ (bb)</i>	178
<i>Tabla R.25: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB).</i>	179
<i>Tabla R.26: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (bb).</i>	180
<i>Tabla R.27: Expresión de CCR5 en monocitos de individuos control y pacientes VIH+</i>	182
<i>Tabla R.28: Expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ de individuos control y pacientes VIH+</i>	184
<i>Tabla R.29: Expresión de CCR5 en linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+</i>	186

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
BSA	Suero de albúmina bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CCR	Receptor de la familia de las CC quimiocinas
CD	Grupo de diferenciación ( <i>Cluster differentiation</i> )
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Acido Desoxirribonucleico
EI	Estándar Interno
EtBr	Bromuro de Etidio ( <i>Ethidium Bromide</i> )
FACS	Citómetro de Flujo ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> )
FCS	Suero fetal de ternera ( <i>Foetal Calf Serum</i> )
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein Iso Thio Cyanate</i> )
gDNA	DNA genómico
ICAM	Molécula de adhesión intercelular ( <i>Intercellular Adhesion Molecule</i> )
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ITL	Infiltrado linfocitario ( <i>Infiltrated T Lymphocyte</i> )
KAc	Acetato potásico
LPS	Lipopolisacárido
MCP	Proteína Quimioatrayente de Monocitos ( <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> )
ME	Mercaptoetanol

MIP	Proteína Inflamatoria de Macrófagos ( <i>Macrophage Inflammatory Protein</i> )
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
NSI	No formadores de sincitio
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PBMC	Célula mononucleada de sangre periférica ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina ( <i>Pytohemagglutinin</i> )
PMA	( <i>Phorbol 12-Myristate 13-acetate</i> )
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-AFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción sobre la amplificación del mensajero retrotranscrito
RT-PCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Retrotranscription Polymerase Chain Reaction</i> )
rt-PCR	PCR a tiempo real ( <i>Real Time PCR</i> )
SAC	<i>Staphylococcus aureus Cowan I</i>
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SI	Formadores de sincitio
STR	Receptor de siete dominos transmembrana ( <i>Seven Transmembrane Receptor</i> )
T.A.	Temperatura ambiente
TNF	Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## 1. INTRODUCCIÓN

El ser humano está constantemente expuesto a una gran variedad de microorganismos infecciosos que se encuentran en el medio ambiente (bacterias, virus, hongos, parásitos, etc) y que en determinadas ocasiones, cuando lo invaden y se reproducen en él, pueden llegar a causarle enfermedades. Para combatir estas situaciones, es necesaria la presencia de ciertos mecanismos de defensa, que eviten la invasión del organismo por este sinnúmero de posibles patógenos. Los diferentes componentes del sistema inmunitario son los encargados de desarrollar esta acción de prevención y/o eliminación, a través de barreras efectivas (piel y mucosas), células competentes (fagocitos, linfocitos) y diferentes moléculas efectoras (sistema de complemento, anticuerpos, citocinas, quimiocinas, etc) que en su conjunto constituyen una unidad funcional altamente eficaz.

Para poder ejercer su función protectora, el sistema inmunitario (SI) actúa de manera "taoísta", diferenciando lo propio de cualquier agente externo que es considerado como extraño y por tanto negativo, al representar un elemento lesional que debe ser eliminado. Este papel o característica central del SI (discernir lo propio de lo extraño) es desempeñado por las células inmunitarias (linfocitos, células presentadoras, células accesorias) que, en condiciones normales, se encuentran circulando en el organismo, por la sangre y la linfa, hacia los microambientes que caracterizan el lugar del encuentro con el antígeno y que se constituyen en grupos celulares definibles anatómicamente (órganos linfoides). De hecho, esta circulación o vigilancia de las células inmunitarias se extiende hacia casi todos los tejidos, exceptuando parcialmente el sistema nervioso central, en el que la llegada linfocitaria puede considerarse muy escasa. En condiciones normales, este proceso de vigilancia se conoce como "recirculación" y tiene por finalidad detectar el momento en que se produce la invasión del agente patógeno que posteriormente será presentado de forma eficaz a los pocos linfocitos que pueden reconocerlo específicamente (clones). A partir de este reconocimiento, los linfocitos liderarán la reacción

(respuesta inmune) contra el microorganismo o agente extraño para evitar que desarrolle su capacidad lesional.

En este sentido, cuando el organismo sufre la invasión de algún agente infeccioso o bien cuando se produce una lesión física, este proceso de circulación continúa se incrementa notablemente tanto en cantidad como en calidad, potenciándose la llegada de determinados tipos celulares que favorecen la aparición de la inflamación. Así podemos decir que la inflamación se caracteriza por una activación selectiva de ciertos elementos celulares circulantes, que migran de forma masiva desde los capilares hacia el sitio específico donde se está produciendo la lesión. De hecho, estos cambios celulares se explican básicamente por el aumento del volumen sanguíneo en la zona afectada y por el incremento en la permeabilidad vascular debido a cambios funcionales en las células endoteliales. De esta manera se facilita inicialmente la llegada de neutrófilos y de macrófagos (las primeras células en acudir), al igual que los linfocitos que se involucran en ciertas ocasiones y de forma más retardada. Todas estas células inflamatorias son dirigidas a través de estímulos quimiotácticos y definidas por la intervención secuencial de moléculas de adhesión, que posibilitan su distribución por los diferentes tejidos hasta el lugar de destino (Roitt, 1993).

La descripción de los procesos inflamatorios se inició con estudios realizados hace ya más de cien años, en los que se vio que la inflamación casi siempre estaba acompañada de un infiltrado relativamente importante de leucocitos en el sitio de la inflamación (Gallin, *et al*, 1892). Años más tarde, Elie Metchnikoff reconoció que estos leucocitos eran capaces de atravesar el endotelio vascular por diapédesis y migrar desde la circulación hasta el sitio preciso de la infección, para digerir e internalizar los microorganismos causantes de la misma (Metchnikoff, 1901). A partir de estas observaciones y de muchas otras posteriores surgieron algunas interrogantes que se consideraron (y aún hoy se consideran) preguntas centrales del comportamiento del sistema inmunitario; ¿qué motiva a las células para migrar de forma específica al lugar de la infección?, ¿ qué distingue la inflamación patológica de la recirculación fisiológica ?, ¿ éstos fenómenos obedecen a algún estímulo procedente de los patógenos o bien están dirigidos por algún tipo de señal o mediador endógeno ?.

Estas interrogantes estuvieron muchos años sin ser abordadas, hasta que a finales de los años 60 se demostró *in vitro* que los leucocitos eran capaces de migrar a través de unos filtros, cuando estos se enfrentaban a un estímulo inflamatorio que actuaba como quimioatrayente. Estos estudios se realizaron gracias a la invención de la cámara de quimiotaxis, como se conoce hoy, por Boyden, que permite estudiar como los leucocitos son capaces de migrar (Boyden, 1962) y como determinadas sustancias solubles definen esta migración, atrayendo a los leucocitos a favor de gradientes de concentración (quimiotaxis). A partir de estos experimentos iniciales, se identificaron los factores quimiotácticos más potentes y se describió que estos procedían tanto de origen endógeno como exógeno. Así, entre estos factores, se encuentran el N-formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine (fMLF), de origen exógeno y generado sólo por las células procariotas, y sustancias endógenas como el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), el C5a (generado a partir de la activación de la cascada del complemento) y el factor activador de plaquetas (PAF); todos ellos actúan como potentes agentes quimiotácticos (Snyderman R and Uhing RJ, 1992; Goldstein IM, 1992; Hwang S-B, 1990).

Con el transcurrir de los años, se han ido definiendo un amplísimo grupo de determinantes de quimiotaxis procedentes tanto de proteínas del suero, como de péptidos derivados de bacterias, de estructuras celulares y tisulares, y todos ellos con la peculiaridad de poder influir o facilitar, en determinadas ocasiones, la migración selectiva a favor de un gradiente de concentración. Entre ellos, se encontró un gran número de proteínas quimioatrayentes para leucocitos, estructuralmente relacionadas y que se agruparon dentro de lo que hoy conocemos como superfamilia de las quimiocinas (Oppenheim *et al.*, 1991). El nombre de "*Chemokine*" (quimiocina) fue propuesto en el Tercer simposium internacional de citocinas quimiotácticas en Baden, en 1992, al combinar los términos *Chemoattractant* and *cytokine* (citocina quimioatrayente), propiedades básicas que reflejan las características de los péptidos en cuestión.

## 1.1 Quimiocinas

El elemento determinante para la agrupación de las quimiocinas como una gran familia molecular se derivó de los estudios sobre el factor plaquetario 4 (PF4), presente en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas. El PF4 además de unirse fuertemente a la heparina y promover la coagulación de la sangre (Deutsch and Krain, 1961), ejerce un papel fundamental en el inicio de los procesos inflamatorios. El interés de los científicos por su actividad biológica condujo a identificar su secuencia aminoacídica (Deuel *et al.*, 1977), la cual respondía a una proteína pequeña de 70 aminoácidos, que contaba con cuatro residuos de cisteína. Años más tarde, se demostró que además de su efecto coagulante, PF4 inducía selectivamente la migración de monocitos y neutrófilos (Deuel *et al.*, 1981) e incluso de fibroblastos (Senior *et al.*, 1983), por lo que inmediatamente se intentó ver la relación que su peculiar estructura pudiera tener con su función.

Además de PF4, también se reportó la presencia de PBP (*Platelet Basic Protein*), TGF- $\beta$  y  $\beta$ -TG ( $\beta$ -tromboglobulina) en el interior de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, así como su liberación tras la activación plaquetaria. De hecho, la PBP tras sufrir un proceso proteolítico en el extremo N-terminal, es capaz de generar tres moléculas distintas con actividades biológicas claramente diferenciables: la  $\beta$ -TG, la CTAP-III (*Connective Tissue Activating Protein III*) y la NAP-2 (*Neutrophil Activating Peptide 2*) (Begg *et al.*, 1978). La  $\beta$ -TG, descrita como una proteína de 81 aminoácidos, con cuatro residuos de cisteína, también demostró presentar propiedades quimioatrayentes para fibroblastos (Senior *et al.*, 1983), aunque no se reportó lo mismo sobre monocitos y neutrófilos.

La continúa descripción de otras proteínas con estas propiedades quimioatrayentes sobre los leucocitos ha permitido comprobar la relación entre estructura y función, definiendo a partir de los datos comparativos con PF4, aquellas características estructurales comunes (proteínas menores de 100 aminoácidos con cuatro residuos de cisteína). A la vez, esta comparación estructural ha permitido una mejor comprensión sobre otras moléculas implicadas en los procesos de inflamación y recirculación.

En el afán por descubrir nuevas proteínas quimioatrayentes para leucocitos y entender los mecanismos que explican su función, se estudiaron las propiedades físicas y químicas de diferentes proteínas atrayentes, purificándolas y posteriormente analizándolas estructuralmente.

A partir de estos análisis se identificaron varias de las CXC quimiocinas que conocemos actualmente.

Hoy en día, el descubrimiento de nuevas quimiocinas resulta mucho más simple y rápido gracias a las bases de datos informatizadas sobre secuencias nucleotídicas de que disponemos. A partir de ellas, encontrar proteínas de pequeño tamaño y con la estructura molecular característica (cuatro residuos cisteínicos) de las quimiocinas ha resultado más sencillo (Nagira *et al.*, 1997; Bazan *et al.*, 1997), provocando un incremento constante en el proceso de definición de nuevas proteínas.

### **1.1.1. Clasificación y Nomenclatura**

La clasificación de las quimiocinas, como una gran familia de citocinas quimiotácticas, ha contribuido de manera importante al esclarecimiento de las bases moleculares que definen el reclutamiento de diferentes subpoblaciones leucocitarias y la migración selectiva de las mismas (a través de las interacciones con sus receptores celulares de membrana) a aquellos lugares en los que se está desarrollando un proceso infeccioso, inflamatorio o de recirculación normal.

De hecho, el descubrimiento de estas pequeñas moléculas (~8-14 Da), estructuralmente relacionadas y caracterizadas por regular el tráfico de leucocitos, se produjo de una forma acelerada en el tiempo, provocando que varios investigadores utilizaran nombres distintos para referirse a una misma proteína. Esta poca claridad e imprecisión de terminologías hizo que los investigadores propusieran una nomenclatura común para identificar de forma más fácil y precisa a cada una de las quimiocinas. De esta manera, en el *Keystone Chemokine Symposium* se presentó una propuesta de nomenclatura reglada, a través de la cual se identifican las quimiocinas y las familias a las cuales pertenecen (Tabla I.1.). Esta propuesta de racionalización se está imponiendo y está siendo considerada como la nomenclatura más actualizada para las quimiocinas.

Previamente, esta gran familia de proteínas, se subdividió en cuatro grupos, en función de los primeros residuos de cisteína (1 ó 2) presentes en el extremo N-terminal de la proteína madura y del número de aminoácidos presentes entre estos residuos. De esta manera tenemos dos grupos

principales, conformado por las CXC (o  $\alpha$ -quimiocina) que presentan un aminoácido entre los residuos de cisteína y las CC (ó  $\beta$ -quimiocina) que no presentan aminoácido alguno entre los dos residuos, con lo cual permanecen contiguos. Valdría la pena recalcar que existe un subgrupo de la familia de las CC quimiocinas conformado por las I-309, HCC-2, MPIF-1 y la SLC quimiocina, que presentan seis cisteínas (Miller *et al.*, 1990; Nagira *et al.*, 1997), mientras que la Eotaxina 2 presenta 5 residuos de cisteína (Nagira *et al.*, 1997). En el caso de I-309, HCC-2 y MPIF-1, uno de los residuos extra de cisteína está localizado en la hoja  $\beta$  y el otro en el extremo C-terminal de la hélice  $\alpha$ , sugiriendo que estas cisteínas pudieran estar involucradas en la formación del tercer puente disulfuro entre la hélice del extremo C-terminal y la hoja  $\beta$ . En cuanto a la SLC, los dos residuos extras de cisteínas, se encuentran en el dominio C-terminal (Nagira *et al.*, 1997). Sin embargo, hasta ahora no se ha podido definir inequívocamente, que efecto diferencial pueda generar la presencia de estas cisteínas adicionales y las repercusiones en sus actividades biológicas.

Dentro de estos dos grupos CXC y CC quimiocinas, se encuentran casi la totalidad de las quimiocinas descritas hasta el momento. Sin embargo, se han descrito dos familias más de quimiocinas que cuentan con un solo integrante cada una: la C quimiocina y la CX<sub>3</sub>C quimiocina.

La C quimiocina (ó  $\gamma$ -quimiocina) presenta, como característica peculiar, un solo residuo de cisteína en el extremo N-terminal. Sin embargo, a pesar de la falta de uno de los residuos en el extremo N-terminal y el tercer residuo de cisteína presente en el resto de las quimiocinas (Fig.I.1), ésta es capaz de desarrollar actividades quimiotácticas. Esto sugiere que la sustitución de estos residuos conservados no impiden mantener la conformación funcional de la molécula. En cuanto a esta familia, la única quimiocina que se ha caracterizado hasta ahora es la Linfotactina, de la cual se distinguen dos formas (Kelner *et al.*, 1994), la Linfotactina  $\alpha$  U23772, y la linfotactina  $\beta$ , hoy en día designadas como XCL1 y XCL2 respectivamente. Ambas quimiocinas son producto de genes estrechamente relacionados, que se encuentran ubicados en el cromosoma 1. En cuanto a su estructura proteica, se caracterizan por presentar dos aminoácidos diferentes (HR (en la XCL2), en lugar de DK (en la XCL1)), que se localizan poco antes de la primera cisteína.

**Tabla I.1: CXC, CC, XC y CX<sub>3</sub>C Quimiocinas y Receptores**

<b>CXC Quimiocinas</b>			
<b>Nueva Nomenclatura</b>	<b>Antigua Nomenclatura</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Receptor</b>
CXCL1	GRO $\alpha$ / MGSA- $\alpha$	4q12-q13	CXCR1, CXCR2
CXCL2	GRO $\delta$ / MGSA- $\delta$	4q12-q13	CXCR2
CXCL3	GRO $\gamma$ / MGSA-- $\gamma$	4q12-q13	CXCR2
CXCL4	PF4	4q12-q13	Desconocido
CXCL5	ENA-78	4q12-q13	CXCR2
CXCL6	GCP-2	4q12-q13	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	4q12-q13	CXCR2
CXCL8	IL-8	4q12-q13	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	4q21.21	CXCR3
CXCL10	IP-10	4q21.21	CXCR3
CXCL11	I-TAC	4q21.21	CXCR3
CXCL12	SDF-1 $\alpha$ / $\delta$	10q11.1	CXCR4
CXCL13	BLC / BCA-1	4q21	CXCR5
CXCL14	BRAK / bolequine	Desconocido	Desconocido

<b>CC Quimiocinas</b>			
<b>Nueva Nomenclatura</b>	<b>Antigua Nomenclatura</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Receptor</b>
CCL1	I-309	17q11.2	CCR8
CCL2	MCP-1/MCAF	17q11.2	CCR2
CCL3	MIP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	17q11.2	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 $\delta$	17q11.2	CCR5
CCL5	RANTES	17q11.2	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	17q11.2	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	17q11.2	CCR3
CCL11	Eotaxina	17q11.2	CCR3
CCL13	MCP-4	17q11.2	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	17q11.2	CCR1
CCL15	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 $\delta$	17q11.2	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4/LEC	17q11.2	CCR1
CCL17	TARC	16q13	CCR4
CCL18	DC-CK1/PARC AMAC-1	17q11.2	Desconocido
CCL19	MIP-3 $\delta$ /ELC/Exodus-3	9p13	CCR7
CCL20	MIP-3 $\alpha$ /ELC/Exodus-1	2q33-q37	CCR6
CCL21	6Cquina/SLC/Exodus-2	9p13	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1	16q13	CCR4
CCL23	MPIF-1	17q11.2	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxina-2	7q11.23	CCR3
CCL25	TECK	19p13.2	CCR9
CCL26	Eotaxina-3	7q11.23	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	9p13	CCR10
CCL28	MEC	5	CCR3, CCR10

<b>C Quimiocinas</b>			
<b>Nueva Nomenclatura</b>	<b>Antigua Nomenclatura</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Receptor</b>
XCL1	Linfotactina/SCM-1 $\alpha$ /ATAC	1q23	XCR1
XCL2	SCM-1 $\delta$	1q23	XCR1

<b>CX<sub>3</sub>C Quimiocinas</b>			
<b>Nueva Nomenclatura</b>	<b>Antigua Nomenclatura</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Receptor</b>
CX <sub>3</sub> CL1	Fractalquina	16q13	CX <sub>3</sub> CR1

**Tabla I.1:** Nomenclatura propuesta al Subcomité de Nomenclatura de Quimiocinas de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (*Chairman, R. Thorpe*). Muestra la

nomenclatura actual, la antigua, la localización cromosómica de los genes codificantes para cada una de ellas y sus receptores (Adaptado de Zlotnik A. and Yoshie O, 2000).

Por último, tenemos la CX<sub>3</sub>C quimiocina (ó δ-quimiocina) que presenta 3 aminoácidos entre los dos residuos de cisteína del extremo N-terminal. Esta proteína, además de presentar el dominio N-terminal de las quimiocinas, presenta un dominio transmembrana (de tipo mucina) y uno citoplasmático (propiedad que la caracteriza como una quimiocina de membrana) (Bazan *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997). La Fractalkina es la única quimiocina que ha sido identificada dentro de este grupo hasta el momento y a pesar de que se expresa y se encuentra fija a la membrana, también se ha descrito una forma soluble de 95 KDa. Esta forma soluble de 76 aminoácidos es funcional y puede provocar el flujo de calcio intracelular e inducir actividades quimioatrayentes en las células que expresen el receptor CXCR1 (receptor monoespecífico de la Fractalkina).

Por otro lado, la nomenclatura de los receptores está también consensuada. La terminología de receptores transmembrana acoplados a la proteína G, empleada en un principio, fue simplificada y se aplicó una basada en las características estructurales de las subfamilias de sus ligandos correspondientes. De esta manera se nombran como CXC, CC, C y CX<sub>3</sub>C, acompañados de una R (que indica que es receptor para una quimiocina de esa familia) y de un número (que identifica al receptor en cuestión). Es así, como los receptores quedan clasificados de la siguiente manera: CCR1-9, CXCR1-5, XCR1 (receptor de la linfotactina) y el CX<sub>3</sub>CR1 (receptor de la fractalkina) (Zlotnik and Osamu, 2000). De hecho, esta nomenclatura de los receptores fue propuesta incluso antes del *Chemokine Symposium* y su simplicidad animó a los participantes del simposium a intentar la unificación de la terminología de las quimiocinas.

Por lo que se refiere a la nomenclatura de los genes también existe una propuesta unificadora. Haciendo referencia a la nomenclatura previamente en uso, que designaba los genes de las quimiocinas con las siglas SCY (*Small Secreted Cytokine*), la propuesta de *Keystone* agregó una letra al lado que identifica a cada una de las familias. De esta manera, los genes SCYa, corresponden a las CC quimiocinas; los SCYb, corresponden a las CXC quimiocinas; el SCYc es el que codifica para la C quimiocina y por

último el SCYd es el gen de la fractalquina o CX<sub>3</sub>C quimiocina. Ahora bien, para ser más específicos en cuanto a la nomenclatura de la familia de los genes SCYa y SCYb, ya que éstas pueden incluir varios genes diferentes, se acordó agregar el número de la quimiocina para la que codifican, por ejemplo, el gen SCYa 27 es el que codifica para la quimiocina CCL27.

Si bien aún coexisten los términos más clásicos (como MIP-1β), esta nomenclatura debe considerarse como la opción a usar, puesto que pretende la identificación clara y precisa del ligando, receptor y gen en cuestión. Además, este sistema permite una mejor comprensión de la terminología que hasta ahora resultaba confusa y reiterativa, unificando términos que dispersaban la información relativa a cada quimiocina. De cualquier modo, existen términos muy extendidos como es el caso de MIP-1β, la quimiocina que centra esta tesis. La amplia aceptación de este nombre ha hecho que optáramos por él al referirnos a esta quimiocina, en un intento de simplificar lecturas parciales en este texto, en las cuales el término CCL4 obligaría a muchos a buscar su equivalente como MIP-1β.

### **1.1.2. Organización Genética**

La mayoría de las quimiocinas, si no todas, probablemente derivan de la duplicación de un gen ancestral común (Zlotnik *et al.*, 2000). Varias de las CXC quimiocinas, que actúan principalmente en neutrófilos, se encuentran ubicadas en el cromosoma 4q12-13, mientras que las CC quimiocinas, que actúan principalmente en monocitos, se encuentran ubicadas en el cromosoma 17q11.2. Por otro lado, valdría la pena recalcar un dato curioso y es que existe un pequeño grupo de CXC quimiocinas (CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 y CXCL11/I-TAC) que han mostrado ser altamente específicas para linfocitos T y que se encuentran en el cromosoma 4, pero localizadas en un *miniclust*er aparte (4q21.21). Esta ubicación selectiva pareciera estar relacionada con la especialización funcional que desarrolla la citada subfamilia de quimiocinas durante su proceso evolutivo: no parecen compartir receptores ni desarrollar funciones similares al resto de las quimiocinas, lo cual hace pensar además, que estas quimiocinas pueden considerarse más antiguas hablando en términos evolutivos (Zlotnik and Osamu, 2000).

Por otro lado cabe reseñar, que los genes de las CC y CXC quimiocinas descritas más recientemente, tienden a ocupar una posición distinta en el cromosoma, al de los *cluster* principales (4q12-13 y 17q11.2).

La multiplicación de genes en estos *clusters* probablemente se pueda relacionar con el gran número de quimiocinas que tienen que actuar en un momento dado, para ejercer un efecto quimioatrayente efectivo sobre neutrófilos o monocitos en un proceso de respuesta inflamatoria.

En cuanto a su estructura genómica, se ha constatado que los genes de las CXC quimiocinas están representados mayoritariamente por cuatro exones y tres intrones. Estos genes cuentan además con otra característica especial, y es que la secuencia que limita exón/intrón está altamente conservada en esta familia. Por su parte los genes de las CC quimiocinas, sólo tienen tres exones y dos intrones (Schall, 1991; Miller and Krangel, 1992), aunque no nos extenderemos en la descripción de esta estructura genómica conservada que de hecho no aplica a MIP-1 $\beta$ .

### **1.1.3. Estructura proteica**

Las quimiocinas presentan una característica fundamental en cuanto a su estructura secundaria, y es la presencia de tres hojas  $\beta$  antiparalelas, una hélice  $\alpha$  en el extremo C-terminal y una región N-terminal flexible seguida por un asa. La relación espacial que existe entre el extremo N-terminal, la hoja  $\beta$  y la hélice  $\alpha$ , se mantiene gracias a los dos puentes disulfuros intracatenarios. Esta estructura tridimensional no pasaría de ser una peculiaridad descriptiva, si no fuera porque cada una de estas zonas estructurales determinan propiedades funcionales bastante características.

Así, el extremo N-terminal es esencial para la activación de receptores acoplados a proteína G (Gong and Clark-Lewis, 1995). De hecho, el extremo N-terminal junto con la hoja  $\beta$  son capaces de crear una estructura para que se lleven a cabo las interacciones de alta afinidad entre el ligando y sus receptores. Por su parte, la hélice  $\alpha$  ubicada en el extremo C-terminal de algunas quimiocinas establece interacciones de baja afinidad entre la proteína y los glicosaminoglicanos, presentes en la matriz extracelular y en la superficie de las células endoteliales (Witt and Lander, 1994).

En cuanto a las diferencias que existen entre las estructuras primarias de las quimiocinas, podríamos decir que éstas están relacionadas con su especificidad a la hora de interactuar tanto con el receptor, como con la célula diana. Se han hecho ensayos de mutagénesis dirigida, en los que un simple cambio de aminoácido es capaz de provocar que una CXC quimiocina reconozca a un CC receptor u otro. El ensayo se hizo con la IL-8, en la que se cambió una leucina en posición 25 por una tirosina, reflejando una menor afinidad por su receptor CXCR2 (alrededor de 100 veces) y por tanto una disminución en el efecto quimioatrayente sobre neutrófilos, pero no sobre monocitos (Lusti-Narasimhan *et al.*, 1995). De igual forma se hizo el estudio sobre MCP-1, cambiando una tirosina en posición 28 por una leucina y una asparagina en posición 30 por una valina, lo cual provocó un efecto quimioatrayente sobre neutrófilos en lugar de monocitos (Beall *et al.*, 1992). Estos resultados reflejan la estrecha relación que existe entre la estructura primaria y la función de las quimiocinas (Fig. I.1).

#### **1.1.4. Función de las quimiocinas**

Para que el sistema inmune sea capaz de responder de manera específica y coordinada frente a la invasión por microorganismos patógenos, a la presencia de proteínas y polisacáridos extraños, es indispensable la migración selectiva de los diferentes tipos celulares al lugar donde se está produciendo la infección, constituyendo ésta, una de las propiedades más conocidas de las quimiocinas. En este sentido, para que se lleve a cabo este proceso, las quimiocinas deben facilitar la adhesión de las células en circulación a la superficie endotelial, contribuyendo a que estas células atraviesen el endotelio. De esta manera las quimiocinas facilitan la migración selectiva hacia el tejido donde se está produciendo la inflamación (Springer *et al.*, 1994).

En el desarrollo de todo este proceso, se llevan a cabo interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que están mediadas por moléculas de adhesión. Éstas conforman un grupo de receptores heterogéneos que se encuentran en la superficie de las células y que facilitan, de alguna manera, la movilidad de las células en los diferentes tejidos (Dunon *et al.*, 1996). Sin embargo, además de las moléculas de adhesión, como las selectinas y las

integrinas, es necesaria la intervención de los receptores de las quimiocinas para que se desarrollen con éxito los procesos de adhesión, extravasación y migración selectiva de las células.

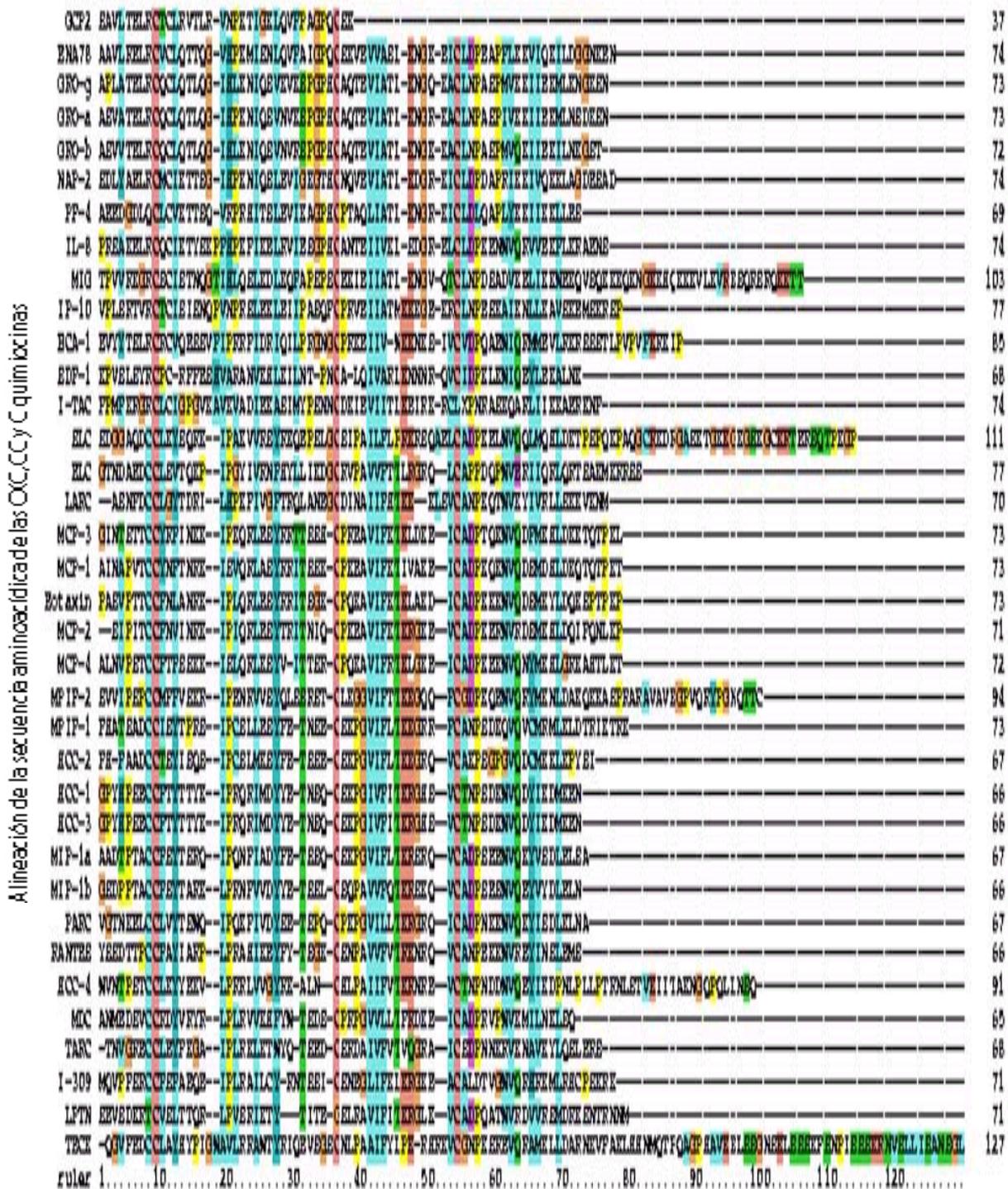


Fig 1.1. La secuencia proteica inicia a partir del aminoácido 10 de la segunda cisteína y no del aminoácido inicial (Oppenheim et al, 2000)

Este proceso global se suele dividir en dos fases, las cuales serán controladas y definidas por las quimiocinas y sus receptores. La primera etapa, constituye la agrupación de las células y la adhesión de las mismas al endotelio vascular. Una vez adheridas, los leucocitos son capaces de viajar a través del endotelio vascular, por medio de constantes interacciones reversibles, con una  $K_d$  relativamente alta, entre las lectinas y sus receptores (Dunon *et al.*, 1996). En condiciones normales, estos leucocitos mantienen un viaje constante que nunca detienen en los tejidos periféricos; sin embargo, cuando hay un estímulo, como pueden ser la IL-1 ó el TNF (Factor de Necrosis Tumoral), otras moléculas de adhesión se expresan en la superficie de la célula endotelial favoreciendo la atracción de los leucocitos.

Los leucocitos, al interactuar con las integrinas se adhieren con más fuerza al endotelio e interactúan con las quimiocinas, que están expresadas o han sido inducidas en la superficie de las células endoteliales (Springer *et al.*, 1994; Butcher *et al.*, 1996). La interacción entre las quimiocinas y sus receptores específicos (presentes en los leucocitos), estabilizará aún más la unión entre las células e inducirán señales intracelulares que provocarán cambios en la forma de la célula (pseudópodos, aplanamiento celular, etc.), producidos, entre otros, por la polimerización de actina y la redistribución y activación de las moléculas de adhesión presentes en la superficie de la célula. El conjunto de estos cambios moleculares, facilitarán la diapédesis y la migración celular hacia el tejido inflamado (Oppenheim *et al.*, 2.000).

La segunda etapa, que está totalmente controlada por las quimiocinas y sus receptores, constituye la migración de las células y su posicionamiento en el tejido inflamado, mediado por diferentes gradientes de concentración y otros factores quimiotácticos. Los leucocitos son capaces de cruzar el endotelio utilizando de forma prevalente un receptor de quimiocina, luego atraviesan el intersticio celular inducidos principalmente por otro receptor y finalmente llegan hasta el tejido inflamado utilizando quizá otro receptor de forma preferente. Este proceso se ha descrito en neutrófilos y se conoce como navegación en múltiples pasos (Foxman *et al.*, 1997). De hecho, este recorrido hacia el tejido inflamado es definido gracias a señales quimiotácticas que los leucocitos se encuentran a lo largo del camino y a las cuales responden (Fig. I.2).

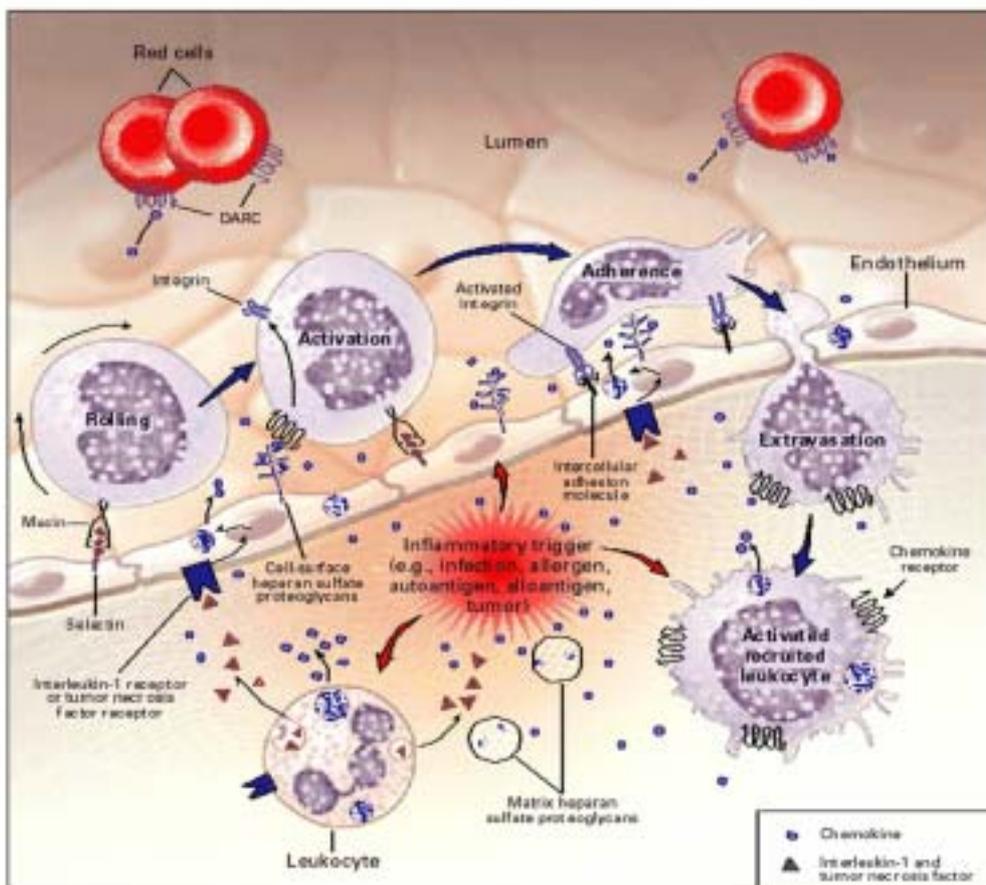
Se ha descrito que el papel que juegan las quimiocinas en este proceso global es diferente en cada caso. Si bien algunas quimiocinas son importantes en el desarrollo de los procesos inflamatorios (principalmente en la fase de detención celular y la migración hacia los tejidos (como por ejemplo IL-8 (Bazzoni *et al.*, 1991), RANTES (Schall *et al.*, 1990), eotaxina (Jose *et al.*, 1994), MIP-1 $\beta$  (Sherry *et al.*, 1988), MCP-1 (Leonard and Yoshimura, 1990) e IP-10 (Luster and Ravetch, 1987)), otras juegan un papel fundamental en el mantenimiento del tráfico y la compartimentalización de las células dentro de los tejidos linfoides (como por ejemplo, BCA-1, SLC y ELC (Legler *et al.*, 1998; Nagira *et al.*, 1997; Gunn *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1997)). También hay ciertas quimiocinas que se han implicado en ambos roles, dependiendo de su localización (como es el caso de la MDC (*Macrophage Derived Chemokine*) (Godiska *et al.*, 1997) y TECK (Vicari *et al.*, 1997). Este comportamiento selectivo le otorga cierta flexibilidad al sistema y facilita de alguna forma, la localización específica de las células (Baggiolini *et al.*, 1997).

Además de esta característica principal (la quimiotaxis), se han propuesto un sinnúmero de funciones: desarrollo y diferenciación de linfocitos T y B, regulación de las células dendríticas, desarrollo y mantenimiento de la hemostasia, regulación del sistema linfoides, definición de las respuestas de tipo Th1 y Th2, respuestas anti-virales (específicamente contra el VIH), etc.

Las células dendríticas, presentes en el intersticio de la mayoría de los órganos, en los ganglios linfáticos y en el bazo principalmente, destacan por la capacidad que tienen de capturar el antígeno, procesarlo y migrar hasta los órganos linfoides secundarios, donde se produce la presentación de los péptidos antigénicos a los linfocitos T y su consecuente estimulación (Hart *et al.*, 1997; Banchereau *et al.*, 1998). El procesamiento y la presentación del antígeno son elementos críticos, tanto para el inicio como para la modulación de la respuesta inmune. Además, se ha descrito que las células dendríticas son capaces de producir diferentes tipos de quimiocinas de forma específica, como por ejemplo, la CCL17/TARC (Imai *et al.*, 1996; Sallusto *et al.*, 1999), la CCL18/DC-CK-1/PARC (Adema *et al.*, 1997; Hieshima *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1999), la CCL25/TECK (Vicari *et al.*, 1997), la CCL22/MDC (Godiska *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1999) y la CCL19/MIP3 $\beta$ /ELC (Sallusto *et al.*, 1999). Sin embargo, de todas estas

quimiocinas, la que se produce de forma más específica por este tipo celular es CCL17 (Imai *et al.*, 1999). La producción de todas estas quimiocinas a partir de las células dendríticas indica, que éstas participan de alguna forma en la iniciación de la respuesta inmune, definiendo a través de ella el desarrollo de la respuesta, no sólo como consecuencia del reclutamiento de diferentes tipos celulares, sino a través de la modulación de su función.

### Regulación del movimiento leucocitario a través de las quimiocinas



**Fig. 1.2:** Se muestra la secreción de quimiocinas en el sitio de la inflamación por células tisulares, leucocitos reclutados y células endoteliales activadas. Las quimiocinas son retenidas localmente en la matriz y en los proteoglicanos de la superficie celular, creando un gradiente de concentración alrededor del estímulo inflamatorio y en la superficie del endotelio. El rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio es mediado por las selectinas y las quimiocinas retenidas en la superficie celular. Las señales de las quimiocinas activan las integrinas de los leucocitos favoreciendo una adhesión firme a la superficie y la extravasación celular. El receptor de quimiocinas Antígeno Duffy (DARC), receptor que no señala en eritrocitos, actúa reteniendo las quimiocinas y modulando el gradiente de éstas en la circulación (Luster, 1998).

Tan trascendente como la producción de diferentes quimiocinas, la expresión de receptores específicos define la extravasación y la migración desde el tejido inflamado hasta los ganglios, al igual que el movimiento de estas células dentro de los mismos. Así se ha observado, que la expresión de cada uno de los receptores condiciona o favorece el desarrollo de ciertas actividades celulares, al igual que su expresión diferencial es capaz de definir de forma específica subtipos celulares funcionalmente distintos. Por ejemplo, la expresión de CXCR1, CCR1, CCR2 y CCR5, en las células dendríticas inmaduras, favorece la extravasación de estas células y la migración hacia el tejido inflamado (Godiska *et al.*, 1997; Sozzani *et al.*, 1995; Sallusto *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1998), mientras que la expresión de CCR6 favorece el movimiento de las células inmaduras hacia las amígdalas. La migración de estas células a través de gradientes de quimiocinas les permite aumentar las probabilidades de entrar en contacto con el antígeno (Foster *et al.*, 1999). Una vez que estas células maduran, se produce una reprogramación celular que las afecta tanto a nivel funcional (disminuye la actividad endocítica (Sallusto *et al.*, 1995), y aumentan los procesos de adhesión la regulación del MHC y moléculas coestimuladoras (Cella *et al.*, 1997; Cella *et al.*, 1999)), como a nivel de expresión de los receptores para las quimiocinas (Sallusto *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1998; Dieu *et al.*, 1998). Las células dendríticas maduras ya no son capaces de responder frente a quimiocinas inflamatorias (por la pérdida de los receptores correspondientes en la superficie celular), pero sí que lo hacen frente a quimiocinas linfocitarias debido a la expresión de receptores como CXCR4, CCR4 y CCR7. La expresión de estos receptores permite el movimiento de las células dendríticas a través de los ganglios linfáticos (Gunn *et al.*, 1999), definiendo por tanto su localización específica en función de gradientes de CXCL12 ó SDF-1 (*Stromal cell Derived Factor-1*), CCL17 ó TARC, CCL19 ó ELC (*Epstein-Barr-virus-induced receptor Ligand Chemokine*) y CCL21 ó SLC (*Secondary Lymphoid tissue Chemokine*). De este modo, se favorece la interacción específica y la presentación del antígeno a los linfocitos B y linfocitos T, posibilitándose su activación eficiente. En cuanto a CCR7, se ha descrito una expresión bastante

aumentada en las células dendríticas, además de que presenta cierta resistencia frente a la *down* regulación inducida por el ligando, situación que no se produce con otros receptores (Sallusto *et al.*, 1999) probablemente debido a la importancia que tiene este receptor para precisar la localización anatómica de la célula dendrítica dentro de los órganos linfoides.

También se ha descrito la participación de MIP-1 $\alpha$  y de MIP-1 $\beta$  en el tráfico de linfocitos T dentro de los nódulos linfoides, regulando la emigración de estas células hacia la circulación durante la respuesta inmune (Tedla *et al.*, 1998).

Por lo que se refiere al desarrollo de los linfocitos T y B, el papel de las quimiocinas también ha sido ampliamente analizado. En el desarrollo de linfocitos B, se ha descrito que SDF-1 ejerce efectos coestimuladores en los precursores de estas células, favoreciendo la linfopoyesis (Nagasawa *et al.*, 1996). Además se ha demostrado, que la delección del receptor CXCR4 en ratones provoca la liberación de células pre-B a la circulación (Ma *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha descrito la expresión de XCL1/Linfotactina, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  (Kelner and Zlotnik, 1995), CCL17/TARC (Imai *et al.*, 1996), CCL21/SLC (Campbell *et al.*, 1999) y CCL25/TECK (Vicari *et al.*, 1997) durante el desarrollo tímico con papeles diversos. Cabe destacar aquí que CCL25 es especialmente importante para el reclutamiento de los timocitos inmaduros. CCL25 es producida por células dendríticas del timo, sugiriendo que esta quimiocina pueda ejercer algún efecto en el desarrollo temprano del timo (Campbell *et al.*, 1999). Esta respuesta diferencial de los timocitos frente a las quimiocinas se explica porque éstos expresan diferentes receptores durante las distintas etapas de su evolución.

Finalmente, las quimiocinas también se encuentran implicadas en los fenómenos efectores de la respuesta inmunológica: así, las quimiocinas pueden provocar la degranulación de los neutrófilos (por la activación de IL-8 a través de CXCR1 y CXCR2) (Jones *et al.*, 1997), mostrar efectos angiogénicos (Keane *et al.*, 1998 and Tachibana *et al.*, 1998), regular la hematopoyesis, tanto de manera supresora (Broxmeyer *et al.* 1995, Youn *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 1997) como de manera estimuladora (Keller *et al.*, 1994; Nagasawa *et al.*, 1996), suprimir la progresión de la infección por el VIH (a través del bloqueo de sus coreceptores (CCR5 y CXCR4) por parte de

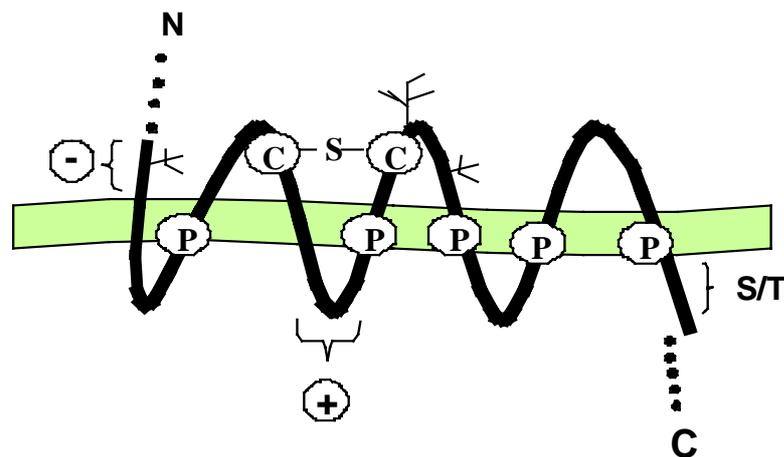
RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (Cocchi *et al.*, 1995, Gong *et al.*, 1998) y de SDF-1 (Amara *et al.*, 1997) respectivamente), colaborar en la citotoxicidad de los linfocitos T citotóxicos (Catálfamo *et al.*, 2002), así como otras actividades.

### 1.1.5. Receptores de quimiocinas

Los efectos biológicos que ejercen las quimiocinas se llevan a cabo a través de sus receptores por medio de las señales que transducen al interior de la célula cuando entran en contacto.

En cuanto a su estructura (Fig. I.3), podemos destacar la presencia de siete dominios transmembrana enriquecidos con aminoácidos hidrofóbicos, muchos de los cuales se conservan en el resto de los miembros de la superfamilia de STR (*Seven Transmembrane Receptor*) (a la cual pertenecen las quimiocinas), entre los que destacan el receptor del péptido N-formil (FPR), el receptor C5a (C5aR), el receptor de activación plaquetario (PAF) (Probst *et al.*, 1992). Además, habría que señalar que los receptores de quimiocina pertenecen al grupo de receptores acoplados a la proteína G.

#### Estructura general de los receptores de quimiocinas



**Fig. I.3.** Características estructurales y modelo de la inserción de los STR a la membrana. El rectángulo corresponde a la membrana plasmática; N, Extremo amino terminal; C, Extremo carboxi terminal; Línea continua, péptido; S, Puentes disulfuros intramoleculares; +, Tercer loop intracelular básico; -, Extremo N-terminal ácido; S/T; Sitios de múltiples residuos de serinas y treoninas para fosforilaciones; Estructuras ramificadas glucocídicas; C o P, sitios de cisteínas o Prolinas conservadas; Líneas discontinuas, dominios que pueden presentar longitudes diferentes para los distintos STRs.

En cuanto a este tipo de receptores, se han descrito dos subgrupos dependiendo de la sensibilidad que éstos presenten frente a la toxina pertusis. De esta manera, tenemos los receptores acoplados a proteína G sensibles a la toxina pertussis (al cual pertenecen los receptores de quimiocinas) y los resistentes a esta toxina.

Los receptores del primer tipo, una vez activados por la unión del ligando, son capaces de catalizar el cambio de GDP a GTP por la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, provocando la disociación de ésta subunidad de la  $\beta\gamma$ . A su vez, la subunidad  $\beta\gamma$  activa la fosfolipasa C (PLC) específica de inositol, favoreciendo la acumulación de inositol trifosfato y de diacilglicerol en el interior del citoplasma. Luego, estos productos serán capaces de inducir la movilización de calcio y la activación de protein kinasa C respectivamente, que serán los responsables de retrasar la activación de la fosfolipasa D (PLD). La activación temprana de la PLC y la activación tardía de la PLD son procesos bioquímicos que se han asociado a una respuesta migratoria altamente sensible de los fagocitos frente a sustancias quimioatrayentes, pero con poca susceptibilidad a respuestas citotóxicas (Snyderman and Uhing., 1992).

Entre las características estructurales más relevantes de los receptores de quimiocinas, destacan las siguientes: el extremo aminoterminal (N-terminal) es siempre extracelular, mientras que el extremo carboxiterminal (C-terminal) se encuentra intracelularmente. Así mismo, se ha descrito la presencia de siete dominios transmembrana con estructura de  $\alpha$ -hélices, orientados de forma perpendicular a la membrana plasmática y con unas inflexiones a nivel de los dominios II, IV, V, VI y VII debidas a unos residuos de prolina. También presentan 3 loops intracelulares y 3 extracelulares y un puente disulfuro que une los residuos de cisteína presentes entre el primero y el segundo loop extracelular (Savarese *et al.*, 1992; Baldwin 1993) (Fig. I.3.).

Además de presentar estas características comunes con el resto de miembros de la superfamilia de STR, presentan algunas características particulares que los diferencian de los otros receptores de esta superfamilia. Entre estas características encontramos que sus secuencias son más pequeñas, ya que presentan aproximadamente 350 aa lo cual se explica porque las secuencias del extremo N-terminal, el tercer loop intracelular, y

el segmento C-terminal son más cortos. Además, más del 20% de su secuencia aminoacídica es idéntica entre ellos y el tercer loop intracelular es más corto (16-22 aa) y está enriquecido con aa básicos (Savarese *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1992). A su vez, el extremo N-terminal es más ácido que el resto de STRs (Probst *et al.*, 1992; Ahuja SK, Murphy PM, 1993).

Hasta la fecha sólo se han identificado 17 receptores de quimiocinas presentes en la superficie de las células (Tabla I.1.) y la mayoría de ellos se encuentran agrupados en el cromosoma 2 y 3. Dentro de estos receptores identificados, diez pertenecen a las CC quimiocinas (CCR1 hasta CCR9), cinco pertenecen a las CXC quimiocinas (CXCR1 hasta el CXCR5), uno es el receptor de Fractalquina (CX<sub>3</sub>CR1) y el último es receptor para la XC quimiocina (XCR1) (Baggiolini *et al.*, 1997; Mantovani *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998; Imai *et al.*, 1997). En cuanto a estos receptores celulares, cabe añadir que también se han descrito cuatro receptores de quimiocinas definidos en herpes virus: ORFs US28 del citomegalovirus humano, ECRF3 del herpesvirus saimiri, UL12 del HHV-6 y el no.74 de HHV-8/KSHV, también conocido como Kaposi's sarcoma herpesvirus (Isegawa *et al.*, 1998). En mamíferos existen también dos proteínas de membrana que unen quimiocinas y que hasta ahora no ha sido demostrado que señalicen al unirse a ellas: el receptor D6 y el DARC (*Duffy antigen receptor for chemokines*) (Horuk *et al.*, 1994; Nibbs *et al.*, 1997).

En cuanto a las interacciones que ocurren entre quimiocinas y receptores, hay un dato importante que valdría la pena recalcar, y es la promiscuidad que existe entre algunos receptores y ligandos. De todos es conocido, que una misma quimiocina es capaz de interactuar de forma específica y gran afinidad con diferentes receptores, como es el caso de RANTES que es ligando de CCR1, CCR3 y CCR5 o de MIP-1 $\alpha$  que es ligando de CCR1 y CCR5. En cambio curiosamente ocurre que algunos receptores son capaces de transducir una señal específica y diferente por cada una de las quimiocinas con las que interaccionan, exhibiendo incluso especificidades distintas para sus ligandos, según el subtipo leucocitario donde se exprese. Por ejemplo, a pesar de que CCR1 y CCR5 sean receptores específicos para RANTES y MIP-1 $\alpha$ , se pueden diferenciar en función de la especificidad que presentan frente a MCP3 y MIP-1 $\beta$  respectivamente. Esta es una característica muy importante dentro de la gran familia de las quimiocinas,

y permite explicar de alguna manera su capacidad de regular específicamente el tráfico de diferentes poblaciones leucocitarias. Sin embargo, también encontramos quimiocinas que son altamente específicas para un solo receptor e incluso para determinados tipos de tejido (Zlotnik and Osamu, 2000), como por ejemplo CCL25 para CCR9.

Como se mencionó anteriormente, la activación del receptor es indispensable para que la quimiocina sea capaz de ejercer su función. De hecho, esta activación se da a diferentes niveles. Por un lado, la interacción de alta afinidad ocurre como consecuencia de la interacción entre el extremo N-terminal de la quimiocina (antes del primer plegamiento) y el extremo N-terminal del receptor (Samson *et al.*, 1997). Una vez que han interactuado ambos extremos, se produce un segundo nivel de interacción en el que el receptor es estimulado por aminoácidos presentes en el pliegue de la hoja  $\beta$  de la quimiocina (Clark-Lewis *et al.*, 1994). Sin embargo, los residuos aminoacídicos que están implicados en la estimulación del receptor no son los mismos para todas las quimiocinas. Por ejemplo, se observa que los residuos del receptor CCR5, indispensables para la activación por RANTES, no son los mismos que usa MIP-1 $\beta$  para estimularlo (Samson *et al.*, 1997). Los sitios que pudieran estar determinando la especificidad del receptor están localizados en el primero y el segundo dominio extracelular, mientras que los sitios que determinan la activación se encuentran ubicados en el tercer y cuarto dominio (Samson *et al.*, 1997). Ello implica que el sitio donde se establece la unión de alta afinidad entre el receptor y la quimiocina (extremo N-terminal) es distinto al sitio en el que se produce la activación del receptor (asas extracelulares).

## **1.2. La familia de las CC Quimiocinas**

Las CC quimiocinas, como se ha comentado anteriormente, se caracterizan estructuralmente por no presentar aminoácidos entre los dos residuos de cisteína que se encuentran en el extremo N-terminal. Además de esto, se caracterizan por actuar principalmente sobre células mononucleares más que sobre neutrófilos, tanto en procesos inflamatorios como en procesos hemostáticos.

Dentro de este grupo, se han clasificado algunas de las quimiocinas en función de las diferentes actividades que realizan, determinadas a su vez, por las especificidades con las que éstas actúan sobre sus células dianas. De esta manera se encuentra el grupo de las quimiocinas que intervienen en el control de los procesos alérgicos a través de una potente actividad quimioatrayente sobre los eosinófilos y por su capacidad de inducir liberación de histamina tras la estimulación celular (Berkhout *et al.*, 1997). Entre esta quimiocinas se encuentran MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP4 (Monocyte Chemoattractant Protein) y Eotaxina. Además de su efecto sobre eosinófilos, también se ha descrito la capacidad quimioatrayente sobre basófilos (en los que una vez activados se induce la degranulación y la citada liberación de histamina) y sobre mastocitos (Luster and Rothenberg, 1997), que a su vez intervienen en los procesos alérgicos. Sin embargo, además de esta actividad principal, es bien conocida su capacidad de atraer monocitos y linfocitos T, participando en los procesos proinflamatorios (Kurihara *et al.*, 1997).

Por otro lado se ha descrito un grupo de quimiocinas homólogas que ejercen principalmente actividades proinflamatorias. Dentro de este grupo se encuentran RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y PARC; sin embargo, esta agrupación es quizás lgo simplista puesto que, como se ha dicho, también se ha descrito actividad proinflamatoria en MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, Eotaxina e I-309.

Además de esto, en términos generales, las CC quimiocinas se han visto implicadas en el desarrollo de la hemostasia, en los procesos inmunológicos, en la hematopoyesis y ejerciendo actividades anti-virales (especialmente frente al VIH-1), procesos que se han descrito previamente al referirse a algunas de ellas.

En cuanto a RANTES, se ha descrito su propiedad quimioatrayente sobre linfocitos T memoria CD45RO+ de forma preferente, a pesar de que se ha demostrado que también atrae a eosinófilos y basófilos induciendo la liberación de histamina, aunque este efecto no puede considerarse como una actividad principal (Luster and Rothenberg, 1997). En cuanto a MIP-1 $\alpha$ , se ha visto que ejerce un efecto quimiotáctico más potente sobre monocitos que MIP-1 $\beta$ , tal vez por la capacidad que tiene MIP-1 $\alpha$  de interactuar con CCR1, CCR3 y CCR5, a diferencia de MIP-1 $\beta$  que sólo actúa con CCR5 (Cook

*et al.*, 1995). En cuanto a su capacidad quimioatrayente de linfocitos, MIP-1 $\alpha$  se ha descrito como quimiocina principal de linfocitos T CD8+, mientras que MIP-1 $\beta$  actúa de manera preferente sobre los T CD4+.

### **1.3. Quimiocina MIP-1 $\beta$**

La quimiocina MIP-1 $\beta$  (*Macrophage Inflammatory Protein*), elemento central a estudiar en esta tesis, pertenece a la familia de las CC quimiocinas ya que no presenta aminoácido alguno entre los dos primeros residuos de cisteína.

En cuanto a las características estructurales de MIP-1 $\beta$ , valdría la pena recalcar que presenta gran similitud con MIP-1 $\alpha$ , con quien comparte aproximadamente un 55% de homología en su secuencia proteica (Altschul *et al.*, 1997); sin embargo, ambas quimiocinas actúan de manera independiente en diferentes procesos que determinan la respuesta inmunológica.

MIP-1 $\beta$  es una quimiocina inducible que interviene de forma específica en los procesos inflamatorios, tras la estimulación tanto por agentes patógenos como por estímulos endógenos, que provocan su expresión en determinados grupos celulares. Así mismo, es capaz de regular el tráfico celular y activar distintos grupos celulares, tales como linfocitos, macrófagos, células dendríticas y células NK.

Los efectos biológicos que realiza MIP-1 $\beta$  sobre sus células diana se desencadenan a través de sus receptores específicos. Hasta el momento, se ha descrito la utilización de tres receptores por parte de MIP-1 $\beta$ : el CCR5, el CCR8 y el CCR9, apareciendo siempre el CCR5 como el más importante. El hecho de que MIP-1 $\beta$  utilice el CCR5 como receptor, le otorga propiedades antivirales, al igual que MIP-1 $\alpha$  y RANTES, ya que éste es uno de los correceptores utilizado por el VIH-1 para entrar en sus células diana.

Antes de continuar, valdría la pena agregar que si bien en este apartado comentaremos características importantes de MIP-1 $\beta$ , también señalaremos las semejanzas o diferencias, según sea el caso, entre MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  para poder entender de una forma más amplia el trabajo que hemos desarrollado.

### 1.3.1. Identificación de MIP-1 $\beta$

Como muchas otras quimiocinas que conocemos, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , fueron identificadas a partir de múltiples clonaciones y otras metodologías aplicadas, como la búsqueda en diferentes librerías de cDNA (Shall *et al.*, 1991; Miller and Krangel, 1992). El primer cDNA clonado se corresponde a MIP-1 $\alpha$ , identificado a partir de una estrategia diseñada para identificar genes inducidos en linfocitos de amígdalas humanas, luego de tratarlos con PMA (Obaru *et al.*, 1986). El cDNA identificado se correspondía con una proteína de 92 aminoácidos que presentaba cuatro residuos de cisteína, y fue llamado LD78. Posteriormente se identificaron los cDNAs de dos clones que se regulaban de manera positiva tras la estimulación de linfocitos y que compartían cierta homología con LD78 (pAT464 y GOS-19) (Zipfel *et al.*, 1989; Blum *et al.*, 1990). Aunque se pensaba que estos clones codificaban para proteínas secretoras, la función de cada una de ellas no estaba del todo clara.

Siguieron los estudios de clonaje, con el fin de identificar otros genes similares, hasta que se aislaron dos moléculas de bajo peso molecular, producidas por macrófagos de ratón tras la estimulación con LPS y que característicamente se unían a la heparina. Además, se observó que estas proteínas "inducían" una respuesta inflamatoria cuando se inyectaron *in vivo*, y desarrollaban actividades quimioatrayentes para leucocitos *in vitro* (Wolpe *et al.*, 1988). Es así como nacen los términos MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  a quienes se les otorga esta denominación para resaltar el carácter inflamatorio observado en macrófagos activados (Proteína Inflamatoria de Macrófagos; del inglés *Macrophage Inflammatory Protein*).

Estudios posteriores consiguieron secuenciar parcialmente ambas proteínas (Sherry *et al.*, 1988), revelando que los extremos N-terminal de ambas compartían cierta homología. Luego otros estudios de clonaje revelaron que ambos cDNAs murinos (MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ) correspondían a un péptido de 92 aminoácidos (Davatelis *et al.*, 1988; Sherry *et al.*, 1988) y que este péptido era digerido (después de un residuo de serina) para generar la proteína madura de 69 aminoácidos. La secuencia aminoacídica de la MIP-1 $\alpha$  murina mostró el 75% de homología con LD78, sugiriendo que ambas moléculas eran semejantes (Wolpe and Cerami, 1989).

Estudios posteriores a la identificación de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , permitieron identificar otras proteínas homólogas y estructuralmente relacionadas (20 – 75% de homología), a través de la comparación de las secuencias de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (Wolpe and Cerami, 1989).

Años más tarde varios grupos independientes, reportaron el aislamiento de clones (cDNA) humanos designados como ACT-2, hH400, HC21, pAT744, LAG-1 y MAD-5, que codificaban productos ligeramente diferentes, pero cuya secuencia de aminoácidos era bastante parecida a la de MIP-1 $\beta$  (>75 % de homología), sugiriendo que éstos representaban genes homólogos (Miller *et al.*, 1992). La designación de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  fue asumida para designar estos péptidos, tanto de origen murino como de origen humano.

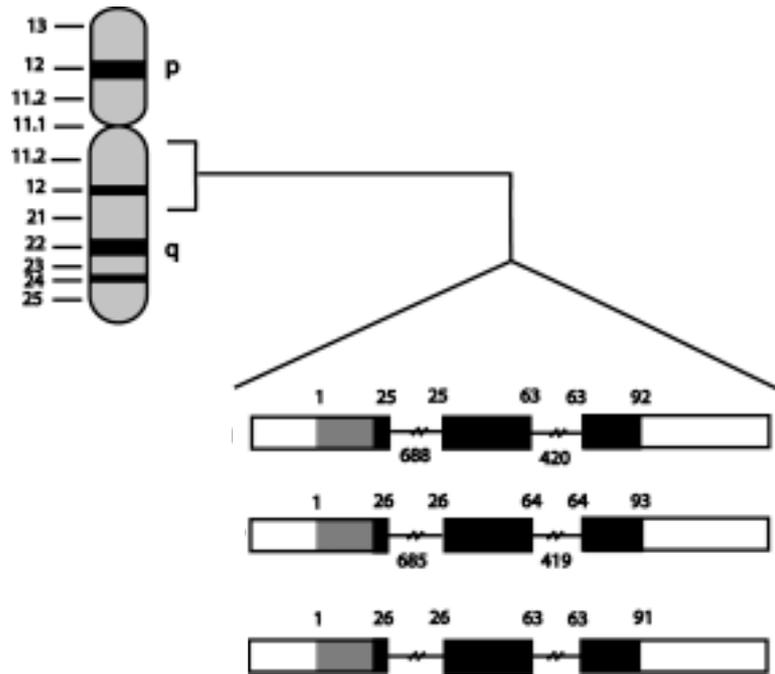
Diferentes grupos han reportado la existencia de múltiples genes no alélicos tanto para MIP-1 $\alpha$  como para MIP-1 $\beta$  en humanos (a diferencia del ratón que sólo presenta una copia para cada uno), con diferentes isoformas que varían entre los individuos (Irving *et al.*, 1990; Nakao *et al.*, 1990). Una de las isoformas descritas es MIP-1 $\alpha$ P (originalmente identificada como pAT464.2 ó LD78 $\alpha$ ), que representa una copia no alélica del gen de MIP-1 $\alpha$  y que se codifica y se expresa como una proteína altamente relacionada a MIP-1 $\alpha$ , ya que sólo varía en 5 de los 92 aminoácidos (Nibbs *et al.*, 1999). La existencia de estas isoformas, pudieran explicar las diferencias encontradas en las secuencias aminoacídicas, de los cDNAs codificados por los clones que se habían identificado previamente. Por otro lado, esta elevada homología entre las secuencias aminoacídicas, se pudiera atribuir a la estrecha relación que guardan los genes que codifican estas proteínas en el genoma humano (Irving *et al.*, 1990). Si tomamos en cuenta ambos aspectos (homología y la cercanía a nivel cromosómico), podríamos pensar que estos genes derivan de múltiples duplicaciones genéticas de un gen ancestral y común.

### **1.3.2. Localización cromosómica**

Según la nomenclatura actual, el gen que codifica para MIP-1 $\beta$  es el SCYa4 y el que codifica para MIP-1 $\alpha$  es el SCYa3. Ambos genes se

encuentran localizados en el cromosoma 17, pero en diferentes loci. MIP-1 $\alpha$  se ha localizado en la región q11-21; mientras que MIP-1 $\beta$  ha sido definido en la región q11-23 (Irving *et al.*, 1990) (Fig. I.4).

### Representación de la localización cromosómica de MIP- $\alpha$ y MIP-1 $\beta$



**Fig. I.4:** Comparación de la organización genómica de MIP- $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (adaptada por Schall, 1991). El diagrama de los Exones/Intrones representan los genes de MIP- $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , mapeados en el cromosoma 17q11.2-q21. Los exones están representados por los rectángulos. Los números ubicados encima señalan la posición de los aa codificados por aquellas bases. Los blancos indican las regiones no traducidas, los grises indican la secuencia del péptido señal y los negros indican los nucleótidos que codifican para la proteína madura. Los intrones están representados por líneas y los números ubicados debajo de estas, representan la cantidad de nucleótidos en cada uno de ellos.

Además de encontrarse en el mismo cromosoma, ambos genes están separados únicamente por 14 Kb (Irving *et al.*, 1990), lo cual implica que la distancia relativa que los separa es inversamente proporcional al grado de homología entre sus secuencias. Por otro lado, si bien es cierto que no se ha establecido un vínculo claro entre defectos en estas quimiocinas y alguna enfermedad, se ha descrito que la región del cromosoma 17 q11-q23 (que

corresponde a la región que codifica para ambas quimiocinas), está implicada en la neurofibromatosis de von Recklinghausen (NF1) y en el desarrollo de la leucemia promielocítica aguda (LMA-M3) (Irving *et al.*, 1990).

Cabe reseñar que otros genes que codifican para otras CC quimiocinas como RANTES, I-309 y MCP-1 también se encuentran ubicados en la misma región del cromosoma 17 (Miller and Krangel, 1992) (Tabla I.1), sugiriendo aún más la hipótesis de la duplicación a partir de un gen ancestral común para explicar su aparición evolutiva.

### **1.3.3. Estructura proteica de MIP-1 $\beta$**

MIP-1 $\beta$  es miembro de la familia de las CC quimiocinas, al igual que MIP-1 $\alpha$ , como mencionamos anteriormente, lo que significa que presenta cuatro residuos de cisteína altamente conservados en su secuencia, de los cuales los dos primeros se encuentran de forma contigua (Ward and Westwick, 1998). Estas cisteínas están unidas por dos puentes disulfuro que en el caso de MIP-1 $\beta$ , son dos puentes intramoleculares que unen Cys 11 - Cys 35 y Cys 12 - Cys 51 (Lodi *et al.*, 1994).

MIP-1 $\beta$  es una proteína que se sintetiza en forma de precursor, representado por 92 aminoácidos, y que luego de sufrir la liberación del péptido líder, da lugar a la proteína madura de 69 aminoácidos, un aminoácido menos que MIP-1 $\alpha$  (la proteína madura presenta 70 aminoácidos).

El elevado nivel de homología que presentan las secuencias aminoacídicas de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  constituye una de las semejanzas más relevantes entre estas dos proteínas. En cuanto a MIP-1 $\beta$ , su secuencia proteica presenta el nivel más elevado de homología con MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ P, RANTES, MIP-4, HCC-1 y MPIF1, con quienes comparte un 58%, 55%, 51%, 43%, 43% y < 40% respectivamente (Altschul *et al.*, 1997). Estas similitudes se corresponden con la estrecha relación que guardan dentro del mismo *cluster* y se refleja en el desarrollo de actividades biológicas similares, al igual que el compartimiento de algunos receptores (O'Garra *et al.*, 1998). Sin embargo, a nivel global y como ya se ha comentado de forma repetida, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  son las quimiocinas que guardan el nivel

de homología más elevado, ya que son quimiocinas inducibles que sólo se expresan en presencia de algún estímulo, además de ser reguladas de manera positiva por citocinas de tipo Th1. MIP-4, a pesar de que también es una quimiocina inducible, es regulada por citocinas de tipo Th2 (Kodelja *et al.*, 1998), y la principal diferencia que se ha encontrado con HCC-2, RANTES y MIP1, es que éstas se expresan de manera constitutiva en algunos tejidos (Kim and Broxmeyer, 1999).

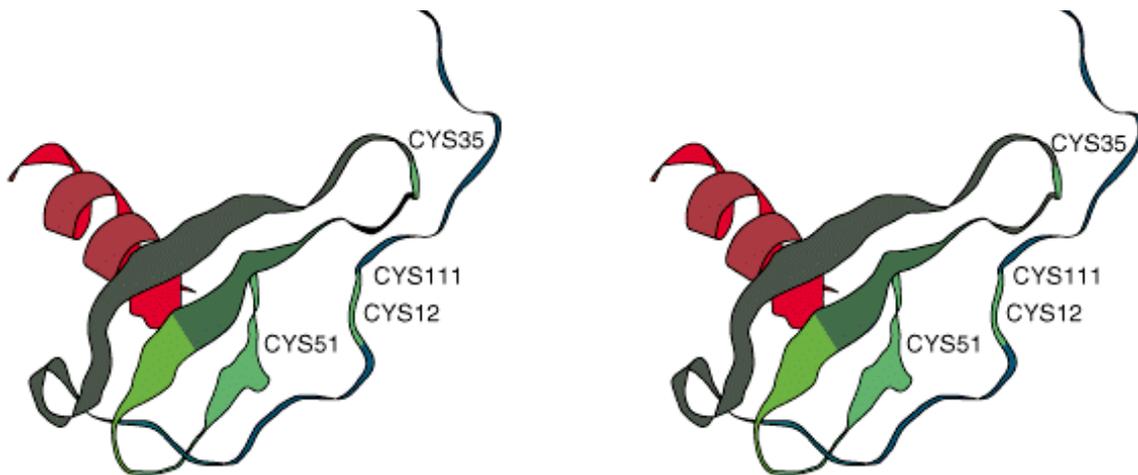
En cuanto a la estructura proteica, se ha descrito la estructura tridimensional de MIP-1 $\beta$  (Lodi *et al.*, 1994), a partir de la cual se definen las siguientes estructuras secundarias (equivalentes a las de la mayoría de las quimiocinas): tres hojas  $\beta$  antiparalelas, un extremo NH<sub>2</sub>-terminal flexible y una hélice  $\alpha$  en el extremo COOH-terminal. Se ha encontrado que esta estructura secundaria presenta cierta homología con otras quimiocinas de diferentes familias (Clare and Gronenborn *et al.*, 1995), sin embargo, al comparar la estructura de MIP-1 $\beta$  con RANTES (otra CC quimiocina), se observa que las regiones N-terminal de ambas presentan un alto grado de variabilidad cuando están en solución (Skelton *et al.*, 1995). Esta variabilidad se debe a la longitud de las llamadas regiones "desordenadas". La región desordenada es característica de la quimiocina y le otorga cierta flexibilidad a la estructura, permitiéndole adoptar diferentes conformaciones cuando están en solución. También representa un lugar importante desde el punto de vista biológico, ya que permite la reordenación específica de la molécula al contactar con su ligando (Clark-lewis *et al.*, 1995; Wells *et al.*, 1996) (Fig. I.5.).

Para MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , se han descrito dos lugares que pueden jugar un papel importante en su unión con el receptor: por un lado se define la región flexible del extremo N-terminal como elemento central para esta interacción y por otro, la región del asa después de los puentes disulfuros (Clark-Lewis *et al.*, 1995) que define el grado de activación (y es característica para  $\alpha$  y  $\beta$ ).

Las caracterizaciones físicoquímicas que se han realizado a partir de múltiples estudios han revelado que tanto MIP-1 $\alpha$  como MIP-1 $\beta$ , se presentan como dímeros y tetrámeros en solución (Patel *et al.*, 1993; Covell *et al.*, 1994), situación definida en prácticamente todas las quimiocinas. Sin embargo, se ha observado que existen ciertas características de las CC

quimiocinas que las diferencian de las CXC, en cuanto al estado de sus dímeros: mientras las primeras (que incluyen a MIP-1 $\beta$ ) presentan una forma cilíndrica, las segundas presentan una forma globular (Clore and Gronenborn, 1995; Czaplewski *et al.*, 1999).

### Representación esquemática de la estructura tridimensional de MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$



**Fig. 1.5:** Representación esquemática de la estructura tridimensional de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  donde se muestran los residuos de cisteína, el extremo N-terminal y el C-terminal (Peitsch, 1996; Guex and Peitsch, 1997).

El estado en que se puedan encontrar estas quimiocinas, adquiere especial importancia, al evidenciar que tanto MIP-1 $\alpha$  como MIP-1 $\beta$ , son capaces de unirse a su receptor en forma de monómeros o de dímeros (Laurence *et al.*, 1998) con funcionalidad diversa. Aunque los estudios en algunos casos han mostrado resultados contradictorios, la posibilidad de cambiar la función de las quimiocinas en relación a su estado de agregación, incrementa su potencialidad funcional. Así cabe considerar que la dimerización y la agregación, son fenómenos dinámicos y reversibles que se han observado en MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , donde se forman agregados de alto peso molecular, bajo ciertas condiciones, como pueden ser diferentes concentraciones iónicas (Graham *et al.*, 1994). También se ha visto que la longitud del extremo N-terminal pudiera facilitar en algunos casos la oligomerización. Esto se ha estudiado en MIP-1 $\beta$  a través de deleciones de

aminoácidos en este extremo, observando que a medida que se aumenta el número de aminoácidos delecionados, se pierde la capacidad de formar dímeros (*Laurence et al., 1998*). Si a ello añadimos que la capacidad o incapacidad de formar agregados en un momento determinado no repercute en la unión simple al receptor, pero sí en la señalización y en consecuencia en las actividades biológicas que desarrollan (*Czaplewski et al., 1999*), podemos presumir diferencias funcionales de las mismas quimiocinas en entornos con distintas características físico-químicas.

Para el reclutamiento de diferentes subtipos celulares, MIP-1 $\beta$  es capaz de inducir la adhesión de estas células al endotelio y la migración de las mismas hacia los tejidos inflamados. Se ha observado que tanto MIP-1 $\alpha$  como MIP-1 $\beta$  se acumulan en la superficie del endotelio a través de las interacciones de alta afinidad que se establecen con el heparán sulfato de los proteoglicanos (*Wolpe et al., 1988*). Esta unión con los proteoglicanos, presentes en la matriz extracelular y en la superficie de las células endoteliales, provocará el mantenimiento y el aumento de la concentración local de estas quimiocinas (*Tanaka et al., 1993; Wagner et al., 1998*), favoreciendo la atracción de los diferentes grupos celulares. MIP-1 $\beta$  se unirá a las células diana a través de sus receptores específicos, induciendo la movilización intracelular de calcio, la fosforilación de tirosinas, la activación de las MAPK (proteína kinasa mitógena activada) (*Dairaghi et al., 1998; Kim and Broxmeyer et al., 1999*) y finalmente, la reorganización del citoesqueleto, elemento molecular central que permite la migración celular (*Tanaka et al., 1998*). Adicionalmente, a través de estudios de mutagénesis dirigida se ha demostrado que los aminoácidos que están implicados en la unión con los glicosaminoglicanos, no son los mismos que los que intervienen en la unión con el receptor ni en la señalización a través de éste (*Koopman and Krangel, 1997*). En este sentido, la tercera asa es la responsable principal de la unión a estos proteoglicanos en un lugar "lejano" al lugar de unión al receptor.

#### **1.3.4. Regulación genética**

Un análisis a nivel genómico, sobre la zona reguladora 5' de esta quimiocina, reveló la presencia de tres copias de la secuencia 5'-GAGGAA-3'

que se corresponden con los sitios de unión para el factor nuclear PU.1 (Klemsz *et al.*, 1990), un factor expresado casi exclusivamente en las células de la línea monocito/macrófago y en linfocitos B, pero no así en los linfocitos T (Ziegler *et al.*, 1991). Esto pudiera sugerir, la implicación de este factor en la expresión del MIP-1 $\beta$  en los monocitos y linfocitos B activados, a diferencia de los linfocitos T donde no ejercería ningún tipo de actividad.

Trabajos anteriores demuestran que los glucocorticoides pueden regular la expresión de MIP-1 $\beta$  de manera positiva o negativa (Beato M, 1989; Yamamoto K R, 1985; Lew *et al.*, 1988). Por lo tanto, el hecho de haber encontrado tres secuencias consenso GRE (*Glucocorticoid Response Elements*) (Karin *et al.*, 1984) (5'-TGTTCT-3') pudiera sugerir que los corticoides serían capaces de regular la expresión del gen; sin embargo, estudios *in vitro* con monocitos demuestran que el tratamiento con dexametasona no induce en ningún momento la expresión de MIP-1 $\beta$ , aunque inhibe parcialmente la expresión del gen inducido por LPS (Ziegler *et al.*, 1991).

En esta zona 5' reguladora, también se encontró un elemento que le confiere la capacidad de inducción al LPS (-455 pb) (Ziegler *et al.*, 1991). Además, existe una secuencia (5'-GAAATTCCAC-3') que inicia en la posición -84 y que está muy relacionada con la secuencia consenso para un motivo conocido como *caja linfoquina* (Ziegler *et al.*, 1991). Esta caja se encuentra en el gen de MIP-1 $\beta$  y en el de I-309 (Makao *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1990).

Sorpresivamente, no se han encontrado sitios de unión para las secuencias consensos AP-1 y NF $\kappa$ B en la zona 5' reguladora (Ziegler *et al.*, 1991), aunque éstos también están ausentes en el gen LD78 que codifica para MIP-1 $\alpha$  (Makao *et al.*, 1990).

Se ha visto que MIP-1 $\beta$  se expresa poco en los linfocitos T al inducirlos con PMA; sin embargo, la combinación de PMA y PHA o Ionomicina, se ha visto que potencia de manera significativa la expresión de este gen (Ziegler *et al.*, 1991). Esto pudiera deberse a la intervención de un factor de transcripción que requiere de la activación de la proteína quinasa C y que pudiera estar involucrado en la regulación del gen (Ziegler *et al.*,

1991). Existen múltiples candidatos a esta función pero no se ha concretado ninguno de manera precisa.

### **1.3.5. Interacción de MIP-1 $\beta$ con sus receptores**

En cuanto a los receptores descritos hasta el momento para MIP-1 $\beta$ , el CCR5 es el que se conoce con mayor precisión y el que se considera como principal responsable de las actividades biológicas desencadenadas por esta quimiocina; sin embargo, se ha descrito que CCR8 puede interaccionar también con MIP-1 $\beta$  (Bernardini *et al.*, 1998).

Estudios realizados sobre la interacción de MIP-1 $\beta$  con CCR5, demuestran que la quimiocina se une al tercer loop extracelular del receptor (Maghazachi *et al.*, 1999). Análisis mutacionales, también revelan que los tres aminoácidos cargados en el extremo C-terminal (aminoácido 61, 65 y 67) no se requieren para la unión al receptor (Crisman *et al.*, 1999). Así mismo se ha visto que la unión de MIP-1 $\beta$  al CCR5 provoca la activación de RAFTK (*Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase*), que a su vez provoca la activación de proteínas del citoesqueleto y éstas a activadores transcripcionales como JNK, SAPK y p38 MAPK (Ganju *et al.*, 1998).

Por otro lado, se ha observado que MIP-1 $\beta$ , a diferencia de otras CC y CXC quimiocinas, no es ligando específico de DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*) (Horuk *et al.*, 1993). Este receptor es conocido desde los años 50 como determinante del grupo sanguíneo Duffy, expresado en los eritrocitos y en las células endoteliales. Además, aunque DARC no induce flujo de calcio celular ni es capaz de transducir ningún tipo de señal en el glóbulo rojo o en las células endoteliales, es capaz de unirse a ciertas quimiocinas y retiene a aquellas que están en circulación, favoreciendo su concentración en determinados lugares donde se requiere aumentar el gradiente de concentración.

En cuanto a CCR8, se ha descrito como un receptor perteneciente a la superfamilia de quimiocinas que presenta siete dominios transmembrana y que está acoplado a la proteína G. Se ha demostrado su expresión en tejidos linfoides, abundantemente expresado en el timo, escasamente en el bazo, nódulos linfoides, linfocitos T CD4+, CD8+, monocitos y muy pobremente en linfocitos B CD19+ y en PMNs (Napolitano *et al.*, 1996;

Samson *et al.*, 1996; Zaballos *et al.*, 1996; Roos *et al.*, 1997). Además, CCR8 es capaz de inducir efectos quimiotácticos, adhesión, diferenciación y proliferación celular. También se ha descrito como uno de los correceptores y como factor de la fusión del VIH-1, VIH-2 y SIV en líneas celulares que sobreexpresan este receptor (Rucker, *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1998). En cuanto a sus otros ligandos, hasta el momento, sólo se ha "reconocido" I-309 como el ligando efectivo para este receptor (Tiffany *et al.*, 1997), a pesar de que otros estudios han reportado que tanto MIP-1 $\beta$  como TARC, pueden interactuar con él y activarlo. Estudios con células Jurkat han demostrado que MIP-1 $\beta$ , al igual que TARC, es capaz de inducir efectos quimiotácticos sobre este tipo celular (Bernardini *et al.*, 1998); sin embargo, otros datos no han podido demostrar la unión de estos ligandos a CCR8, ni la movilización de calcio intracelular inducida por estas quimiocinas (Tiffany *et al.*, 1997; Roos *et al.*, 1997), con lo cual, hasta ahora las interacciones entre MIP-1 $\beta$  y CCR8 permanecen sin ser esclarecidas y están en discusión (Tiffany *et al.*, 1997).

#### **1.3.6. Participación de MIP-1 $\beta$ en el tráfico, reclutamiento celular y respuesta inmune.**

Como el resto de las quimiocinas, MIP-1 $\beta$  también participa en el reclutamiento selectivo de diferentes grupos celulares y la extravasación de estas células de la sangre hacia los tejidos en los que se está produciendo la infección. Este proceso general, como hemos comentado anteriormente, envuelve varios pasos en los que intervienen diferentes elementos que interaccionan de manera coordinada entre los leucocitos y las células endoteliales (Butcher *et al.*, 1991; Springer *et al.*, 1994), donde se han visto implicadas las selectinas (facilitando el movimiento de los leucocitos a través de la superficie endotelial), las quimiocinas (emitiendo señales atrayentes) y las integrinas (estableciendo uniones de alta afinidad con los leucocitos), que en conjunto favorecen la migración de las células hacia los tejidos inflamados.

En el momento en que se inicia un proceso infeccioso en el organismo, el primer grupo de células que llegan al sitio de la infección son los neutrófilos, quienes desarrollan una respuesta rápida pero no específica,

por medio de la fagocitosis. Sin embargo, esta respuesta inicial se ve posteriormente aumentada, tanto en magnitud como en especificidad por los monocitos y los diferentes subtipos de linfocitos, tanto T como B. Los primeros estudios demostraron que tanto MIP-1 $\alpha$  como MIP-1 $\beta$  son potentes quimioatrayentes para monocitos *in vitro*, aunque hoy en día se conoce el efecto quimioatrayente que ejercen sobre linfocitos (Rollins, 1997; Ward and Westwick, 1998), timocitos y células dendríticas (Schall *et al.*, 1994; Sozzani *et al.*, 1997).

La participación de MIP-1 $\beta$  en la iniciación de la respuesta inmune, se ve reforzada por el efecto quimiotáctico que ejerce esta quimiocina sobre las células dendríticas, protagonistas importantes en la iniciación del proceso (Dieu-Nosjean *et al.*, 1999). Hay estudios que demuestran que MIP-1 $\beta$ , al igual que MIP-1 $\alpha$  y RANTES, es capaz de aumentar de dos a tres veces, la cantidad de células dendríticas que migran a través de las células endoteliales (Sozzani *et al.*, 1995; Sozzani *et al.*, 1997). Este hecho se debe a que las células dendríticas inmaduras expresan CCR5, principal receptor de MIP-1 $\beta$ , al igual que CCR1, CCR2 y CCR6, a través de los cuales se media su reclutamiento hasta la zona afectada (Sozzani *et al.*, 1995; Dieu *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 1998).

Además de las células dendríticas y los monocitos, también se ha visto que tanto MIP-1 $\alpha$  como MIP-1 $\beta$  son capaces de ejercer actividades quimioatrayentes sobre linfocitos, aunque de maneras diferentes. A diferencia de las células T vírgenes, los linfocitos T, una vez que han sido activados por el antígeno, son capaces de desarrollar diferentes tipos de respuesta en función de la secreción diferencial de las citocinas (Mosmann *et al.*, 1989; Paul and Seder, 1994). De esta manera, los linfocitos T CD4+ de tipo Th1, a través de la producción de IFN- $\gamma$ , son capaces de activar a los fagocitos mononucleares y responder frente a la invasión de microorganismos intracelulares, mientras que los linfocitos T CD4+ de tipo Th2 son capaces de activar a eosinófilos y basófilos, al producir IL-4 e IL-5 y responder frente a los procesos alérgicos o invasión por microorganismos extracelulares. Esta acción diferencial pudiera ser la causa de la expresión específica de los receptores de quimiocinas en cada uno de estos subgrupos, hecho que condicionaría comportamientos distintos al igual que la migración selectiva a los diferentes tejidos. Así, en cuanto a los linfocitos

Th2, se ha demostrado la expresión del receptor CCR3 de forma selectiva en este subtipo celular (Sallusto *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 1997), originalmente descrito en eosinófilos y en basófilos (Ugucioni *et al.*, 1997; Ponath *et al.*, 1996) y que es capaz de ser activado por Eotaxina, RANTES, MCP-2, MCP-3 y MCP-4. También una pequeña porción de las células T CD45RO+ de sangre periférica, que expresan este receptor, desarrollan las propiedades típicas de las células de tipo Th2 *in vitro* (producción de altos niveles de IL-4 e IL-5). Estos datos sugieren que CCR3 identifica las células que producen IL-4, característica típica de las células Th2, aunque no se haya demostrado aún que sea éste el receptor que determine la migración específica de éstas células (Sallusto *et al.*, 1998).

Además de CCR3, también se ha demostrado la expresión de CCR4 (Sallusto *et al.*, 1998; Bonecchi *et al.*, 1998), de TARC (Power *et al.*, 1995) y CCR8 (D'Ambrosio *et al.*, 1998) aunque sin ejercer ningún tipo de efecto exclusivo y característico sobre este subtipo celular.

En cuanto a las células de tipo Th1, la expresión de CCR5 es su principal característica en relación a los receptores de quimiocinas. Así pues, por su acción, RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  deben ser sus principales quimioatrayentes. Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado la expresión de este receptor sobre las células Th1 y no así sobre las Th2 (Bonecchi *et al.*, 1998; Loetscher *et al.*, 1998), todavía no se ha demostrado que éste sea un marcador exclusivo de este subtipo celular, ya que las células T, recientemente activadas y sin presentar un tipo de respuesta definida, expresan también CCR5 (Sallusto *et al.*, 1998). Además de CCR5, CCR1 y CXCR3 (Sallusto *et al.*, 1998; Bonecchi *et al.*, 1998; Loetscher *et al.*, 1998) también se expresan en la superficie de estas células. A diferencia de CCR5, la expresión de CXCR3 no desaparece tan rápido de la superficie celular tras su activación como ocurre con CCR5 (Sallusto *et al.*, 1998). El conjunto de estas observaciones sugieren que CCR5 sería más un receptor de células Th1 efectoras que han sido recientemente creadas, que un marcador de esta función.

Por lo tanto, en base a estos datos se puede definir que el efecto quimioatrayente de las quimiocinas de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  se produce de manera preferencial en las células T favoreciendo la acción en las células Th1 vs las Th2 (Siveke and Hamann, 1998).

### **1.3.7. Células y tejidos que expresan MIP-1 $\beta$**

Como hemos mencionado anteriormente, MIP-1 $\beta$  es una quimiocina inducible (al igual que MIP-1 $\alpha$ ) por lo cual la mayoría de las diferentes células y tejidos no expresan de manera constitutiva estas quimiocinas, sino que, por el contrario, son reguladas de forma positiva tras un estímulo. Este estímulo puede ser una citocina (estímulo endógeno), la presencia de un agente extraño (estímulo exógeno) o bien el desarrollo de una enfermedad específica (Ward and Westwick, 1998). Así se ha visto, que de manera similar a MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  puede ser rápidamente sintetizada por diversas células y tejidos en respuesta a una gran variedad de estímulos (Tabla I.2).

Aunque este fenómeno de inducción absoluta suceda en la mayoría de los casos, se han descrito algunas excepciones: se ha encontrado expresión constitutiva del gen en células tumorales, como es el caso de la leucemia aguda de linfocitos T (Yamamura *et al.*, 1989). También se ha reportado que en linfocitos infiltrantes de tumor (ITLs), existe una expresión constitutiva de esta quimiocina. Aunque esta expresión constitutiva pudiera explicarse por la disregulación génica de los tumores, el hecho de que MIP-1 $\beta$  y MIP-1 $\alpha$  se expresen de manera constitutiva en células tumorales, ha hecho pensar que estas quimiocinas pudieran estar desarrollando alguna función antitumoral (Tanaka *et al.*, 1998). Queda por demostrar si estos cambios constituyen fenómenos protectores o son simple consecuencia de la transformación tumoral.

### **1.3.8. Actividades fisiopatogénicas**

En condiciones normales, ausencia de infección o algún tipo de estímulo endógeno, los niveles de MIP-1 $\beta$ , así como los de MIP-1 $\alpha$ , son muy bajos o indetectables en los tejidos humanos (Kukita *et al.*, 1997). Sin embargo, se observa que los niveles de estas quimiocinas pueden verse alterados en función de las condiciones fisiopatológicas que presente el individuo en un momento determinado. Por ejemplo, en condiciones patológicas, provocadas por la invasión de un agente extraño, bien sea un microorganismo de origen bacteriano, viral, parasitario u otro, así como

Tabla I.2. Expresión de MIP-1 $\beta$  en células de cultivo

Fuente celular	Expresión		Estímulo	Referencias
	Constitutiva	Inducible		
<b>Células Primarias</b>				
Monocitos / Macrófagos	+		LPS, IL-7	Ziegler <i>et al.</i> , 1991
			CD40 - CD40L	Kornbluth <i>et al.</i> , 1998
			Enterotoxina B (SEB)	Krakauer <i>et al.</i> , 1999
			Infección <i>Listeria Monocytogenes</i>	Flesh <i>et al.</i> , 1998
			Infección por VIH-1	Schmidtmayerova <i>et al.</i> , 1996
Macrófagos alveolares	+		TNF- $\alpha$ , adherencia al plástico	Driscoll <i>et al.</i> , 1995
Células dendríticas	+		CD40 - CD40L	McDyer <i>et al.</i> , 1999
			LPS, TNF- $\alpha$	Sallusto <i>et al.</i> , 1999
Linfocitos T	+		anti-CD3, PHA, Con A, PMA	Ward and Westwick, 1998
			anti-CD3 + anti-CD28	Herold <i>et al.</i> , 1997
Linfocitos T citotóxicos	+		Activación antigénica específica	Wagner <i>et al.</i> , 1998
Linfocitos B	+		Activación a través del receptor antigénico de los B, SAC	Krzysiek <i>et al.</i> , 1999
Células NK	+		IL-15, (IL-12 + IL-15), (IL-18 + IL-12)	Bluman <i>et al.</i> , 1996
Neutrófilos	+		LPS, LPS + IFN-g	Kasama <i>et al.</i> , 1995
Mastocitos	+		IgE + Ag, Con A, PMA + Ionomicina	Burd <i>et al.</i> , 1989
Queratinocitos	+		Infección por HSV	Mikloska <i>et al.</i> , 1998
Fibroblastos	+		LPS, IL-1	Xia <i>et al.</i> , 1997
Microglías	+		LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$	McManus <i>et al.</i> , 1998
Astrocitos	+		LPS, TNF- $\alpha$ , IFN-g	Guo <i>et al.</i> , 1998
<b>Células Tumorales</b>				
Astrocitomas	+		LPS, PMA	Ishii <i>et al.</i> , 1998
Líneas celulares (HUT102 / MT-2, MJ)	+	+	Expresadas constitutivamente	Yamamura <i>et al.</i> , 1989

**Tabla I.2:** Se representa la producción constitutiva e inducida de MIP-1 $\beta$  a partir de la estimulación de diferentes tipos celulares con determinados inductores (Modificado de Sherry B. and Franchin G., 2000).

también en alteraciones fisiológicas ocasionadas por disfunción del propio organismo, como por ejemplo artritis reumatoide, asma, rinitis o dermatitis atópicas (Bousquet *et al.*, 1990; Sousa *et al.* 1994; Lamkhioued *et al.*, 1997), estas proteínas son secretadas de forma específica, con el fin de apoyar y potenciar la respuesta de ataque que se está iniciando en el

organismo, de manera de restablecer nuevamente el buen funcionamiento y el equilibrio en el sistema.

Otros estudios han revelado que MCP-1 y el TNF- $\alpha$  aumentan la respuesta de MIP-1 $\beta$  tras a la infección por *cryptococcus* en ratón (Huffnagle *et al.*, 1997), y que el TNF- $\alpha$  por sí solo induce la liberación de MIP-1 $\beta$  de los macrófagos alveolares en procesos alérgicos (Dery and Bissonnette *et al.*, 1999). Ahora bien, para que las quimiocinas puedan desarrollar sus actividades biológicas, además de expresarse de forma específica en el lugar donde se está produciendo la inflamación, necesitan mantenerse en el tiempo de una forma controlada, hasta que el sistema inmune pueda completar su función. Esta regulación viene dada en gran parte por las citocinas, quienes tienen la capacidad de controlar la magnitud de la respuesta, así como también el tiempo de su duración a través de su presencia en el medio en el que se está desarrollando el proceso. Así mismo, otros elementos endógenos, como las citocinas o las moléculas de adhesión, son capaces de regular la actividad de las quimiocinas. En el caso de MIP-1 $\beta$ , tanto ICAM-1 como LFA-3, se han visto implicadas en la modulación positiva de esta quimiocina (Kim *et al.*, 1999), probablemente por la capacidad estimuladora de LFA-1 y CD2 frente a los linfocitos T.

### **1.3.9. MIP-1 $\beta$ en la respuesta viral**

Algunos microorganismos patógenos, tienen la capacidad de unirse a ciertos receptores de quimiocinas expresados en diferentes células, con la finalidad de entrar al interior de éstas para reproducirse. Ejemplo de ello, lo vemos con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que usa dos receptores principales para infectar las células humanas: el CCR5 y el CXCR4 (Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996).

Estudios realizados por Cocchi y colaboradores demostraron que tanto MIP-1 $\beta$  como MIP-1 $\alpha$  y RANTES inhiben la infección de los linfocitos T CD4+ por el VIH-1 (Cocchi *et al.*, 1995). De hecho, fue esta observación la que dio pie a la identificación de los receptores CCR5 y CXCR4, como los principales correceptores del virus: si CCR5 es el receptor común para las tres quimiocinas anti-virales, éste parece ser el mejor candidato a correceptor. La trascendencia real de estas observaciones, se soportan en el

hecho de que otros estudios han encontrado niveles aumentados de estas quimiocinas en pacientes con SIDA, con respecto a individuos infectados que no han desarrollado la enfermedad (McKenzie *et al.*, 1996; Zanussi *et al.*, 1996). A su vez, se ha visto que los niveles aumentados de estas quimiocinas, en paciente con SIDA, se correlacionan con un desarrollo lento de la enfermedad (Gallo *et al.*, 1996), lo que hace suponer que estas proteínas aportan un carácter protector frente a la enfermedad.

#### **1.4. Quimiocinas y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1)**

##### **1.4.1. Historia del VIH-1**

Los Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) son los agentes etiológicos causantes del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en humanos (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984). El SIDA se describió por primera vez en el año 1981 en los Estados Unidos, en un grupo de jóvenes homosexuales que presentaban un daño generalizado del sistema inmunitario, siendo ésta la característica más relevante del cuadro clínico, en el que se observaba daño neurológicos e infecciones oportunistas inusuales (Gottlieb *et al.*, 1981; Siegal *et al.*, 1981). Además de este primer grupo de pacientes, también se observaron los síntomas en un segundo grupo de individuos más heterogéneo, representado por heterosexuales, hijos de madres que padecían la enfermedad, drogadictos por vía parenteral, hemofílicos y receptores de transfusiones sanguíneas. Esto llevó a suponer, que ésta era una enfermedad que podía ser transmitida a través de relaciones sexuales, transfusiones sanguíneas o la transmisión vertical de madres a hijos.

Paralelamente diferentes grupos de investigadores identificaron el agente causal y determinaron su origen viral (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Popovic *et al.*, 1984; Gallo *et al.*, 1984). Estudios posteriores definieron que el agente causal de la enfermedad era un retrovirus, que desde el año 1986 se llama Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Coffin *et al.*, 1986). Luego se describió una segunda variante del VIH que ha sido denominada

VIH-2 (Clavel *et al.*, 1986), mientras que el término VIH-1 se utiliza para el virus descrito inicialmente.

Por otra parte, se encontró que el VIH está genéticamente relacionado con el que se llamó Virus de la Inmunodeficiencia de Simios (SIV). Esta definición ha hecho que se suponga, que el origen del VIH (tanto el tipo 1 como el tipo 2) derive posiblemente de una transmisión zoonótica (Hirsch *et al.*, 1989; Huet *et al.*, 1990): así mientras VIH-1 pudo transmitirse de una subespecie de chimpacé, el *Pantroglodytes troglodytes* a la raza humana, el VIH-2 pudo derivar del SIV de monos del tipo *sooty mangabey* (Gao *et al.*, 1994).

#### **1.4.2. Estructura del VIH-1**

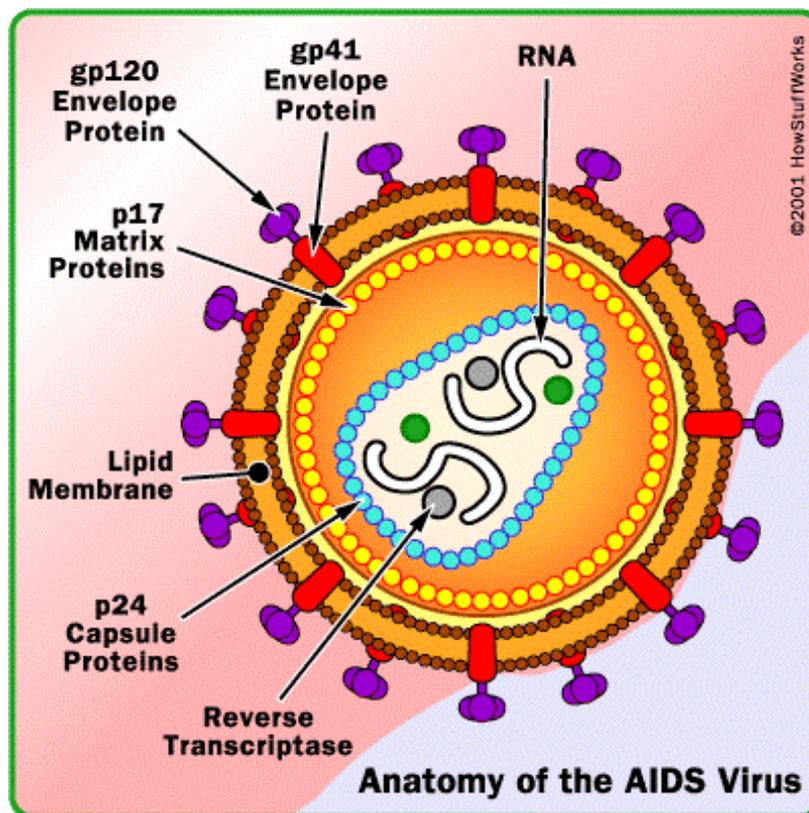
El VIH-1 pertenece a la familia Retroviridae y se subclasifica en la subfamilia de los lentivirus. Los lentivirus presentan una morfología común; los viriones tienen forma esférica, que mide alrededor de 80-100nm de diámetro y su estructura general está representada en tres capas: 1) una capa interna o nucleoide, que contiene el material genético (representado por una cadena única de RNA viral, que contiene los genes reguladores y estructurales (Greene, 1991)), las enzimas necesarias para la retrotranscripción (Baltimore, 1970) y para su ciclo vital, y la proteína de la cápside (p24) que recubre la nucleocápside viral. 2) La capa intermedia o matriz de forma icosaédrica, está representada principalmente por la proteína p17. 3) Finalmente la capa más externa, es una bicapa lipídica o envoltura viral, que deriva de la membrana plasmática de la célula huésped y es donde se insertan las glucoproteínas de la envoltura viral *Env* (gp120 y gp41) y otras moléculas derivadas del huésped como los antígenos de histocompatibilidad de clase I y clase II. Tanto la gp120 como la gp41 son estructuras fundamentales en el reconocimiento de la célula huésped y desempeñan por tanto, un papel esencial en el proceso de infección (Hammond *et al.*, 2001) (Fig. I.6).

#### **1.4.3. Ciclo de replicación del VIH-1**

El ciclo biológico de replicación del VIH-1, se puede dividir en tres etapas claramente diferenciadas: una etapa temprana que se inicia con el

reconocimiento de la célula huésped y termina con la integración del DNA proviral en el DNA del huésped; una fase de latencia con el DNA integrado en el genoma; y una fase tardía que comprende la transcripción del genoma viral, con las subsecuentes expresiones de los genes reguladores y estructurales que favorecen la generación de una progenie infecciosa y la salida de ésta al exterior de la célula (Levy, 1993) (Fig. I.7).

### Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo I



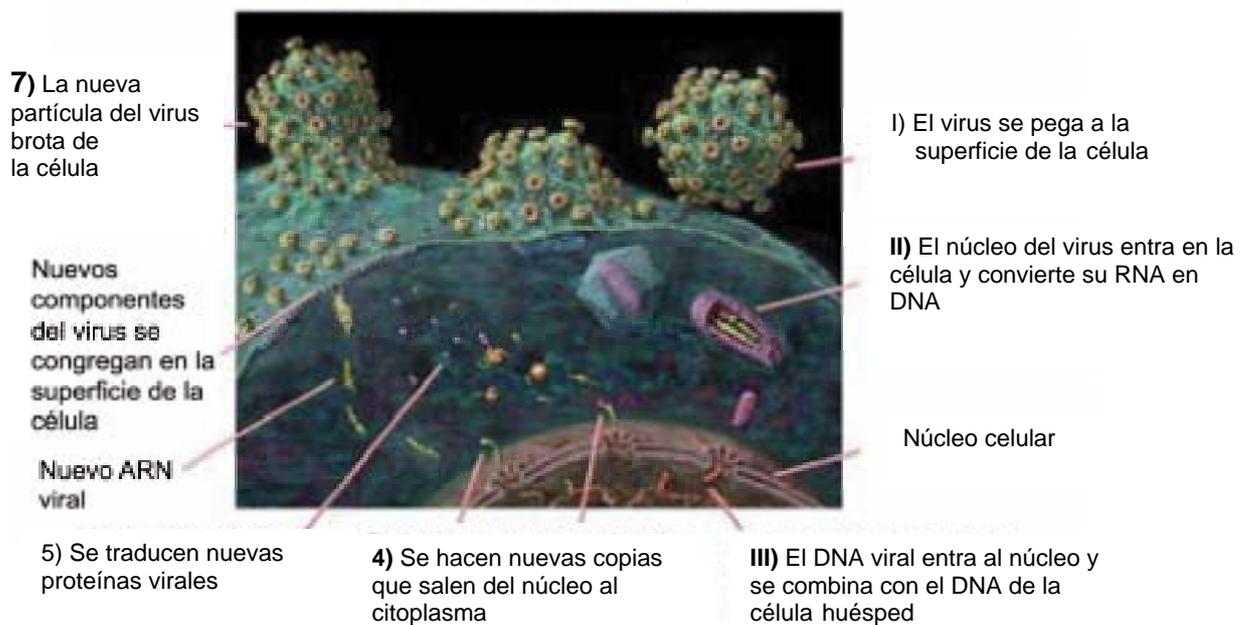
**Fig. I.6:** Representación esquemática de la estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I.

Las diferentes etapas de la replicación viral, se pueden dividir en los siguientes pasos:

- A) Etapa temprana (reconocimiento del receptor y entrada del virus)

La entrada del virus en la célula se lleva a cabo mediante la interacción específica de la glicoproteína gp120 con el receptor CD4 y los correceptores de tipo CCR5 o CXCR4 presentes en la superficie de la célula huésped. Está bien definido que existe un receptor específico y común para todos los subtipos del VIH, que es la molécula CD4. De hecho su presencia determinará el tropismo viral a los tipos celulares que lo expresen.

### CICLO DE VIDA DEL VIH SIMPLIFICADO



**Fig. I.7:** Representación esquemática del ciclo vital del VIH-1 en el que se representan los diferentes pasos que ocurren desde que interacciona con la superficie celular hasta que se libera la nueva partícula viral con capacidad infecciosa (En números romanos se indican los distintos pasos de la etapa temprana y los números arábigos sitúan los pasos de la etapa tardía) (Modificado de [www.rkm.com.au](http://www.rkm.com.au))

Entre estas células encontramos los linfocitos T CD4+, las células de la estirpe monocito-macrofágica, las células dendríticas y algunas células del sistema nervioso central (microglía) (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984). Estudios posteriores demostraron que si bien la molécula CD4 era necesaria para que se llevaran a cabo los cambios conformacionales en la *Env* (Sattentau and Moore, 1991), su expresión no era suficiente para producir una fusión completa entre ambas membranas, lo cual constituye

un pre-requisito para la entrada del virus en la célula. Es por esto que se dedujo que existían otros factores que intervienen en la unión, favoreciendo finalmente la penetración vírica.

Así, como ya se ha descrito anteriormente, se han definido algunos receptores de la familia de las quimiocinas que actúan como correceptores en este proceso, entre los que destacan el CCR5 y CXCR4 como los más importantes (Feng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1996).

Tras la interacción entre la gp120 y sus receptores, se produce una fusión entre ambas membranas lipídica, en la que participa preferencialmente la gp41. De esta manera se favorece la entrada de la nucleocápside al interior celular y se desencapsida el genoma viral (Levy, 1993; Picard *et al.*, 1997)

- **Transcripción reversa e integración en el genoma**

Una vez que el genoma viral se encuentra en el citosol de la célula, se inicia el proceso de replicación a través de la transcriptasa inversa (RT) contenida en el virión que permite la síntesis de una doble hebra de DNA.

La retrotranscriptasa inversa del VIH, es una DNA polimerasa RNA dependiente que presenta una característica distintiva y que resulta promotora de la resistencia viral: la ausencia de la actividad 3'-5' exonucleasa. Esta actividad presente en la mayoría de las polimerasas, se encarga de reemplazar las bases que han sido colocadas erróneamente, para garantizar una copia correcta. Por lo tanto, la ausencia de ésta, provocará una transcripción imprecisa y con algunas alteraciones genéticas (Mansky *et al.*, 1995). Este proceso, repetido infinitas veces por el virus, es la causa de que en el VIH se detecten variaciones a nivel genético con tanta frecuencia y de hecho, es lo que explica de alguna manera, que el virus pueda escapar con tanta facilidad de la respuesta inmune, variar su tropismo celular (específicamente por las alteraciones a nivel de la gp120) y hacerse resistente a los diferentes fármacos (Goodenow *et al.*, 1989).

Posteriormente el DNA proviral es transportado, hasta el núcleo de la célula e integrado al azar en el genoma del huésped (Bukrinsky *et al.*, 1992; Bukrinsky *et al.*, 1993 ). Sin embargo, hay estudios que demuestran

que el material genético del virus una vez copiado, se almacena en el citoplasma de la célula en lugar de integrarse al genoma, lo que se conoce como *preintegración*. Este fenómeno pudiera explicar en parte las *infecciones silentes*, o al menos aquellas en las que personas infectadas no llegan a producir anticuerpos específicos contra el virus.

- **B) Latencia de la infección**

El VIH una vez que ha sido integrado en el genoma puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o replicarse masivamente provocando un efecto citopático sobre la célula infectada. Esta transición de la forma latente a la replicación activa, constituye un elemento importante en la inmunopatogenia de la infección y en ella se ven involucrados varios factores. De hecho, hablar de latencia en la infección por el VIH, constituye uno de los aspectos que más controversia ha generado en los últimos años.

El estado de latencia clínica a menudo no se acompaña de una latencia viral (Piatak *et al.*, 1993; Buchbinder *et al.*, 1994), debido a que se pueden detectar niveles de viremia en sangre periférica y cargas virales masivas en órganos linfoides (Embretson *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de los linfocitos T CD4+ de sangre periférica y de órganos linfoides, se encuentran infectados de forma latente (Embretson *et al.*, 1993; Finzi *et al.*, 1997), siendo menos del 1% de las células en las que se observa replicación viral masiva. En esta etapa hay una gran interacción entre el virus y el sistema inmunitario, que pareciera ser capaz de controlar la infección.

El estado de latencia o activación del virus puede verse influenciado por el tipo celular. En las células mononucleares fagocíticas (especialmente en macrófagos tisulares), se ha observado que la replicación viral se lleva a cabo de forma crónica y no se observan efectos citopáticos asociados aunque no se descarta completamente el estado de latencia (Gendleman *et al.*, 1986; Virelizier *et al.*, 1998). Por el contrario, la situación de los linfocitos T CD4+ es diferente. Para que se complete el proceso de transcripción viral iniciado por la maquinaria del mismo, es necesaria la

participación de ciertos factores celulares (SpI y NF-kB) (Gaynor *et al.*, 1992).

- **C) Restricción del virus**

Parece claro que existe una replicación basal, pero en los linfocitos T se necesita una activación para la replicación del virus a gran escala. El factor principal implicado es el NF-kB (Alcamí *et al.*, 1996), proteína que se encarga de regular diferentes genes celulares implicados en la respuesta inmune (Baeuerle, 1996) y que sólo se induce en los linfocitos T, tras la activación celular. Esto implica que la replicación del virus depende de la activación de los linfocitos infectados (Alcamí *et al.*, 1996; Virelizier *et al.*, 1998; Barré-Sinoussi *et al.*, 1983).

#### **1.4.4. Receptores del VIH**

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) representa la expresión clínica final de la infección por el VIH. Esta enfermedad muestra una severa depleción de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica, además de una destrucción generalizada del sistema inmune y alteraciones neurológicas diversas (Levy *et al.*, 1993). La disminución abrumadora de los niveles de linfocitos T CD4+, característica e indicativa de la enfermedad, hizo suponer ya desde el inicio de su descripción, que éstos cumplían alguna función. Estudios posteriores demostraron que la molécula CD4 era el receptor primario para el VIH-1 (Dalglish *et al.*, 1984; Klatsmann *et al.*, 1984) y por tanto definía las células diana de la infección.

Dos estudios confirmaron la veracidad de estos resultados a partir de las siguientes observaciones: en primer lugar la glicoproteína gp120, presente en la superficie del VIH, es capaz de formar inmunocomplejos con la molécula CD4 y precipitarla (McDougal *et al.*, 1986); en segundo lugar, se observó que al transfectar el gen que codifica para CD4 en células no infectadas, éstas se hacían susceptibles a la infección por el virus (Maddon *et al.*, 1986).

Por otro lado, los aislamientos primarios de VIH-1 mostraron ciertas diferencias en cuanto a su habilidad para infectar células CD4+. Por un lado

se observó que había un grupo capaz de infectar a los macrófagos (cepas M-trópicas). Estas cepas preferencialmente no inducen la formación de sincitio (NSI) y tampoco son capaces de infectar líneas celulares T CD4+ transformadas. Por otro lado, se vió que otro tipo de cepas mostraban una replicación eficiente en líneas celulares T CD4+ (cepas T-trópicas). Estas se caracterizan por inducir la formación de sincitio (SI), aunque mayoritariamente no son capaces de infectar a los macrófagos (Cheng-Mayer *et al.*, 1988). Estas tendencias observadas en cuanto a su capacidad infecciosa y al tropismo viral, vienen determinadas por diferencias en la secuencia del dominio V3 de la glucoproteína de la superficie gp120, que es la responsable de interactuar con los receptores (Ivanoff *et al.*, 1992; Willey *et al.*, 1994; Freed *et al.*, 1991). Pero estos diferentes fenotipos no son sólo variantes con interés académico, puesto que tienen una importancia clínica al estar estrechamente relacionados con la patogénesis de la enfermedad.

La mayoría de los virus aislados en el período de seroconversión o la fase asintomática de la infección, corresponden a las cepas M-trópicas o no formadoras de sincitio (Conner and Ho, 1994; Conner *et al.*, 1993; Roos *et al.*, 1992; Tersmette *et al.*;1988), mientras que los virus que se aíslan de pacientes con un número bajo de linfocitos T CD4+ y que desarrollan la enfermedad, son cepas T-trópicas inductoras de la formación de sincitio y con una tasa de replicación elevada (Tersmette *et al.*, 1988).

De todos estos resultados ya los investigadores intuían que debía haber otro factor en la superficie de la célula que explicara todas estas variaciones: por un lado el tropismo diferencial en el virus, que le permitía infectar linfocitos o macrófagos; y por otro lado, que la unión de la gp120 con la molécula CD4 genera cambios insuficientes en la superficie glicoproteica (Sattentau and Moore, 1991) que no permiten la fusión completa de ambas membranas, lo cual constituye un requisito para la infección viral.

Si bien es cierto que ya se conocía que los linfocitos T CD8+ secretaban unos factores capaces de suprimir la replicación del VIH-1 en linfocitos T CD4+ (Walker *et al.*, 1988), no fue hasta el año 1995, en que Cocchi y colaboradores demostraron que las líneas inmortalizadas *in vitro* de linfocitos T CD8+, en presencia de clones T CD4+ infectados con un virus M-trópico, eran capaces de secretar factores de actividad supresora

frente al virus. Este estudio demuestra que las quimiocinas pueden ejercer efectos anti-virales, identificando a RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (las tres CC quimiocinas) como los principales responsables. Por otro lado, hay que recalcar que este efecto supresor, sólo quedaría restringido para los virus M-trópicos, ya que no se observa ningún efecto inhibitorio en presencia de virus T-trópicos. Sin embargo, quedaba todavía por aclarar el mecanismo a través del cual estas quimiocinas eran capaces de ejercer su actividad anti-viral, y si los niveles aumentados de cada una de ellas guardaban alguna relación con la progresión lenta o el retraso a desarrollar la enfermedad (Cocchi *et al.*, 1995).

El hallazgo de las quimiocinas como principales agentes supresores, llevó a los investigadores a intentar esclarecer su mecanismo de acción.

En este esfuerzo, un grupo de investigadores (Paxton *et al.*, 1996) quiso determinar si existía algún tipo de relación entre la resistencia que presentaban algunos individuos a contraer la infección, a pesar de haber sido expuestos al virus en más de una oportunidad, con la presencia de estas quimiocinas. Los resultados demostraron altas concentraciones de estas quimiocinas en los sobrenadantes, hasta cinco veces más de lo normal (en el caso de RANTES, ya que MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  presentaban niveles un poco menores), lo cual podía explicar el efecto supresor en la replicación de cepas M-trópicas, en los linfocitos T CD4+. A partir de estas observaciones sugirieron que el efecto protector se debía a una peculiaridad más que a un mecanismo adquirido, que se reflejaba en un aumento de la secreción de las CC quimiocinas de foma constitutiva (Dragic *et al.*, 1996).

A pesar de que en aquel momento se había demostrado que estas quimiocinas podían conferir cierta protección frente a la infección, el mecanismo aún no estaba claro. Estudios de interacción entre la membrana celular y la viral (Litwin *et al.*, 1996), demostraron que RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  eran capaces de bloquear la interacción normal entre la molécula CD4 y la glicoproteína viral de la cepa M-trópica; en concordancia con los datos anteriores, no ocurría esto con las cepas T-trópicas. Por lo tanto, estaba claro que debía existir otro factor en la superficie de la célula que favoreciera la fusión de la glicoproteína con la membrana celular, definiendo en último término la entrada del virus.

En el año 1996 esa incertidumbre quedó esclarecida por un grupo de investigadores (Feng *et al.*, 1996; Berson *et al.*, 1996) que identificaron una molécula designada con el nombre de fusina, para remarcar su característica promotora en la fusión, que intervenía como cofactor en el proceso de fusión entre la célula T y las cepas T-trópicas permitiendo la infección por estas. Esta molécula pertenecía a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a la proteína G y posteriormente fue renombrada CXCR4, al identificarse como el ligando natural de la  $\alpha$ -quimiocina SDF-1 o Factor Derivado de Células Estromales-1 (*Stromal Cell Derived Factor-1*) (Oberlin *et al.*, 1996; Bleul *et al.*, 1996). Sin embargo, este receptor no es utilizado como cofactor por las cepas M-trópicas en la infección de macrófagos.

El descubrimiento de CXCR4 como cofactor para la infección viral, les permitió a los investigadores sugerir, que la actividad anti-viral ejercida por las CC quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , reportadas anteriormente (Cocchi *et al.*, 1995), se debía a la unión de estas quimiocinas a su receptor, que funciona como cofactor en el proceso de fusión de la célula huésped con la cepa M-trópica, inhibiendo de este modo el proceso de fusión (Feng *et al.*, 1996; Paxton *et al.*, 1996).

Por otro lado hay que aclarar que la expresión de CD4 junto con otro correceptor, no necesariamente confiere susceptibilidad a la célula diana frente una cepa determinada, ya que se ha visto que la expresión de CXCR4 en monocitos/macrófagos (Moriuchi *et al.*, 1998), se acompaña de cierta resistencia frente a las cepas T-trópicas (Cheng-Mayer *et al.*, 1988). Ello sugiere que existen otros elementos implicados en la sensibilidad a la infección.

Además, el hecho de que MIP-1 $\beta$  presente una gran actividad anti-viral y que ésta sólo se una con gran afinidad a CCR5, fue razón suficiente para pensar que CCR5 era el correceptor principal, que junto a la molécula CD4, facilita la entrada de las cepas M-trópicas al interior de la célula (Alkhabit *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996).

Para la fecha, sólo seis receptores de CC quimiocinas habían sido descritos. También se sabía que estos podían unir a más de una quimiocina (Combadiere *et al.*, 1996). Sin embargo, a partir de la clonación de CCR5 por Samson y colaboradores, se dio a conocer que RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-

1β eran sus ligandos (Samson *et al.*, 1996; Combadiere *et al.*, 1996; Raport *et al.*, 1996). A partir de ese momento, varios grupos pensaron que CCR5, el cual compartía un 30% de homología con CXCR4, podía ser el candidato principal, que actuara como correceptor para facilitar la entrada del VIH en la célula. Así fue como ese mismo año se publicaron algunos artículos que demostraban que CCR5 era correceptor para la entrada de cepas M-trópicas a la célula (Dragic *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996) y que CCR3 y CCR2 actuaban como receptores para cepas de tropismo dual (Choe *et al.*, 1996; Dorzans *et al.*, 1996).

#### **1.4.4.1. CCR5: Correceptor de cepas M-trópicas**

##### **1.4.4.1.1. Localización genética y Estructura Proteica**

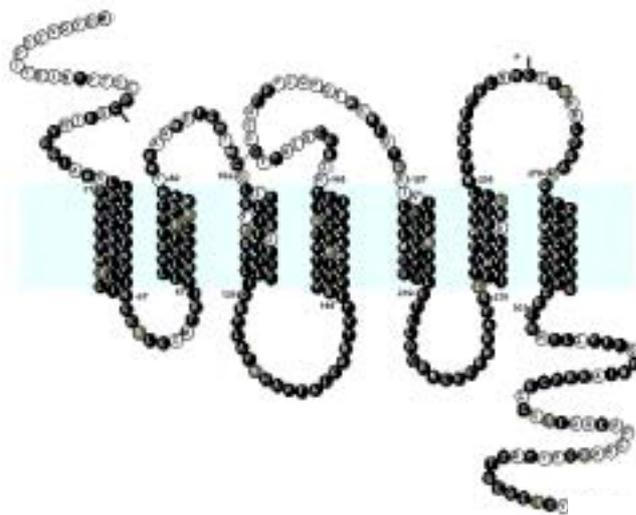
El gen que codifica para CCR5 se encuentra localizado en el cromosoma 3 p21.3. (Samson *et al.*, 1996; Maho *et al.*, 1999), y la secuencia que codifica para toda la proteína está contenida en un único exón. También se han descrito intrones en la zona 3' no traducida del gen. CCR5 presenta dos promotores alternativos: uno llamado Pd (corriente abajo) y el otro Pu (corriente arriba) (Moriuchi *et al.*, 1997; Mummidi *et al.*, 1997). Dentro del promotor Pd se han descrito los sitios de unión para los factores de transcripción STAT, NFκB, AP-1, NF-AT y CD28RE, al igual que se ha reportado que los factores de transcripción GATA-1 y p65 (RelA) regulan la expresión de CCR5 (Liu *et al.*, 1998; Moriuchi *et al.*, 1999). Por otro lado, si bien es cierto que se ha descrito que el promotor Pd es utilizado con mucha mayor eficiencia que el promotor Pu, todavía no se conoce si ambos promotores actúan de forma específica sobre un grupo celular determinado (Moriuchi *et al.*, 1997; Mummidi *et al.*, 1997).

CCR5 es una proteína que está clasificada dentro de los receptores de las CC quimiocinas. Presenta un plegamiento general en α-hélice y al igual que otros receptores de quimiocinas, su estructura se caracteriza por presentar cuatro dominios extracelulares (representados por un dominio N-terminal y tres loops extracelulares) y cuatro cisteínas que dan origen a dos puentes disulfuros. El puente que une el extremo N-terminal con el tercer loop extracelular muestra cierta especificidad para esta familia de

receptores de quimiocinas, aunque ambos puentes se han visto implicados en la unión de quimiocinas y en las uniones que desarrolla el receptor con la glicoproteína gp120 (Blanpain *et al.*, 1999) (Fig. I.8).

Para determinar las regiones del receptor que interaccionan con el virus y con las quimiocinas, se utilizaron varias quimeras y se estudiaron algunas mutaciones puntuales. En primer lugar se determinó, que las interacciones *Env*-CCR5 definen complejos conformacionales que involucran residuos presentes en los cuatro dominios transmembrana (Dooms and Peipert 1997). En segundo lugar, se demostró que el dominio N-terminal le confiere la función de correceptor (Amara *et al.*, 1997) y es un elemento fundamental para su actividad. Sin embargo se ha visto que algunas cepas M-trópicas son tolerantes a variaciones en este dominio, incluyendo la delección de los primeros 16 residuos, lo cual implica que el resto de los loops extracelulares (especialmente el segundo) son elementos que también definen la infección (Dooms and Peipert 1997; Arvanitakis *et al.*, 1997).

### Estructura del receptor CCR5



**Fig. I.8:** Representación esquemática de la estructura del receptor CCR5 y de su secuencia aminoacídica. Se muestran los tres loops extracelulares (parte superior) y tres loops intracelulares (parte inferior) que unen los siete dominios transmembrana. Los residuos de cisteínas extracelulares están representados con barras. También se indican los extremos N-terminal y C-terminal (Mc Nicholl *et al.*, 1997).

#### 1.4.4.1.2. Interacción del receptor CCR5 con sus ligandos

CCR5 fue descrito en un principio como receptor de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES (Samson *et al.*, 1996), aunque hoy en día se conoce que MCP-2 y MCP-4 también son ligandos secundarios de este receptor. En este sentido también se ha visto que MCP-3 actúa como un antagonista natural de CCR5 (Gong *et al.*, 1998; Ruffing *et al.*, 1998), aunque no ha sido posible demostrar su interacción directa.

Cada uno de estos ligandos son capaces de unirse a este receptor con afinidades diferentes, desencadenando respuestas de distintas intensidades.

En cuanto al efecto supresivo que muestran estas quimiocinas frente a la infección por el VIH, se ha demostrado que RANTES es capaz de bloquear la entrada del virus de una manera más efectiva que MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , aunque también se han descrito algunas variantes tanto para MIP-1 $\alpha$  como para RANTES en las que la afinidad hacia el receptor se ha visto incrementada, y con ella, la capacidad para bloquear la infección.

Existe una variante de RANTES post-traducciona, en la que se modifica el extremo N-terminal de la proteína dando lugar al aminoóxipentano-RANTES (AOP-RANTES). Esta forma se origina a partir de la digestión que realiza la serin proteasa dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) (CD26) sobre el residuo de prolina presente en el extremo N-terminal, originando una proteína truncada con alteraciones en sus actividades biológicas. Entre ellas, cabe destacar un incremento en la afinidad con el receptor CCR5 y la incapacidad de interactuar con sus ligandos naturales CCR1 y CCR3 (Oravec *et al.*, 1997; Struyf *et al.*, 1998). El incremento de la afinidad con el CCR5 aumenta potencialmente su actividad anti-viral frente las cepas M-trópicas, siendo considerado hoy en día una de las CC quimiocinas más potentes inhibidoras.

En cuanto a MIP-1 $\alpha$ , se ha descrito que esta quimiocina está codificada por dos genes no alélicos altamente relacionados (Blum *et al.*, 1990; Irving *et al.*, 1990; Nakao *et al.*, 1990). Las proteínas LD78 $\alpha$  y LD78 $\beta$  sólo difieren en 3 de los 70 aminoácidos, siendo uno de ellos la prolina en posición 2 del extremo N-terminal, la principal responsable del incremento en la afinidad hacia el receptor CCR5 y en consecuencia, el aumento potencial de la actividad anti-viral frente al VIH que se observa en esta variante (Nibbs *et al.*, 1999). También se ha descrito que la presencia del residuo de prolina en el extremo N-terminal, la hace susceptible a la acción

de la serin proteasa dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) que corta dipéptidos del extremo N-terminal de las proteínas que presenten un residuo de prolina o alanina en la penúltima posición (De Meester *et al.*, 1999). Esta digestión aumenta aún más su propiedad anti-viral, debido a un aumento en su afinidad con CCR5 convirtiéndola hoy en día, en la quimiocina que presenta mayor actividad anti-viral (Struyf *et al.*, 2001), incluso más que la AOP-RANTES.

La gran actividad anti-viral ejercida por RANTES en comparación con MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , sugeriría que CCR5 no es el único receptor que media la entrada de las cepas M-trópicas a la célula huésped, ya que se ha demostrado que MIP-1 $\beta$  presenta más afinidad a este receptor que RANTES (Samson *et al.*, 1996). Por lo tanto, el hecho de que intervenga otro receptor en el proceso de infección, como es el caso de CCR3, y que este responda frente a RANTES y no a MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , pudiera explicar las diferencias del efecto inhibitorio entre estas quimiocinas (Choe *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha descrito la participación de CCR3 en la formación de sincitios en etapas tempranas de la enfermedad, lo que sugiere que este receptor también actúa en la unión del virus a la célula y la consiguiente fusión de ambas membranas (Choe *et al.*, 1996).

#### **1.4.4.1.3. Expresión de CCR5 en células y tejidos**

La expresión de CCR5 se ha demostrado en un gran número de células y tejidos, entre los que destacan el linaje monocito-macrófago, donde se ha visto que mientras sólo el 5% de los monocitos circulantes expresan CCR5 (Wu *et al.*, 1997), la expresión en macrófagos es bastante elevada (Zaitseva *et al.*, 1997). También se ha descrito su expresión en células dendríticas, principalmente en aquellas que derivan de monocitos o de progenitores CD34<sup>+</sup>, así como también en las células de Langerhans (Granelli-Piperno *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999), células del endotelio vascular y en las microglías. Los linfocitos también lo expresan, principalmente los de tipo Th1, de acuerdo con la actividad biológica que desempeña MIP-1 $\beta$  en esta sub-población, y no así los del subtipo Th2 (Bonecchi *et al.*, 1998). CCR5 se expresa en bajos niveles en los progenitores linfoides o en timocitos CD4+CD8+, en correspondencia con la

actividad que ejerce MIP-1 $\beta$  sobre estas células (Berkowitz *et al.*, 1998; Dairaghi *et al.*, 1998). Posteriormente, la expresión del receptor disminuye cuando esta célula madura y llega a la circulación; así las células *naive* de la periferia y los linfocitos B no expresan CCR5.

De todo esto se desprende, que la expresión de CCR5 en estas células tenga una clara importancia en la transmisión y en la resistencia de la enfermedad (Hill and Littan, 1996). Así se ha visto que las cepas M-trópicas son las que predominan en los estadios de primo infección, por tanto se consideran la cepas responsables de iniciar la enfermedad (Roos *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1993): la infección primaria parece estar conferida a las células que expresan CCR5 más que CXCR4, ya que estas células son las que predominan en las superficies de las mucosas (tracto urogenital y la región rectal), a través de las cuales se transmite sexualmente el virus (Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 1996). Igualmente las infecciones que se establecen en el sistema retículoendotelial y en los órganos linfoides, también van a requerir de células como monocitos/macrófagos que de por sí son altamente resistentes a las cepas T-trópicas (Spijkerman *et al.*, 1995; Van't Wout *et al.*, 1994).

#### **1.4.4.1.4. Regulación de la expresión de CCR5**

La regulación de este receptor está determinada por la intervención de diferentes factores que actúan a niveles distintos, ejerciendo varios efectos en algunos tipos celulares.

Se ha visto que citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-12, al igual que las citocinas de tipo Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) promueven la expresión del gen, aumentando la presencia de CCR5 en la superficie de los PBMCs (Hariharan *et al.*, 1999; Patterson *et al.*, 1999). De hecho la expresión de CCR5 en los linfocitos, se ha visto fuertemente inducida por la IL-2 tanto *in vivo* (Zou *et al.*, 1999) como *ex vivo* (Wu *et al.*, 1997; Bleul *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha descrito que el LPS puede disminuir la expresión del receptor en células dendríticas y en macrófagos (Sica *et al.*, 1997; Moriuchi *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998). Así *in vitro*, el LPS ejerce un efecto protector contra la infección por el VIH en macrófagos (Kornbluth *et al.*, 1989; Bernstein *et al.*, 1991; Zybarth *et al.*, 1999), no sólo porque al

estimularlos promueve la secreción de citocinas (como TNF e IL-2) y de quimiocinas como MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , sino porque también es capaz de disminuir la expresión de este receptor, a través de su internalización al compartimiento citoplasmático. Este mecanismo es independiente de la síntesis proteica, ya que no se observa una reducción de la expresión del mRNA (Franchin *et al.*, 2000).

También se ha demostrado que sus ligandos (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES) pueden actuar disminuyendo la expresión de este receptor en la superficie de los macrófagos, como consecuencia de su activación (Verani *et al.*, 1997), aunque se ha visto, que la recuperación de la expresión de este receptor en la superficie de la célula es más rápida luego de la internalización inducida por las quimiocinas que por el LPS (Franchin *et al.*, 2000). En el caso de la variante de RANTES, AOP-RANTES, su potente actividad anti-viral es debida a la rápida internalización de CCR5 (Mack *et al.*, 1998).

La pérdida de la molécula CD4 en la superficie de las células, y con ella el desarrollo normal de sus funciones (Wahl *et al.*, 1989; Karsten *et al.*, 1996), está asociada a la infección por el VIH aunque se ha descrito que esta pérdida es dependiente de CCR5 (Hewson *et al.*, 2001). Se sugiere que pueda existir una pre-asociación entre el CCR5 expresado en los macrófagos y la molécula CD4, y que la endocitosis del complejo se produce tras la unión de la célula con la cepa M-trópica. Esta sospecha es comprobada, al observar que la molécula CD4 no es endocitada en aquellos macrófagos de genotipo CCR5  $\Delta 32/\Delta 32$  (que carecen de la expresión de este receptor en la superficie celular), luego de haber establecido el contacto con la cepa M-trópica del VIH-1. Por lo tanto se asume que es un mecanismo dependiente y que se asocia a la *down*-regulación de CCR5 (Hewson *et al.*, 2001).

#### **1.4.4.2. CXCR4: Correceptor de cepas T-trópicas**

Este receptor también pertenece a la superfamilia de receptores de quimiocinas y presenta siete dominios transmembrana acoplados a proteína G, pero a diferencia de CCR5, el dominio N-terminal de este receptor es mucho menos importante, en cuanto a la función que desempeña como

correceptor del VIH, siendo el primero y el segundo loop extracelular (en especial el segundo), las regiones realmente importantes que determinan la unión de las cepas T-trópicas a la célula huésped (Brelot *et al.*, 1997). De igual forma, estos dominios son importantes para la unión de SDF-1 al receptor. Vale la pena recalcar que SDF-1 es el único ligando de CXCR4.

CXCR4 se encuentra ampliamente distribuido en diversas células y tejidos, características poco usuales de los receptores de quimiocinas. Así CXCR4 se expresa en linfocitos T, linfocitos B y progenitores de las células hematopoyéticas, al igual que en células endoteliales, neuronas y astrocitos.

En cuanto a sus actividades biológicas, se ha descrito que CXCR4 interviene en la migración quimiotáctica y la adhesión leucocitaria (a través de la activación de integrinas); en los procesos de embriogénesis en los que desempeña un papel esencial (Oberling *et al.*, 1996; Bleul *et al.*, 1997); representa el principal cofactor de las cepas T-trópicas, permitiendo la entrada de éstas al interior de la célula (Feng *et al.*, 1996); así como también se le ha visto implicado en la apoptosis de linfocitos T CD8+ que ocurre generalmente durante la infección por el VIH.

CXCR4 se expresa únicamente en la superficie del 20% de los linfocitos T CD4+ que circulan por la sangre, mientras que en el 80% restante, se encuentra en el interior de las células (Bermejo *et al.*, 1998). También se ha reportado una expresión predominante en los linfocitos T *naive* en reposo (Bleul *et al.*, 1997).

La expresión de este gen se ha visto aumentada en presencia de PHA, IL-2, anticuerpos anti-CD3 o CD28 (Bleul *et al.*, 1997; Carrol *et al.*, 1997). De la misma manera se ha visto que tanto la IL-4 como TGF $\beta$  inducen la expresión de CXCR4, mientras que IFN- $\gamma$  la inhibe en linfocitos T, monocitos, células dendríticas y células endoteliales (Gupta *et al.*, 1998; Jourdan *et al.*, 1998; Penton-Rol *et al.*, 1998).

En presencia de citocinas y otros estímulos, los niveles de CXCR4 en la superficie celular son rápidamente modulados tras la activación linfocitaria, deplecionándose en la membrana a causa de la internalización del receptor (Amara *et al.*, 1997; Haribabu *et al.*, 1997). La internalización de CXCR4 también se observa en presencia de SDF-1 (Tarasova *et al.*, 1998). De este modo se ha descrito que SDF-1 previene la entrada de las cepas T-trópicas al interior de los linfocitos T CD4+, debido a la rápida

internalización que se produce tras la unión del ligando con el receptor (Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996; Amara *et al.*, 1997).

## **1.5. Polimorfismos que alteran la historia natural de la infección por el VIH.**

### **1.5.1. Polimorfismo del CCR5**

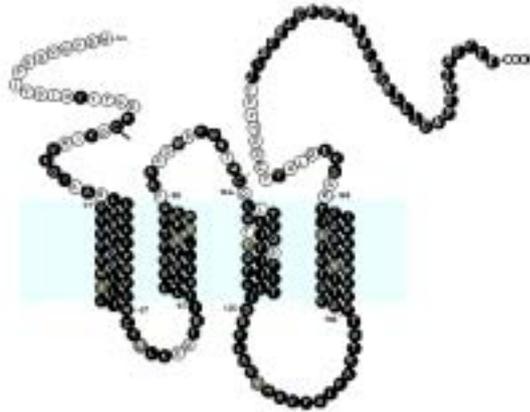
Hasta los momentos, se ha encontrado una gran cantidad de variantes para el receptor CCR5, sin embargo, la única que tiene importancia clínica es la más frecuente en humanos y la primera en reportarse. La delección de 32 pb en la región que codifica para el segundo loop extracelular del receptor, genera una alteración en el marco de lectura que favorece la síntesis de una proteína mucho más pequeña y defectuosa, ya que pierde los tres últimos segmentos transmembrana, que imposibilitan su expresión en la superficie de la célula (Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996) (Fig. I.9).

La frecuencia alélica encontrada para este polimorfismo se ve influenciada por la raza, encontrando que el 1% de los individuos blancos son homocigotos para esta variante genética, mientras que el 15% son heterocigotos (Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996). En cuanto a la raza negra o asiática; no se han encontrado individuos con este polimorfismo, por lo que esta alteración genética parece quedar conferida a la raza blanca (Samson *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996).

La importancia clínica de esta alteración, radica en la incapacidad de las cepas M-trópicas de unirse a su principal correceptor; confiriendo de este modo cierta protección a la infección por el VIH (Dean *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996). Se ha visto que individuos homocigotos para esta mutación, presentan una fuerte resistencia contra la enfermedad. Esto explica que estos individuos a pesar de verse expuestos en múltiples ocasiones al virus, permanecen sin infectarse (Huang *et al.*, 1996; Michael *et al.*, 1997; Zimmerman *et al.*, 1997). También se ha visto que los individuos heterocigotos presentan cierta protección y una evolución más favorable, que aquellos que presentan ambos alelos *wild type* (Dean *et al.*, 1996; Ioannidis *et al.*, 1998).

## Estructura de la variante $\Delta 32$ del receptor de CCR5

**Fig. I.9:** Representación esquemática de la estructura proteica y secuencia aminoacídica de



la forma mutante del receptor CCR5. La proteína carece de tres segmentos transmembrana del receptor y la región de acoplamiento a la proteína G. Los residuos que se muestran con letras itálicas corresponden a aquellos aminoácidos no naturales que se originan a partir de la alteración del marco de lectura a causa de la deleción. (McNicholl *et al.*, 1997)

Sin embargo, un hecho importante a recalcar es que la deleción de 32pb del gen CCR5, no confiere protección total frente a la infección, ya que se han reportado algunos casos (Biti *et al.*, 1997; O'Brien *et al.* 1997; Theodorou *et al.*; 1997) de personas homocigotas para este polimorfismo que han sido infectadas. Las cepas que se aislaron de estos individuos, eran de fenotipo SI o inductoras de la formación de sincitio, sugiriendo la utilización del receptor CXCR4 por parte de esas cepas (O'Brien *et al.*; 1997). Estos hallazgos son demostrativos de que no existe una protección total frente a la infección por el VIH, en base al polimorfismo del CCR5.

### 1.5.2. Polimorfismo de la CXC quimiocina SDF-1

La quimiocina SDF-1 (*Stromal-cell Derived Factor 1*) es el único ligando descrito para el receptor CXCR4. La alteración que se produce en el polimorfismo SDF-1 3'A, sólo afecta a la variante beta de esta quimiocina y se debe a un cambio de base a nivel del pre-mRNA, donde una guanina pasa a una adenina. Esta alteración provoca un defecto en la traducción que no impide que se produzca la proteína, pero sí que se sintetice correctamente. Como no afecta a la región codificante, también se le conoce como polimorfismo de la región 3' no traducida.

La frecuencia con que se encuentra este alelo en la población es de un 16 – 26% en individuos caucásicos, hispanos y asiáticos, siendo menos frecuente en afro-americanos (5,7%) y en africanos (3%) (O'Brien 1998).

Se ha visto que este polimorfismo (SDF-1 3'A) está asociado con una progresión favorable de la enfermedad (Winkler *et al.*, 1998), en individuos homocigotos. A pesar de que ésta es una alteración, que no conduce a la síntesis proteica anormal, puede tener importantes implicaciones, incluso a nivel genómico, regulando de alguna forma la expresión genética de esta quimiocina.

Se cree que este gen SDF-1 3'A regula de forma positiva la biosíntesis de la quimiocina SDF-1 en su forma  $\alpha\alpha$ , en individuos que presentan esta alteración, aumentando la posibilidad de unirse al receptor y por lo tanto inhibir la unión de cepas T-trópicas a la célula por competición, lo cual se traduce en una mayor protección frente a la infección o un retraso en la aparición del SIDA, en aquellos individuos VIH+ (Amara *et al.*, 1997).

### **1.5.3. Polimorfismo del receptor de CC quimiocinas CCR2**

El polimorfismo del CCR2 se debe a un cambio de base en la posición 190 del gen que codifica para esta proteína, en el que se sustituye una adenina por una guanina. Este cambio altera la secuencia aminoacídica normal de la proteína, en la que se sustituye una Valina en posición 64 por una Isoleucina, dando lugar a la variante CCR2V64I ó CCR2-64I (Smith *et al.*, 1997).

Este polimorfismo tiene una distribución más amplia que los anteriores, encontrándose en individuos americanos, africanos y caucásicos con una frecuencia alélica del 10-15%.

Hasta ahora no se han descrito diferencias funcionales significativas de esta proteína y su forma canónica; sin embargo, se ha visto que en pacientes VIH+, interviene de alguna manera retrasando la progresión a SIDA. En pacientes homocigotos o heterocigotos para la variante CCR2-64I, se ha observado un retraso de la enfermedad entre dos a cuatro años, con respecto a los pacientes que son homocigotos para la forma canónica de la proteína. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, todavía no está claro el mecanismo por el cual esta variante del receptor CCR2, protege o retrasa el proceso natural de la infección.

### **1.6. Resultados previos de nuestro laboratorio**

Desde hace ya varios años, nuestro grupo se ha interesado en estudiar los fenómenos que explican la rotura de la tolerancia periférica en las enfermedades autoinmunes, investigando entre otros elementos determinantes, el papel que desempeñan las quimiocinas a diferentes niveles. Así se ha estudiado la intervención de las quimiocinas en la organización de los folículos linfáticos en los órganos diana de la respuesta autoinmune organoespecífica (Armengol *et al.*, 2001), así como también se ha definido el papel diferencial que ejercen ciertas quimiocinas, en especial las  $\beta$ -quimiocinas, en el desarrollo de enfermedades autoinmunes con respecto a tejidos controles (Ashhab, 1998).

En este último abordaje, se intentaron clonar nuevos genes de  $\beta$ -quimiocinas, sobre tiroides con enfermedades autoinmunes, utilizando cebadores que reconocieran motivos conservados en las secuencias proteicas, aplicando para ello la metodología MOPAC (*Mixed oligonucleotides primed amplification of cDNA* o Amplificación cebada de cDNA con oligonucleótidos mezclados). A pesar de que no se consiguió identificar ninguna  $\beta$ -quimiocina nueva, el sistema nos permitió de afirmar que:

- En las glándulas tiroideas de pacientes con la enfermedad de Graves-Basedow, no sólo se detecta la expresión de MIP-1 $\alpha$ , MP-1 $\beta$ , MCP-1 y RANTES, sino que existe una sobreexpresión de MIP-1 $\alpha$ , MP-1 $\beta$  y MCP-1, respecto a los niveles que se encontraron en el Bocio Multinodular. Así mismo se reportó que no hubo expresión detectable de MCP-3.

- El genoma humano presenta la secuencia de un segundo locus para MIP-1 $\beta$ , con una homología muy elevada y una baja expresión, que sólo difiere de la proteína canónica a nivel de un aminoácido (Gly<sub>70</sub> por Ser).

### 1.6.1. Antecedentes

Trabajos previos ya habían descrito que MIP-1 $\beta$  es codificada por más de un gen (Chang and Reinherz 1989; Napolitano *et al.*, 1991), aunque el número preciso de genes diferentes no se definió del todo.

Entre los años 1988 y 1991, diferentes grupos independientes, reportaron el aislamiento de diferentes clonas de cDNA humanas altamente relacionadas en cuanto a su secuencia proteica. La primera de estas clonas en ser identificada fue ACT-2 (*T cell activation protein 2*) (Lipes *et al.*, 1988), que posteriormente se demostró que compartía una homología del 76% a nivel de la secuencia aminoacídica con la quimiocina MIP-1 $\beta$  murina (Napolitano *et al.*, 1991). Posteriormente, se identificaron otras clonas denominadas pAT 744 (Zipfel *et al.*, 1989), hH400 (Brown *et al.*, 1989), G-26 (Miller *et al.*, 1989), HC21 (Chang and Reinherz 1989) y a nivel genómico LAG-1 (Baixeras *et al.*, 1990), que correspondían a MIP-1 $\beta$ . Estas secuencias fueron analizadas y se observó que todas ellas eran muy parecidas a nivel proteico (75% de homología), aunque presentaban algunas diferencias. Estas diferencias sugirieron la posible existencia de varios alelos o tal vez, la presencia de diferentes genes altamente relacionados (Baixeras *et al.*, 1990).

A partir de estas observaciones, se propone la existencia de dos loci para MIP-1 $\beta$  (Irving *et al.*, 1990; Napolitano *et al.*, 1991), que fueron denominados como 744.1 y 744.2. De ahora en adelante por simplicidad, nos referiremos a ellos como Locus A (744.1) y Locus B (744.2).

La identificación de ambos loci es posible gracias a las diferencias que presentan a nivel de su secuencia aminoacídica. Entre ellas encontramos la delección de 11 pb en el intrón 2 que se ubican entre las bases 67 y 79 corriente arriba del inicio del exón 3 del locus A. También se definen discrepancias en tres aminoácidos: dos que pertenecen al péptido líder y

uno que se encuentra en la proteína madura. Estas simples diferencias son las que definen las dos variantes.

En cuanto a los cambios que ocurren a nivel del péptido líder, se observa que la Met<sub>12</sub> del locus A cambia a Val en el locus B, y la Pro<sub>20</sub> del locus A cambia a Leu en el locus B. Estos cambios no deberían alterar la estructura de la forma madura de la proteína, sin embargo, una tercera mutación puntual (A<sub>260</sub> por G) a nivel genómico, provoca un cambio de aminoácido en la proteína madura: La Ser<sub>70</sub> (aminoácido 47 de la proteína madura) en el locus A, cambia a Gly en el locus B. En este caso, esta tercera variación si puede alterar la estructura y posiblemente la función de la proteína canónica. Esta afirmación se basaría en los datos tridimensionales que se tienen respecto a MIP-1 $\beta$ .

La estructura tridimensional de la proteína (Lodi *et al.*, 1994) dio a conocer que, el átomo de oxígeno de la S70 se une con el grupo amino de K71 a través de un puente de hidrógeno, estabilizando el plegamiento del asa que se encuentra entre las hojas  $\beta$ -2 y  $\beta$ -3. El hecho de que se cambie esta Ser por una Gly, probablemente hará que el puente de hidrógeno se rompa, y debido al incremento de flexibilidad de la Gly, el asa se desestabilizaría y alteraría de alguna forma la estructura del polipéptido. Queda por ver si estos cambios pueden llegar a afectar la unión con el receptor.

### **1.6.2. Resultados de nuestro grupo**

Experimentos realizados en nuestro laboratorio, detectaron una forma truncada de MIP-1 $\beta$ , caracterizada por la falta de 5 aminoácidos en el cDNA de una glándula con tiroiditis de Hashimoto.

Esta forma, que presentaba la delección de las primeras 15 pb en el exón 3, hizo sospechar que había ocurrido un proceso de corte y unión defectuoso. Para verificar el hallazgo, se procedió a secuenciar el DNA genómico del paciente. Al secuenciar la zona que limita el intrón 2 con el exón 3, se encontró una mutación en la secuencia consenso del segundo intrón: GT en lugar de AT.

De todos es conocido, que la eficiencia en el procesamiento del pre-mRNA depende de la eficiencia de reconocimiento del spliceosoma sobre las

secuencias consenso (dinucleótidos GU en el extremo 5' y el AG en el extremo 3'), para realizar el proceso de corte y unión (*splicing*) y obtener el mRNA. El hecho de que se produzca una mutación a nivel de estas secuencias consenso provocará una alteración post-transcripcional, originando un mRNA con la pérdida total del exón en cuestión, un mRNA con una secuencia más corta o bien un mRNA de secuencia más larga, que introdujera una porción de la secuencia intrónica. De esta manera, como la secuencia alterada (secuencia consenso) no puede ser reconocida eficientemente por la maquinaria de *splicing*, en su lugar se busca una secuencia similar que puede estar hacia el extremo 3' o bien el 5'. Por tanto, de todo lo anteriormente expuesto se deduce que la forma truncada encontrada en el RNA de individuos con diferentes enfermedades autoinmunes así como también en individuos sanos, se debe a una alteración en el proceso de corte y unión; el espliceosoma no reconoce el dinucleótido variado, sino que reconoce en su lugar, una secuencia que se encuentra 15 pb corriente abajo, generando de esta manera una proteína con 5 aminoácidos menos (Phe<sub>65</sub>, Gln<sub>66</sub>, Thr<sub>67</sub>, Lys<sub>68</sub>, Arg<sub>69</sub>), concretamente los 5 primeros aminoácidos del exón 3.

Como el mRNA codificante para la forma truncada siempre se acompaña de una G en posición 260, característica del locus B, se confirmó que esta forma truncada sólo se deriva de la segunda copia no alélica altamente homóloga para el gen que codifica MIP-1 $\beta$ . Ello supone reconfirmar que el locus B es plenamente codificante, ya que se transcribe y puede procesarse de manera normal y alterada.

## **2. HIPÓTESIS**

Como ya se ha comentado previamente en la introducción, las quimiocinas no son más que citocinas quimiotácticas que intervienen como mediadores moleculares en los procesos de adhesión e inflamación de los tejidos. Dentro de la denominación quimiocina, se encuentran las  $\beta$ -quimiocinas, representadas entre otras por MIP-1 $\alpha$  (CCL3) y MIP-1 $\beta$  (CCL4), que ejercen su función sobre linfocitos y monocitos principalmente.

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que existe un segundo locus (locus B) para MIP-1 $\beta$  capaz de codificar una proteína diferente (con variaciones claras en su secuencia) a la proteína codificada por el locus A, forma que hasta ahora ha definido la estructura y la función de MIP-1 $\beta$ . Además de este hallazgo sobre el nuevo "locus B", se describió una mutación puntual (A/G) en la secuencia 3' del segundo intrón que genera un nuevo lugar aceptor alternativo (*splicing* alternativo) en el mRNA, provocando la deleción de 15 pb, y que se traduce posteriormente en una proteína con 5 aminoácidos menos (proteína truncada). La ausencia de estos 5 aa en la proteína truncada afecta la estructura canónica de la misma y posiblemente altera su función.

A partir de estas observaciones, se hipotetiza que las diferentes iso- y alo-formas de la quimiocina MIP-1 $\beta$  ejercen un efecto diferente sobre las células dianas. En este contexto, y dada la trascendencia fisiopatogénica del MIP-1 $\beta$  en la evolución de las distintas patologías (especialmente la infección por VIH), el polimorfismo descrito del locus B alteraría la evolución del cuadro patológico. En el caso del VIH, la función protectora de esta quimiocina se atenuaría por la forma truncada y generaría un aumento de la susceptibilidad, favoreciendo el establecimiento del virus en el organismo y la evolución de la enfermedad. Igualmente postulamos que la presencia de este polimorfismo alteraría la regulación génica normal y modificaría el nivel de expresión de esta proteína.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Definir poblacionalmente el polimorfismo del locus B de la quimiocina MIP-1 $\beta$  y evaluar la influencia que éste pueda presentar en distintas patologías, en especial la infección por el VIH, así como también determinar si existen diferencias significativas en la regulación de la expresión de este segundo locus.

### **3.2 Objetivos Específicos**

#### **3.2.1. Determinar la distribución genética del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ .**

- a) Desarrollar una metodología sencilla y confiable, que nos permita discriminar los dos alelos del locus B (alelo B del alelo b), para definir el polimorfismo en la población.
- b) Establecer la incidencia y distribución genética del polimorfismo del locus B en la población normal (individuos sanos).
- c) Establecer la incidencia del polimorfismo en diferentes poblaciones patológicas, y valorar las posibles diferencias que puedan existir entre éstas y la población normal.
- d) Valorar el polimorfismo del locus B en individuos infectados por el VIH, en relación a distintos parámetros, y determinar si éste ejerce alguna influencia en el desarrollo de la enfermedad.

#### **3.2.2. Establecer los patrones de regulación de la expresión del locus B respecto al locus A.**

- a) Diseñar un sistema que nos permita evaluar de forma cuantitativa la expresión diferencial de los loci de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ .
  - a.1) Diseñar un Estándar Interno que presente cierta homología con la secuencia de los genes en cuestión, permitiéndo controlar el proceso de amplificación y de digestión de los loci de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , para establecer una aproximación cuantitativa de cada una de las isoformas.

- a.2)** Determinar la metodología que mejor permita cuantificar de una manera rápida y precisa la expresión diferencial de los loci de ambas quimiocinas.
- b)** Definir como se regula la expresión de ambos loci de MIP-1 $\beta$ , así como también de las diferentes isoformas del locus B:
  - b.1)** Determinar cómo se regula la expresión de los loci de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  en la línea celular U-937.
  - b.2)** Estudiar los niveles de expresión de las diferentes isoformas de MIP-1 $\beta$  en 2 grupos celulares distintos (PBMCs y linfocitos T CD8+) procedentes de individuos sanos y de individuos VIH+.

## **4. SUJETOS Y METODOLOGÍA**

### **4.1. SUJETOS**

#### **4.1.1. Individuos Sanos**

Para determinar el polimorfismo del MIP-1 $\beta$  en la población sana, se evaluaron 200 individuos, representados por un grupo de donantes de órganos, procedentes del Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona y otro grupo representado por parte del personal del Servicio de Inmunología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Los criterios de selección que prevalecieron para elegir estos individuos como sanos, corresponden a la ausencia de enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes manifiestas en el momento de su inclusión, razones por las cuales, deben considerarse individuos sanos a efectos de este estudio.

#### **4.1.2. Pacientes**

##### **4.1.2.1. Pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune**

Dentro de este grupo, se utilizaron muestras procedente de pacientes afectos de la enfermedad de Graves Basedow, tiroiditis de Hashimoto y bocio multinodular. Los pacientes fueron diagnosticados en los departamentos de endocrinología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol y de la Residencia Vall d'Hebron. El diagnóstico clínico se realizó en base a las pruebas normales de rutina, tales como niveles en plasma de T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> libre y hormona estimulante del tiroides (TSH), determinados por radioinmunoensayo en el servicio de bioquímica. La presencia de anticuerpos anti-microsomal (peroxidasa tiroidea, TPO) y anti-tiroglobulina (tiroglobulina, Tg), se determinó por ELISA (Advanced Biological Products Inc., Mississauga, Ontario, Canadá). La presencia de anticuerpos anti-receptor de tirotropina (receptor de tirotropina, TSH-R) se determinó por un ensayo "thyrotropin-binding inhibitory immunoglobulin" (TBII) utilizando el kit RRA TRAK (Behring, Marburg, Alemania). Ambas determinaciones se realizaron en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Los diagnósticos se confirmaron por un examen histopatológico de las biopsias, en el departamento de anatomía patológica del mismo hospital.

##### **4.1.2.2. Pacientes Diabéticos**

Las muestras de DNA genómico que se utilizaron para analizar este grupo de pacientes, provenían de sangre periférica de pacientes con Diabetes Mellitus tipo I. Los pacientes fueron diagnosticados en los departamentos de endocrinología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Los parámetros que se tomaron en cuenta para realizar el diagnóstico clínico de estos pacientes fueron los siguientes: péptido C basal y post-estimulación con glucagón indetectable y/o clínica de cetoacidosis diabética.

#### **4.1.2.3. Pacientes con VIH**

Las muestras de sangre provenientes de los pacientes VIH+ fueron cedidas y valoradas previamente a nivel de múltiples parámetros biológicos por la Fundación IRSI-CAIXA.

### **4.2. METODOLOGÍA**

#### **4.2.1. Aislamiento Celular**

##### **4.2.1.1. Obtención de células mononucleadas de sangre periféricas (PBMCs)**

- Se extraen 20 ml de sangre total de cada uno de los pacientes en tubos Vacutainer de 10 ml y se agregan 100 µl de heparina por cada 10 ml de sangre.
- Para separar los PBMCs por gradiente de densidad, se reparte el Ficoll (Ficoll Hypaque Lymphoprep; Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) en cada uno de los tubos, y posteriormente se agrega la muestra (diluida 1:2 con PBS) suavemente sobre el Ficoll e inclinándolo ligeramente el tubo. La proporción Ficoll : muestra diluida es de 1:3.
- La muestra se centrifuga durante 30 min a 600 xg a T.A. Tras la centrifugación, las células mononucleadas quedan separadas, y se sitúan en la interfase, mientras que los eritrocitos y neutrófilos, se ubican en el fondo del tubo.

- La interfase se recupera por aspiración y esta fracción celular se transfiere a otro tubo, donde se lava con PBS.
- Centrifugar la muestra a 1.200 rpm durante 5 min a 4°C. Tras la centrifugación, se descarta el sobrenadante.
- Repetir nuevamente el lavado con PBS.
- Se descarta el sobrenadante, y el botón celular (pellet) obtenido se utiliza para extraer el DNA genómico o bien se resuspende en medio RPMI para realizar los estudios de estimulación posteriores.

#### **4.2.1.2. Aislamiento de células T CD8+**

Los linfocitos T CD8+ fueron separados por selección positiva, utilizando un sistema de bolas paramagnéticas (MACS MicroBeads, Milteny Biotech, CA, USA) asociadas a columnas magnéticas. Para ello se aplicó el siguiente protocolo:

- Una vez separados los PBMCs de sangre periférica, se procede a contar las células y a resuspenderlas en *buffer* (PBS suplementado con 0,5% BSA y 2 mM EDTA (pH=7,2)), agregando 80  $\mu$ l de *buffer* por cada  $10^7$  células totales.
- Se agregan 20  $\mu$ l de bolas paramagnéticas marcadas con Acs monoclonales anti-CD8 por cada  $10^7$  células totales.
- Se realiza una incubación a 4°C por 15 min. Durante la incubación, se agita ligeramente el tubo cada 5 min.
- Finalizada la incubación, se agregan de 10 a 20  $\mu$ l de *buffer* por cada 1  $\mu$ l de mezcla para lavar las células.
- Se centrifuga a 300 g durante 10 min y se descarta el sobrenadante.
- El pellet se resuspende en 500  $\mu$ l de *buffer* por cada  $10^8$  células totales.

Una vez marcadas las células magnéticamente se procede a separarlas. Para su aislamiento, se utiliza una columna de alto gradiente de separación magnética (MS Separation Columns, Milteny Biotec, CA, USA) que presenta una capa hidrofílica, lo cual facilita el proceso. Se sigue el siguiente protocolo:

- La columna se fija a un soporte magnético y se lava previamente con 500  $\mu$ l de *buffer*, el cual se deja correr libremente a través de la columna. Se descarta el eluído.
- Se procede a pasar la suspensión celular a través de la columna. Es importante que la mezcla sea bastante homogénea, evitando cualquier tipo de agregado o partícula con un tamaño superior a los 30  $\mu$ m y no pasar de una cantidad superior de  $2 \times 10^8$  células marcadas.
- Se lava la columna 3 veces con 500  $\mu$ l de *buffer*, descartando el eluído que corresponde a la fracción negativa.
- Para separar la fracción positiva retiramos la columna del soporte magnético (imán), se agrega 1 ml de *buffer* y se deja correr tranquilamente a través de la columna, hasta que transcurrido un tiempo (en el que la casi la totalidad del líquido haya pasado), se fuerza la elución de la última fracción con un émbolo.
- Resuspender el eluido obtenido en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica) suplementado con 10% FCS (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), L-glutamina 2mM (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), gentamicina 40  $\mu$ M (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) y Penicilina 100 UI/ml (Laboratorios Ern, Barcelona, España) en un volumen adecuado, hasta conseguir una concentración final de  $1 \times 10^6$  células / ml.

#### **4.2.2. Cultivo Celular**

El RPMI 1640 (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica) suplementado con 10% FCS (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), 2mM L-glutamina (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), 40  $\mu$ M Gentamicina (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) y 100 UI/ml Penicilina (Laboratorios Ern, Barcelona, España) fue utilizado como medio de cultivo estándar donde se cultivaron los PBMCs y linfocitos T CD8+, provenientes de individuos con VIH, individuos sanos utilizados como control y la línea mielomonocítica U-937. Todas las incubaciones y los procedimientos de cultivos se hicieron en incubadores a 37°C, en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> / 95% aire.

#### **4.2.2.1. Línea celular U-937**

Para el cultivo de la línea mielomonocítica U-937, obtenida de la ATCC (American Tissue Culture Collection), se utilizaron frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Costar, Nalge Nunc International, Dinamarca), creciendo las células en suspensión.

Para el estudio de la expresión del MIP-1 $\beta$  esta línea celular fue estimulada con diferentes inductores; Ionomicina (1 $\mu$ g/ml), LPS (0,1 $\mu$ g/ml) y PMA (0,1 $\mu$ g/ml) (Sigma, St. Louis, U.S.A.) a diferentes tiempos; 0, 3, 6 y 24 horas respectivamente. Debido a la inestabilidad intrínseca de los extremos UA 3' del mRNA de las quimiocinas, agregamos a los cultivos 10  $\mu$ g/ml de cicloheximida (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) para aumentar su estabilidad. La cicloheximida se introdujo 3 horas antes de recolectar el cultivo. Se hicieron cultivos no estimulados que actuaron como controles.

#### **4.2.2.2. PBMCs y células T CD8+**

Tanto los PBMCs aislados de sangre periférica como los linfocitos T CD8+ fueron cultivados en placas de cultivo (Costar de 18 pocillos). Para el estudio de la expresión de MIP-1 $\beta$ , las células fueron estimuladas en presencia de 1 $\mu$ g/ml de PHA y 10 ng/ml IL-2 recombinante humana durante 6 horas y 24 horas. Para mejorar la expresión del mRNA de las quimiocinas de interés, agregamos 10  $\mu$ g/ml de cicloheximida (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) para aumentar su estabilidad. La cicloheximida se introdujo 3 horas antes de recolectar el cultivo. Paralelamente se realizaron controles a las 0 horas y a las 24 horas, a los que no se les agregó ningún tipo de estímulo.

#### **4.2.3. Análisis por citometría de flujo (expresión del receptor CCR5)**

La técnica de citometría de flujo y la existencia de anticuerpos monoclonales hacen posible la identificación de determinadas moléculas en la superficie de las células. Esto se debe a la posibilidad que tienen los anticuerpos, de unirse de manera covalente a determinados fluorocromos, que al ser excitados por ciertas radiaciones, provocarán la emisión de diferentes partículas lumínicas que pueden ser medidas y procesadas a través del citómetro de flujo. De esta manera, el equipo será capaz de evaluar las características físicas y/o químicas de las células, agregados celulares o partículas biológicas, tales como inmunocomplejos, partículas virales, liposomas, organelos celulares, bacterias, hongos, cromosomas, etc. La medición de las diferentes propiedades de cada uno de estos elementos se lleva a cabo de manera individual, pudiendo discriminar cada una de las células que pasan a través del equipo y otorgando información específica de aquella célula o molécula que haya sido marcada.

Luego de cultivar las células (PBMCs y linfocitos T CD8+) durante 24 horas y en presencia de diferentes inductores, se marcaron las células con diferentes anticuerpos. El marcaje a menudo requirió combinar IFI con IFD siguiendo este protocolo:

- Se lava la suspensión celular 2 veces con PBS.
- Se añaden 100 µl de la suspensión celular a cada uno de los tubos.
- Se agregan los anticuerpos no marcados (CCR5, CD4 y CD8 ) diluidos con PBS y se incuban por 30 min.
- Se lavan las células con PBS y se centrifugan a 1.300 rpm por 5 min y se decanta el sobrenadante.
- Se agrega a cada tubo el anticuerpo *Goat anti-mouse* diluído 1/150 y se incuba por 30 min.
- Se agrega PBS hasta la mitad del tubo aproximadamente y se centrifuga a 1.300 rpm durante 5 min. Se descarta el sobrenadante.
- Se añaden 50 µl de *Normal Mouse Serum* (NMS) y se incuba por 10 min.
- *Se añaden los anticuerpos directamente marcados en los tubos correspondientes y se incuba por 15 min.*
- *Se lava con PBS, se centrifuga a 1.300 rpm durante 5 min y el sobrenadante se extrae con una pipeta.*

- Se añade solución de lisis hasta la mitad del tubo y se incuba durante 10 min para fijar.
- Se centrifuga a 1.300 rpm durante 5 min y el sobrenadante se aspira con pipeta.
- Se lava con PBS, centrifugando a 1.300 rpm durante 5 min y aspirando el sobrenadante con pipeta.
- Se añaden 400 µl de PBS a cada uno de los tubos y se pasa la muestra marcada por el citómetro de flujo.

La utilización de NMS posibilita la combinación de la IFI con la IFD (pasos en cursiva).

#### 4.2.4. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de sangre total, en el caso de los pacientes VIH+ e individuos control, y de PBMCs (pellet seco), en el caso de las muestras procedentes de pacientes con Graves Basedow, tiroiditis de Hashimoto, bocio multinodular y pacientes diabéticos.

Para realizar la extracción de gDNA a partir de sangre total, se siguió este protocolo:

- Se extraen 20 ml de sangre total en tubos vacutainer de 10 ml y se agregan 100 µl de heparina por cada 10 ml de sangre inicial.
- La muestra se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 min. Tras la centrifugación, se descarta el sobrenadante.
- El botón celular obtenido tras la centrifugación, se resuspende en un *buffer* de lisis frío (10 mM Tris HCl pH=7,5; 5Mm MgCl; Tx-100 0,5%; 0,32 M Sacarosa) previamente enfriado a 4°C. Se llena por completo el tubo, con la solución de lisis y se debe agitar levemente y en forma continua, hasta que se consiga la disolución completa del botón celular.
- La mezcla se incuba durante 10 min en hielo.
- Se centrifuga a 2.550-3.000 rpm durante 15 min y posteriormente se descarta el sobrenadante.
- Se resuspende nuevamente la muestra en un *buffer* de lisis frío, repitiendo el procedimiento anterior, con el fin de lograr un lisado celular completo.

- Repetir el lisado una o dos veces más hasta conseguir que el botón celular quede totalmente blanco. Una vez que el botón celular esté completamente blanco, se procede a la extracción del DNA genómico.
- Se resuspende el pellet en 2 ml de TEN 8 *buffer* (0,1 M NaCl; 10mM EDTA pH=8; 20 mM Tris pH=7,5-8) 100 µl SDS 20% y 10µl de proteinasa K (20 µg/µl) (Sigma).
- Se incuba la mezcla a 55-60°C por un período de 3 a 4 horas, hasta conseguir que la solución quede totalmente homogénea. La proteinasa K se preparó previamente disolviendo 20 U/mg de la enzima en 1 ml de *buffer* 10mM Tris pH= 7,8; 5mM EDTA y SDS al 20%.
- Para desproteínizar la muestra, se agrega 1 volumen de 3M Kac (Acetato potásico) y se agita fuertemente en sentido longitudinal durante 15 min.
- Se centrifuga a 2.500 rpm durante 15 min y el sobrenadante que se obtiene, se transfiere a un tubo limpio.
- Para precipitar el DNA, se agregan 2-2,5 volúmenes de etanol absoluto y posteriormente el tubo se mezcla por inmersión hasta que el DNA precipite completamente. La precipitación del gDNA, se puede evidenciar a través de la aparición de una especie de malla blanca en la solución.
- El gDNA precipitado se extrae y se transfiere a un tubo limpio. La malla generada se intenta pescar con una punta o bien centrifugando levemente el tubo, de manera que el gDNA se deposite en el fondo del tubo (a través de la decantación del sobrenadante, se puede obtener más fácilmente).
- Se gDNA se deja secar ligeramente (se puede observar a través de la pérdida de la refringencia) y luego se resuspende en 100 µl de TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA) por cada 10 ml de sangre inicial.
- Se deja incubar toda la noche en la nevera y una vez que se haya disuelto por completo, se puede conservar a -20 °C.
- Cuantificación DNA genómico

Para cuantificar el DNA genómico se diluyen 2 µl de DNA en 1.000 µl de H<sub>2</sub>O (factor de dilución 1:500) y se mide la densidad óptica (O.D.) a 260 nm y a 280 nm. La concentración es calculada de la siguiente manera:

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{O.D. a } 260 \text{ nm} \times 0,064) - (\text{O.D. a } 280 \text{ nm} \times 0,05) \times (\text{Factor de dilución})$$

#### **4.2.5.Métodos de Extracción de RNA**

En este trabajo se realizó la extracción de RNA de células en cultivo previamente estimuladas, con el fin de estudiar la expresión de MIP-1β a nivel del RNA mensajero. En el caso de la línea celular U-937, la extracción fue realizada mediante una ligera modificación del método descrito previamente por Chomczynsky. En el caso de los PBMCs y los linfocitos T CD8+ provenientes de pacientes con VIH, debido a que obtuvimos un número reducido de células, nos vimos en la necesidad de recurrir a un kit comercial que optimizara la extracción de RNA de dichas células.

##### **4.2.5.1. Método de Chomczynsky**

El método empleado para la extracción de RNA fue el descrito previamente por Chomczynsky, ligeramente modificado para adaptarlo a nuestro laboratorio. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- El botón celular seco proveniente de  $5 \cdot 10^6$  cels se homogeniza agregando 500 µl de solución de desnaturalización (4M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sodio; 0,1M 2-β mercaptoetanol; 0,5% N-lauroilsarcosina; 0,5% antifoam), 50 µl acetato de sodio 2M pH=4 y 500 µl de fenol saturado con agua pH=4,0. Se debe mezclar con vórtex después de la adición de cada uno de los reactivos.
- Las muestras se incuban en hielo durante 10 min.
- Se agregan 150 µl de una mezcla de cloroformo-isoamilalcohol en una proporción 49:1 y posteriormente se mezcla con vórtex.
- La muestra se incuba nuevamente en hielo durante 10 min.

- Se centrifuga la mezcla homogénea a 10.000 rpm a 4°C y durante 20 min, con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica.
- La fase acuosa se transfiere a un tubo limpio, se agrega 1 vol de isopropanol y se deja incubar a -70°C por 1 hora, para permitir que precipite el RNA.
- La muestra se centrifuga nuevamente tras la incubación, a 14.000 rpm y a 4°C durante 30 min. Se descarta el sobrenadante.
- El botón celular obtenido, se resuspende en 300 µl de solución de desnaturalización y 150 µl de fenol saturado en agua pH=4,0. Se mezcla con un vórtex y luego se agregan 150 µl de la mezcla de cloroformo-isoamilalcohol.
- La mezcla se incuba en hielo durante 10 min.
- Se centrifuga la muestra a 10.000 rpm a 4°C y durante 20 min. El sobrenadante se recupera y se transfiere a un tubo limpio.
- Se agrega al sobrenadante 1 vol de Kac 3 M, 2 vol de etanol absoluto y se mezclan en un vórtex.
- Se centrifuga a 14.000 rpm durante 30 min y a 4°C. El sobrenadante se descarta.
- El botón celular obtenido se lava 3 veces con etanol al 70%.
- Se seca bien el botón celular y se resuspende en 20 µl de agua con DEPC, que actúa inhibiendo las nucleasas (El agua DEPC se prepara de la siguiente manera: 1 litro de H<sub>2</sub>O destilada tratada 20 h con 1 ml dietilpirocarbonato a 0,005% a 37°C (Genaxis Botechnology, Saint-Cloud Cedex, Francia) y posteriormente se autoclava).

La concentración de las muestras de RNA se determina por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del RNA se calcula a partir de la relación que se establece entre los valores arrojados por las lecturas hechas a 260 nm y a 280 nm. Este valor debe encontrarse entre 1,8 y 2,0 para que podamos decir que la extracción ha sido eficiente. La integridad se puede evaluar mediante un gel de agarosa.

#### **4.2.5.2. Extracción de RNA (Kit RNAqueous<sup>TM</sup>-4PCR de Ambion)**

Para la extracción de RNA por el Kit comercial, aplicado principalmente para la evaluación de las muestras estimuladas, se siguió este protocolo:

- El botón celular ( $1 \times 10^6$  células) se lava previamente con PBS (se agrega PBS hasta el final del tubo y se centrifuga a 1.800 rpm durante 6 min; el sobrenadante se descarta).
- Se agregan 500  $\mu$ l de la *Lysis/Binding solution* (contiene Tiocianato de Guanidina), que ocasiona el lisado de las células.
- Se realiza un vórtex vigoroso, en el que se consigue romper la membrana celular e inactivar las ribonucleasas celulares.
- Se agrega un volumen equivalente de etanol al 64% y se mezcla con un vórtex suavemente.
- La mezcla homogénea, se introduce en una columna a base de silicio, la cual tiene la facultad de unir y retener de forma selectiva las fracciones del RNA.
- Se centrifuga la columna por 1 min a 14.000 rpm aproximadamente y se descarta el líquido eluido.
- Se agregan 700  $\mu$ l de Wash Solution #1 a la columna y se dejan correr a través de ella, con el fin de eliminar los residuos de DNA, proteínas y otros contaminantes.
- Se realiza otra centrifugación de 1 min a 14.000 rpm y se descarta nuevamente el eluido.
- Se realizan dos lavados más agregando 500  $\mu$ l de *Wash Solution 2/3* (contiene Etanol). Después de la adición del reactivo se centrifuga nuevamente a 14.000 rpm durante 1 min. Se descarta cada vez el sobrenadante.
- Se procede a eluir la muestra en 2 pasos consecutivos: la primera vez se eluye agregando 40-60  $\mu$ l de la *Elution Solution* (0,1 mM EDTA) a 95-100°C, se centrifuga a 14.000 rpm durante 30 seg. La segunda elución se realiza agregando un volumen menor, entre 10 y 60  $\mu$ l (de la misma solución a 95°C aproximadamente). Este segundo paso se realiza con el fin de asegurar una elución exitosa. Luego se centrifuga a 14.000 rpm por 30 seg aproximadamente.
- El RNA eluido se recoge en un tubo libre de RNAsas.

#### 4.2.6. Tratamiento con DNAasa-I de las muestras de RNA

Hemos utilizado dos aproximaciones para eliminar los residuos de DNA genómico, que pudieron haber sido extraídos junto con el RNA.

**A) Método de Chomczynsky:** Las muestras extraídas por este método fueron tratadas siguiendo este protocolo:

- Se agregan 2 $\mu$ l de *buffer* (40mM Tris-HCl pH=7,5; 6mM MgCl<sub>2</sub>), 2 $\mu$ l DNAasaI (Amersham Pharmacia Biotech; Barcelona, España), X  $\mu$ l de muestra de RNA (1  $\mu$ g) y H<sub>2</sub>O destilada hasta completar un volúmen final de 20  $\mu$ l.
- La mezcla se incuba a 37°C durante 30 min. Durante este tiempo, la enzima actuará, eliminando aquellos residuos de gDNA que puedan estar presentes en la muestra.
- Se cuantifica nuevamente el RNA a una longitud de onda de 260 nm y se comprueba nuevamente su integridad en un gel de agarosa.

**B) Kit comercial:** Debido a que el procedimiento de extracción de RNA por el kit, no garantiza la eliminación completa de DNA, procedimos a realizar el tratamiento con DNasaI de la siguiente manera:

- Se agrega 0,1 vol de *Buffer DNasaI 10X* y 1  $\mu$ l de DNasaI al RNA.
- Se incuba la mezcla durante 15-30 min a 37°C. En este paso, se asegura la eliminación de cualquier contaminante de DNA presente en la muestra.
- Se agrega 0,1 vol de *Dnase Inactivation Reagent*, (con el fin de inactivar cualquier tipo de DNasas) y se realiza un vórtex.
- Se deja incubando durante 2 min a T.A.
- La muestra se centrifuga a 10.000 x g durante 1 min y el sobrenadante obtenido se transfiere a un tubo limpio. El RNA se puede guardar a -20°C.

#### 4.2.7. Ajuste de la concentración de las muestras de RNA por precipitación.

También hemos utilizado dos aproximaciones para aumentar la concentración de RNA/ $\mu$ l.

**A) Método de Chomczynsky:** En la mayoría de las muestras extraídas por este método, el RNA se precipita de la siguiente manera:

- Se agrega 0,1 vol de KAc 3M y se agita fuertemente.
- Se añaden 2 vol de etanol absoluto repitiendo nuevamente la agitación.
- Se adiciona 1  $\mu$ l de glucógeno a 20 mg/ml.
- La muestra se incuba durante 1 hora a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Se centrifuga la mezcla a 14.000 rpm durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- El botón celular obtenido se lava con etanol al 70% y posteriormente se diluye en agua de DEPC. Una vez que ha sido bien resuspendido en agua de DEPC, se puede conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**B) Kit Comercial:** Los RNA extraídos a partir de este método, fueron precipitados con el fin de optimizar la cantidad de muestra, siguiendo este protocolo:

- Se agrega a la muestra 0,1 vol de Acetato de Amonio 5M y 0,01 - 0,02 vol de *Linear Acrylamide*.
- Se mezcla suavemente con un vórtex hasta conseguir que la muestra quede homogénea.
- Se añaden de 2-2,5 vol de etanol 100% y luego se agita bien.
- Se incuba a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 25 min como mínimo. En este paso el RNA precipita. El tiempo de incubación, si se desea, se puede alargar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- La muestra se centrifuga a 14.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se descarta.
- El *botón celular* obtenido se resuspende en 15-20  $\mu$ l de la solución de elución. La muestra una vez resuspendida adecuadamente se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 4.2.8. Retrotranscripción

Para realizar la retrotranscripción con la MMLV, se siguen estos pasos:

- Se desnatura previamente el RNA (1  $\mu$ g diluido en agua hasta 11,8  $\mu$ l) incubándolo a 68°C durante 5 min.
- Inmediatamente después, las muestras se colocan en hielo y se incuban durante 5 min.
- La reacción de retrotranscripción se realiza según las condiciones indicadas por el proveedor de la MMLV. A la muestra de RNA previamente desnaturada, se le agregan los siguientes reactivos:

4  $\mu$ l de *Buffer* de MMLV (5X)  
1  $\mu$ l de dNTPS (10 mM)  
1  $\mu$ l DTT (0,1 M)  
2  $\mu$ l Oligo-dT24 (50  $\mu$ M)  
0,5  $\mu$ l RNAsin (40U/ $\mu$ l)  
0,5  $\mu$ l MMLV (200U/ $\mu$ l)

- La reacción se incuba a 42°C durante 60 min.
- La reacción se inactiva calentando las muestras hasta 99°C durante 5 min y reenfriándolas a 4°C durante 5 min más.
- Los 20  $\mu$ l de cDNA obtenidos se diluyen 4 veces en H<sub>2</sub>O DEPC.
- Se utilizan 2  $\mu$ l del cDNA diluido por cada 10  $\mu$ l de reacción de la PCR.

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Promega (Madison, WI, USA)

#### 4.2.9. PCR-Genérica

Para el estudio del polimorfismo del locus B de la quimiocina MIP-1 $\beta$ , se utilizó DNA genómico y se realizaron principalmente dos PCRs distintas.

##### 4.2.9.1. PCR Específica:

Esta PCR tiene como objetivo principal, la amplificación de la variante alélica del locus B que presenta un cambio de base A/G, en la secuencia aceptora del segundo intrón, lo cual provoca que se genere un *splicing* diferencial alternativo y la pérdida de 15 pb, generando una proteína (truncada) con 5 aa menos. Para poder detectar esta mutación, se han utilizado cebadores específicos, 4ó1 *sense* y IA1 *antisense* (Tabla M.1),

capaces de reconocer este cambio nucleotídico (G en lugar de una A). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes :

- Se agregan los siguientes reactivos:

1  $\mu$ l de *buffer* de PCR (10X, con 15 mM MgCl<sub>2</sub>)

1  $\mu$ l de mix dNTPs (2 mM)

0,5  $\mu$ l de cebador *sense* (4ó1) (10  $\mu$ M)

0,5  $\mu$ l cebador *antisense* (IA1) (10  $\mu$ M)

2  $\mu$ l de gDNA (100 ng)

3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O

- Esta mezcla se cubre con 20  $\mu$ l de aceite mineral (Mineral Oil, Sigma, Madrid, España) para evitar su evaporación.
- Las muestras se someten a los siguientes cambios de temperatura controlados por el termociclador (Mini Cyclor de MJ. Research)
- El proceso comienza con un "inicio en caliente" (*Hot Start*) a 80°C, temperatura a la cual se agregan 500 mU de la DNA-Polimerasa DynaZyme II (Finnzymes OY-Finlandia) diluidas en 2  $\mu$ l de agua.
- Posteriormente se aplica el siguiente programa de ciclación:
  - 15 seg a 95°C (Desnaturalización del DNA)
  - 15 seg a 64°C (Hibridación de los cebadores)
  - 15 seg a 72°C (Extensión de los cebadores)Este proceso se repite por 35 ciclos
- 5 min a 72°C (Extensión final)

Al finalizar este proceso de ampificación, se obtiene un amplímero de 114 pb, en los genómicos con la variante b.

#### 4.2.9.2. PCR Genérica

El objetivo de esta PCR es amplificar un segmento del locus B de la quimiocina MIP-1 $\beta$ , que incluya la zona de la mutación, sea cual sea el alelo, lo cual nos permitirá posteriormente, hibridar el amplímero obtenido con sondas específicas tanto para el alelo B, como para el alelo b. Los cebadores utilizados, fueron el 4ó1 sense y el 2299 antisense. El amplímero que se genera a partir de esta amplificación, presenta un tamaño de 349 pb.

Las condiciones de amplificación fueron iguales a las descritas anteriormente para la PCR específica y el programa que se utilizó para realizar la amplificación fue el siguiente:

30 seg a 95°C (Desnaturalización del DNA)  
30 seg a 59°C (Hibridación de los cebadores)  
30 seg a 72°C (Extensión de los cebadores)  
Este proceso se repite por 35 ciclos  
5 min a 72°C (Extensión Final)

Las secuencias de los cebadores utilizados tanto para la PCR específica como para la genérica, fueron validados en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Ashaab, 1998)(Tabla M.1).

#### **4.2.10. RT-PCR**

##### **4.2.10.1. Normalización del cDNA**

Para valorar el estado de las muestras de post-retrotranscripción (cDNAs) y normalizar los resultados a un parámetro común, todas ellas fueron amplificadas con cebadores específicos (Oligo Etc, Wilsonville, OR, USA) para el gen de la enzima de expresión constitutiva GAPDH (glutaraldehído-fosfato-deshidrogenasa). Los cebadores utilizados (GAPDH *Sense* y GAPDH *Antisense*) han sido ampliamente estudiados en nuestro laboratorio (Tabla M.1). Los reactivos y las concentraciones que se utilizan para realizar esta amplificación son los mismos que se han comentado previamente. Sin embargo el programa que se sigue para la amplificación de las muestras es el siguiente:

30 seg a 94°C (Desnaturalización del DNA)  
30 seg a 63°C (Hibridación de los cebadores)  
30 seg a 72°C (Extensión de los cebadores)  
Repetido por 25 ciclos  
5 min a 72°C (Extensión final)

<b>Tabla M.1: Cebadores y Sondas</b>			
<b>Cebadores</b>	<b>Sentido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Nombre</b>
<b>GAPDH</b>	Sense	5' TCTTCTTTTGCCTCGCCAG 3'	GAPDHs
	Antisense	5' GGGGGCAGAGATGATGACC 3'	GAPDHas
<b>Mip-1<math>\beta</math></b>	Sense	5' GCAGAGGAAGATGCCTACCAC 3'	461
<b>Genéricos PCR</b>	Antisense	5' AAATAATGGAAATGACACCTAATAC 3'	2299
<b>Mip-1<math>\beta</math></b>		5' TTGGTTTGGAAATCCGTAGAA 3'	Alelo b
<b>Genéricos Sonda</b>		5' TTGGTTTGGAAATCTGTAGAA 3'	Alelo B
<b>Mip-1<math>\beta</math> específico alelo polimórfico</b>	Sense	5' GCAGAGGAAGATGCCTACCAC 3'	461
	Antisense	5' CGGAGAAAACCAAACCTTAGG 3'	IA1
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Sense	5' TTCGTCACCTGCTCAGAAT 3'	$\alpha$ -sense
<b>cDNA</b>	antisense	5' GAAGAGGTAGCTGTGGAGGTCAC 3'	$\alpha$ -antisense
<b>MIP-1 <math>\beta</math></b>	Sense	5' AAATAATGGAAATGACACCTAATAC 3'	1412
<b>cDNA</b>	Antisense	5' AAATAATGGAAATGACACCTAATAC 3'	2299
<b>Estándar Interno</b>	Sense	5'CGGGATCCCGCAACTTTGTGGTAGATTACTATTTCCGT CACCTGCTCAGAATTGGAGATGGGTGGGAGTGT 3'	IE1
	Antisense	5'CCAATGCATAAATAATGGAAATGACACCTAATACGAAGA GGTAGCTGTGGAGGTCACAGGGCTTTATTCCAT 3'	IE2
<b>CCR5</b>	Sense	5' TTCATTACCTGCAGCTCTC 3'	CCR5s
	Antisense	5' GACCAGCCCCAAGATGACTATC 3'	CCR5as
<b>SDF-1</b>	Sense	5' TGGGAGGCTCACCCCTT 3'	SDF-1s
	Antisense	5' AGCTTTGGTCTGAAGATCC 3'	SDF-1as

**Tabla M.1:** Cebadores utilizados para las amplificaciones de las muestras

Para evaluar la amplificación de GAPDH, se realiza una electroforesis con 5  $\mu$ l del amplímero en gel de agarosa al 2% (Estándar media EEO, Ecogen, Barcelona, España) y comparamos la intensidad de los amplímeros de las diferentes muestras de cDNA. Aquellas señales de GAPDH que no sean equivalentes deberán reajustarse para obtener concentraciones similares del cDNA retrotranscrito.

#### 4.2.10.2. PCR Semicuantitativa

Debido a la elevada homología que existe entre los locus A y B de las Quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  a nivel de la secuencia nucleotídica, optamos por evaluar los niveles de expresión de cada uno de los loci a través del estudio del mRNA mediante una RT-PCR competitiva semicuantitativa.

Una vez retrotranscritas las muestras y normalizadas para GAPDH se procede a coamplificar el cDNA de ambas quimiocinas (MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ) con el Estándar Interno en el mismo tubo de reacción.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes :

- Se agregan los siguientes reactivos:
  - 1  $\mu$ l de *buffer* de PCR (10X 15 mM con MgCl<sub>2</sub>)
  - 1  $\mu$ l de mix dNTPs (2 mM)
  - 0,5  $\mu$ l de cebador *sense* ( $\alpha$  ó  $\beta$ ) (10  $\mu$ M)
  - 0,5  $\mu$ l cebador *antisense* ( $\alpha$  ó  $\beta$ ) (10  $\mu$ M)
  - 2  $\mu$ l de cDNA (MIP-1  $\alpha$  ó MIP-1 $\beta$ )
  - 2  $\mu$ l de Estándar Interno recombinante de concentración conocida.
  - 1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O
- Esta mezcla se cubre con 20  $\mu$ l de aceite mineral (Mineral Oil, Sigma, Madrid, España) para evitar su evaporación.
- Las muestras se someten a los siguientes cambios de temperatura controlados por el termociclador (Mini Cyclor de MJ. Research).
- El proceso inicia con un período en caliente (*Hot Start*) a 80°C, temperatura a la cual se agregan 500 mU de la DNA-Polimerasa DynaZyme II (Finnzymes OY-Finlandia) diluidas en 2  $\mu$ l de agua.
- Posteriormente se aplica el siguiente programa de ciclación:
  - 30 seg a 95°C (Desnaturalización del DNA)
  - 30 seg a 59°C (Hibridación de los cebadores)
  - 30 seg a 72°C (Extensión de los cebadores)Este proceso se repite por 35 ciclos
- 5 min. a 72°C (Extensión final)

La metodología empleada para discriminar los diferentes loci, se fundamenta en las variaciones de las secuencias nucleotídicas que presenten los productos amplificados de cada uno de ellos a la hora de ser sometidos a una digestión con la endonucleasa MspI. MspI es una enzima de restricción que reconoce la secuencia CCGG que en el caso de MIP-1 $\alpha$  se encuentra 3 veces en el producto amplificado del locus A y una sola vez en el locus B; mientras que en el caso de MIP-1 $\beta$  se encuentra sólo una vez en la secuencia amplificada del locus A y ninguna en el locus B. De esta

manera, al digerir con la enzima, se generarán productos amplificados de diferente tamaño que se podrán diferenciar fácilmente a través de una electroferesis en gel de agarosa.

- ***Digestión con MspI:***

Una vez obtenidos los amplímeros de la PCR semicuantitativa, se someten a una digestión con 10U de la enzima de restricción MspI a 37°C y durante 1 h, en *buffer* (Y<sup>+</sup>/Tango) (Fermentas; Vilnius, Lithuania). Una vez finalizada la digestión, para poder evaluar los diferentes fragmentos generados por ambas quimiocinas y el Estándar Interno, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. Los fragmentos se han separado en función del peso molecular y pueden ser perfectamente diferenciados.

- ***Cuantificación:***

Para cuantificar las distintas bandas electroforéticas, se realiza una densitometría de cada una de ellas, en la cual se determina la intensidad del fragmento por mm<sup>2</sup> de superficie. Esta densitometría, nos permitirá saber la proporción de locus A con respecto al locus B (a nivel relativo) como las diferentes cantidades en que se expresa cada uno de ellos, con respecto al EI precuantificado (a nivel absoluto). Por otro lado, valdría la pena mencionar aquí, que el EI además de controlar la amplificación del cDNA de ambas quimiocinas, permite controlar el nivel de digestión a través de la relación que se establece entre el EI digerido sobre el EI no digerido (porcentaje de digestión), lo cual supone otro parámetro básico y de gran precisión a la hora de valorar de forma cuantitativa las diferencias en la expresión de ambos loci. Este aspecto es fundamental especialmente para la evaluación de MIP-1β puesto que el locus B, al no presentar una diana de restricción para MspI, puede sobre valorarse con la fracción no digerida del locus A (las digestiones parciales son habituales). Por lo tanto, conocer el grado de digestión del EI permite ponderar las cuantificaciones reales de las quimiocinas de interés.

#### 4.2.11. PCR a Tiempo Real

Con la finalidad de evaluar si las cantidades de amplímero producido por la PCR del Estándar Interno era equiparables con las que se producen en la amplificación de la quimiocina en estudio, decidimos emplear una aproximación basada en la metodología de PCR a tiempo real (*Real Time PCR* o *rt-PCR*). Esta metodología consiste básicamente en la monitorización activa durante todo el proceso de amplificación, lo cual nos permite maximizar la cantidad de información que puede ser obtenida a partir de una simple reacción de PCR. La monitorización de la *rt-PCR* se llevó a cabo utilizando el fluorocromo intercalante SYBR GreenI (Roche; Mannheim, Germany) con el equipo LightCycler® (Roche; Mannheim, Germany). Este fluorocromo actúa en el proceso de la siguiente manera: En el ciclo inicial de la reacción, se aumenta la temperatura provocando la desnaturalización de la muestra, con lo cual, la doble cadena de DNA se separa y debido a que el SYBR GreenI no es capaz de unirse a la cadena sencilla del DNA, la señal de fluorescencia se mantiene baja. Al disminuir la temperatura y producirse el *annealing*, los cebadores hibridan con la muestra, generándose pequeños fragmentos de DNA de doble cadena a los cuales se une el SYBR GreenI. En este momento, la cantidad de fluorescencia comienza a aumentar. Posteriormente se genera un ascenso de temperatura, que se corresponde con la elongación del amplímero. En esta fase se sigue acumulando la cantidad de SYBR GreenI, de manera que cuando se completa la doble cadena de DNA, obtendremos la máxima cantidad de fluorescencia. Esta fluorescencia es medida al final de la fase del período de elongación a 530 nm y el aumento de la cantidad del producto generado a través de la PCR puede ser monitoreado en cada ciclo. Además de esto, otra de las ventajas con las que cuenta este sistema es la capacidad que tiene de confirmar el producto que ha sido amplificado una vez terminada la reacción, a través de la curva de *melting*. Cada producto de DNA de doble cadena generado, tiene su propia temperatura de *melting*, la cual es específica y característica de cada producto y que se define, como la temperatura a la cual el 50% del DNA pasa a ser de cadena sencilla, mientras que el 50% restante permanece de doble cadena. En este sistema,

la curva de *melting* se realiza al final de la PCR y de la siguiente manera: una vez terminado el proceso de amplificación, la temperatura comienza a aumentar poco a poco a intervalos de 0,2°C/seg, mientras que la intensidad de fluorescencia es medida en cada uno de los tubos de manera independiente. A medida que aumenta la temperatura, el DNA de doble cadena comienza a desnaturalizarse, las hebras se separan y el SYBR GreenI se libera; lo cual provoca un descenso en los niveles de fluorescencia. Este dato es realmente importante tanto para confirmar la identidad del producto generado como para diferenciar los productos de PCR no específicos generados, tales como dímeros de cebadores.

En nuestro estudio, además de evaluar que los productos generados (MIP-1 $\beta$  vs EI) fueran equiparables, en lo que al proceso de amplificación se refiere, quisimos cuantificar la cantidad de transcrito producido por cada uno de ellos. Para esto, utilizamos diluciones seriadas (estándares) tanto de amplímeros precuantificados (de los loci en estudio), como del Estándar Interno. A partir de estos estándares amplificados se realiza una curva, con la cual se puede cuantificar la cantidad de mRNA de la muestra problema.

La reacción de amplificación se lleva a cabo en un tubo capilar (especial para este sistema) y el ensayo se lleva a cabo tras la adición de los siguientes reactivos:

- 1  $\mu$ l de la mezcla de reactivos de rt-PCR 10X (Taq DNA polymerase, reaction *buffer* dNTP mix [con dUTP en lugar de dTTP], SYBR Green I dye y 10 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 1,2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25mM (concentración final 4 mM)
- 0,5  $\mu$ l de cebador *sense* ( $\alpha$  ó  $\beta$ ) (10  $\mu$ M)
- 0,5  $\mu$ l cebador *antisense* ( $\alpha$  ó  $\beta$ ) (10  $\mu$ M)
- 3  $\mu$ l de cDNA de la muestra problema
- 4,8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

Las amplificaciones se hicieron con el siguiente programa:

- 30 seg a 95°C (Desnaturalización del DNA)
- 30 seg a 59°C (Anillamiento de los cebadores)
- 30 seg a 72°C (Extensión de los cebadores)

Este proceso se repite por 35 ciclos

- 5 min a 72°C (Extensión final)

Las lecturas de fluorescencia se realizaron a 72°C en cada ciclo y la evaluación de la temperatura de fusión de los productos amplificados durante un período adicional de desnaturalización entre 45°C y 95°C.

#### **4.2.12. Hibridación**

La especificidad de los productos obtenidos a partir de la PCR genérica (de genómico) se confirmó por hibridación. La hibridación de las membranas [Hybond-N + nylon (Amersham)] se hizo por duplicado a partir de amplímeros de gDNA utilizando dos sondas diferentes, una que reconoce de forma específica el polimorfismo, mientras que la otra no. Para realizar esta hibridación, se siguió este protocolo:

##### **Fijación del DNA a la membrana:**

- Predilución de la muestra: Se colocan 200 µl de *buffer* Dot Blott (10mM EDTA pH=8, 1,5 M PBS) en cada uno de los pocillos de una placa de ELISA. Luego se agregan 2 µl de la muestra amplificada en cada pocillo (por duplicado). La muestra queda diluida 100 veces.
- Se monta el aparato de Dot Blott utilizando 3 papeles Wathmann y colocando encima la membrana de nylon.
- Se agregan 200 µl de *buffer* Dot Blott en cada uno de los agujeros del aparato para comprobar que esté bien ajustado y que no pierde líquido. Activar la bomba de vacío.
- Se colocan los 200 µl de la muestra (previamente diluida y por duplicado) en el aparato de Dot Blott y se deja incubar durante 30 min.
- Se activa la bomba de vacío y se mantiene encendida hasta que el líquido se aspira por completo.
- La membrana se coloca en solución de desnaturalización (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl) y se agita durante 5 min.
- La muestra desnaturalizada se coloca en una solución de neutralización (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris pH=7,2; 0,5 M EDTA pH=8) durante 1 min y en agitación.

- El DNA se fija a la membrana en el UV-Stratalinker (Stratagene) durante 1 min a 320 nm.

**Marcaje de la sonda:**

- Se agrega 1 µl de sonda (10-15 µM) a 9 µl de H<sub>2</sub>O.
- Se desnaturaliza a 70°C por 3 min y posteriormente se coloca en hielo.
- Se agregan los siguientes reactivos:
  - 1,5 µl de *buffer* 10X "T<sub>4</sub> Polinucleótido Kinase"
  - 10U/µl de "T<sub>4</sub> Polinucleótido Kinase"
  - [γ<sup>32</sup>P] ATP 250 µC/µl.
- La reacción se incuba a 37°C durante 30 min.
- Se agregan 35 µl de 10 mM EDTA pH=8, para inactivar la T<sub>4</sub> Polinucleótido Kinase.
- La sonda se purifica del isótopo libre a través de unas columnas (MicroSpin™ G-25 Columnas de Amersham) por medio de una centrifugación.

**Pre-Hibridación:**

- La membrana se introduce en un tubo para horno de hibridación y se colocan 25 ml de solución de pre-hibridación (PBS 2X; 1% Bloq. Reagent; 0,1% Sarcosil; 0,2% SDS).
- Se incuba a la temperatura de hibridación en un horno durante 8 horas y en movimiento giratorio constante.

**Hibridación:**

- Se añaden 0,5-1x10<sup>6</sup> cpm/ml de sonda marcada radiactivamente a la solución de pre-hibridación.
- Se deja incubar toda la noche a la temperatura de hibridación en un horno y en movimiento giratorio constante.

La temperatura de hibridación se calculó de la siguiente manera:

$$T_h = T_m \text{ de la sonda} - 10^\circ\text{C}$$

$$T_m = 72,8 + 0,41 (\%G+C) - 675/\text{Longitud de la sonda}$$

### **Lavados:**

- El líquido de hibridación con la sonda, se elimina como residuo radiactivo.
- Se realizan dos lavados con PBS 2X durante 5 min y a temperatura ambiente.
- Se hacen dos lavados astringentes utilizando 2X SSC + SDS 1% durante 30 min y a una temperatura que se ajusta según las características de cada sonda (en general 60°C para sondas de 20 pb y 63°C para sondas de 22 pb). Los lavados se realizan para eliminar el exceso de sonda presente en la membrana.

### **Revelado:**

- La membrana se expone y se deja contactando toda la noche junto a la pantalla FX Imaging Screen-K, 20x25 cm de Bio-Rad o Film X-Kodak.
- La detección de la señal radiactiva se realiza escaneando la pantalla a través del sistema Phosphor Imager (Bio-Rad) y posteriormente se analiza con el software de análisis molecular (Bio-Rad).

#### **4.2.13. Diseño de un Estándar Interno**

El estándar interno nace de la necesidad de crear un elemento o herramienta, que nos permita valorar de forma semi-cuantitativa los niveles de expresión a nivel del mRNA de los loci A y B de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . Para ello, este sistema debe ser capaz de controlar tanto el proceso de amplificación como de digestión (a través de la enzima MspI) de los transcritos obtenidos

Para generar el Estándar Interno (EI) se utilizó una pequeña región del gen de la insulina (zona 3' no codificante), ya que presenta un tamaño parecido (339 pb) al de los amplímeros en estudio, MIP-1 $\alpha$  (404pb) y MIP-1 $\beta$  (315pb). Así mismo, esta región de la insulina presenta otra característica en común y de gran importancia, y es que su secuencia

contiene la diana de restricción capaz de reconocer la endonucleasa MspI (CCGG).

Los cebadores utilizados para amplificar este fragmento, se diseñaron de forma específica a partir de los cebadores ILJ3 e ILJ2, utilizados para obtener el fragmento del gen de la insulina. Estos nuevos cebadores, serán unos cebadores híbridos (IEI1 e IEI2) a los cuales se les mantiene en 3' las secuencias de ILJ3 e ILJ2, y se les yuxtapone de forma consecutiva en sus extremos 5' las secuencias de los cebadores para MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (para los transcritos de los correspondientes locus A y B). Por otro lado, para facilitar su clonación y manipulación se introdujeron también las secuencias diana de las enzimas de restricción BamHI y NsiI y dos o tres bases en el extremo 5' para que asegurasen una buena eficiencia en la digestión. De esta manera, IEI1 es el oligonucleótido resultante de combinar las secuencias de BamHI +  $\beta$ -Sense +  $\alpha$ -Sense + ILJ3, mientras que IEI2 presenta las secuencias NsiI +  $\beta$ -Antisense +  $\alpha$ -Antisense + ILJ2 (según dirección 5'-3' convencional). En la base del esquema que se presenta en la Figura R.6 se detallan las secuencias concretas de IEI1 e IEI2.

### **Clonación**

Para realizar la clonación del inserto, se tiene que amplificar previamente la secuencia que se desea clonar. Para ello se tiene que realizar una PCR con los cebadores específicos para él (ILJ2 sense e ILJ3 antisense), bajo las mismas condiciones de reacción que fueron descritas anteriormente. Para el proceso de amplificación, se utilizó el termociclador, modelo Mini Cyler y se siguió este programa:

- 30 seg a 95°C (Desnaturalización del DNA)
- 30 seg a 65°C (Anillamiento de los cebadores)
- 30 seg a 72°C (Extensión de los cebadores)
- Este proceso se repite por 35 ciclos
- 7 min a 72°C (Extensión final)

Al finalizar este proceso de amplificación, se obtiene un amplímero de 340 pb.

### **Elución del fragmento amplificado**

Una vez amplificado el fragmento de interés, se procede a purificarlo utilizando el kit de purificación de bandas GFX™ PCR DNA (Amersham Pharmacia Biotech) obedeciendo al siguiente protocolo:

- Se realiza una electroforesis en gel de agarosa, con 1 g de *low melting* Nusieve-GTG y 1 g de Agarose Estándar Media EEO (Ecogen, Madrid) en 100 ml de TBE *buffer* 0,5X.
- Se observan los amplímeros de diferentes tamaños en un transiluminador de luz UV.
- Se corta la banda correspondiente al producto amplificado de interés.
- Se pesa un tubo eppendorf vacío.
- El trozo del gel que contiene la banda de interés, se introduce en el eppendorf que ha sido pesado previamente y se pesa de nuevo para determinar el peso neto del trozo de gel.
- Se añaden 10 µl de *Capture Buffer* (Solución que contiene acetato y *chaotrope*, un silice que une DNA) por cada 10 mg de gel de agarosa.
- Se incuba a 60°C durante 5-15 min. Se hacen un par de vórtex durante el período de incubación para facilitar la disolución completa de la agarosa.
- Se coloca la solución en la columna GFX (la cual contiene una matriz de fibra de vidrio).
- Se incuba 1 min a temperatura ambiente.
- Se centrifuga la columna durante 30 seg a 14.000 rpm y se descarta el eluido.
- Se agregan 500 µl de *Wash Buffer* (10 mM Tris-HCl pH=8; 1 mM EDTA, 80% etanol) a la columna.
- Se centrifuga por 30 seg a 14.000 rpm y se descarta nuevamente el eluido.
- Se añaden 30-50 µl de agua autoclavada.
- Se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 min. El eluido obtenido (muestra purificada) se conserva a -20°C.

### **Cuantificación del fragmento eluido**

Posteriormente, se debe cuantificar la cantidad de amplímero que ha sido purificada. Para calcular la concentración de este fragmento, empleamos el método de cuantificación en gel de agarosa, obedeciendo el siguiente protocolo:

- Se prepara un gel de agarosa al 2%.
- Se carga un volumen conocido de la muestra problema en el gel y un marcador de DNA de diferentes diluciones y de concentración conocida (Phi X174/RsaI).
- La intensidad de la banda de la muestra problema de DNA se compara visualmente con la intensidad de la banda del marcador, que corresponda a un tamaño equivalente. Debido a que la concentración del marcador es conocida, podremos establecer una relación entre ellas y calcular por comparación la concentración del fragmento de interés. Como la cantidad del amplímero para la ligación, debe ser equimolar a la del vector y en total unos 10 ng de DNA (vector + amplímero), en este paso conviene calcular cuanto amplímero hay que tratar.

### **Fosforilación**

Una vez conocida la concentración del amplímero, se procede a fosforilar el fragmento con PNK (polinucleotidil kinasa). Antes de comentar el protocolo, es importante tener en cuenta que el volumen de la reacción es variable según la concentración del fragmento amplificado que se haya obtenido. El protocolo que se siguió para fosforilar el amplímero fue el siguiente:

- Se agregan los siguientes reactivos a los Xµl de muestra:

*Buffer* ligasa NEB 10X

dNTPs 0,5mM a 10X

T<sub>4</sub> DNA pol 3u/µl

PNK 10u/µl

- Se incuba a T.A por 15 min.

- Se incuba a 37°C por 15 min (esta segunda incubación se hace a continuación de la anterior)

### **Inactivación de la fosforilación**

Para facilitar la manipulación de la muestra, se lleva a un volumen final de 200 µl y se diluye en EE. Para inactivar, se sigue éste protocolo:

- Se incuba la muestra a 80°C durante 15 min.
- Se precipita agregando 0,1 vol de KAc 3M + 2,5 vol de Etanol + 0,5 µl glucógeno (20 mg/ µl). Se agita fuertemente.
- Se incuba durante 1 hora a -70 °C.
- Se centrifuga durante 30 min a 14.000 rpm y se descarta el sobrenadante.
- Se resuspende en 7 µl de H<sub>2</sub>O destilada.

### **Ligación**

Una vez inactivada la PNK, se procede a ligar el vector (pZeRO), cortado en romo y defosforilado comercialmente, siguiendo éste protocolo:

- A los 7 µl de inserto inactivado, se agregan los siguientes reactivos:

1 µl de vector pZeRO

1 µl de *buffer* ligasa

1 µl de T<sub>4</sub> ligasa (400.000 U/ml)

- Se deja incubar durante 1 hora a 16 °C.

Además de esto, valdría la pena recordar 4 parámetros que hay que tener en cuenta a la hora de realizar una ligación:

- a) La relación entre el plásmido y el inserto (vector/amplímero) debería ser equimolar, aunque una mayor concentración del inserto puede incrementar la eficiencia de la ligación.
- b) La concentración total de DNA (vector+amplímero) en la reacción ha de ser alrededor de 10 ng de DNA total/µl de reacción.
- c) El volumen final idóneo es de 10 µl.

- d) La relación enzima/DNA es de 0,5-2 unidades de T<sub>4</sub> ligasa por 5 pmols de DNA.

### **Transformación**

Para poder obtener grandes cantidades del inserto de interés, es necesario que la secuencia de DNA unida a la del vector, se introduzca en una bacteria (transformación bacteriana). Posteriormente, a través del crecimiento y la reproducción bacteriana, obtendremos cantidades ilimitadas de nuestro fragmento. Para realizar la transformación, seguimos éste protocolo:

- Se utiliza el medio LB agar (*Luria Bertani Medium*) y se agregan 151 µl de IPTG + 250 µl de Kanamicina (50 µg/ml) (por cada 50 ml de medio).
- Se colocan 15 ml de este medio para preparar la placa.
- Se agregan 12,5 µl de células (TOP 10 F') que serán transformadas + 2 µl de 2 β-mercaptoetanol (ME) diluido (1 µl de 2β ME + 25 µl de H<sub>2</sub>O) + 2 µl del producto de ligación.
- Se incuba la mezcla durante 20 min en hielo.
- Se incuba nuevamente a 37 °C durante 45 seg.
- Se incuba finalmente en hielo durante 2 min.
- Se agregan 250 µl de SOC y se deja 1 hora en agitación a 225 rpm y a 37°C.
- Se siembran 50 µl de muestra en una placa y se incuban de forma invertida a 37°C toda la noche.
- Se comprueba la transformación por PCR (utilizando los cebadores 1412 *sense* y 2299 *antisense*) a partir de las colonias presentes en la placa. La muestra que se utiliza para realizar la PCR de comprobación se realiza de la siguiente manera:
  - La colonia que se desea testar se disuelve en 25 µl de PBS 0,5%.
  - Se cogen 6 µl y se agregan 4 µl de H<sub>2</sub>O (vol final de 10 µl).
  - Se utilizan 2 µl de los 10 anteriores, para hacer la PCR.
  - Se verifica con la PCR (a través de un gel de agarosa), que la bacteria tenga el inserto.

- Se seleccionan las colonias positivas y se hacen crecer en suspensión para su estudio posterior, en un medio LB (Miniprep).

### **Miniprep**

La miniprep se realiza para preparar DNA plasmídico y consiste en una lisis suave de la bacteria en la que se protegen la degradación de los ácidos nucleicos por la presencia de H<sub>2</sub>O DEPC (Dietilpircarbonato). La calidad del DNA plasmídico obtenido por esta aproximación es buena y puede ser utilizado para secuenciaciones posteriores. El protocolo que se sigue para la realización de la miniprep es el siguiente:

- Se crece un minicultivo con 4 ml de medio LB suplementado con Kanamicina + IPTG y una muestra de la colonia (de 1 a 10 µl).
- Se incuba a 37 °C durante 12-16 horas en agitación a 225 rpm.
- Se guarda un stock de cultivo que haya crecido (800 µl de cultivo + 200 µl de glicerol) a -20°C. A partir de este stock se pueden obtener más bacterias y por tanto más plásmido siempre que se desee, repitiendo los pasos anteriores.
- Se centrifugan los viales de cultivo a 1.300 rpm durante 6 min. Se descarta el sobrenadante.
- Se resuspende el precipitado en 0,25 ml de solución A (50 mM Tris HCl pH=8; 50 mM EDTA pH=8; 15% sucrosa) y se agregan al mismo momento 2 mg/ml de lisozima.
- Se incuba durante 10 min a T.A.
- Se agrega 0,25 ml de solución B (50 mM Tris HCl pH=8; 50 mM EDTA pH=8; 0,1% Tritón X-100) + 2 µl de DEPC (25% DEPC en etanol absoluto).
- Se agita suavemente por inversión y se deja 20 min a 70°C.
- Se incuba en hielo durante 30 min.
- Se centrifuga durante 15-20 min a 14.000 rpm y a 4°C.
- Se sacan los restos bacterianos ("moco") que se ha formado con un aplicador estéril. En este momento se pueden cargar de 5-10 µl de sobrenadante en un gel de agarosa para determinar si se ha clonado el inserto.

- Se agregan 2 vol de etanol absoluto a T.A.
- Se centrifuga durante 15 min a T.A y se descarta el sobrenadante.
- Se lava el precipitado con etanol al 70%, se descarta el sobrenadante y se seca el precipitado en la bomba de vacío.
- Se resuspende el precipitado en 50 µl de EE y se deja 10 min a 65°C con 1 µl de RnasaA (10 µg/ml).

### **Secuenciación**

La reacción de secuenciación se hizo siguiendo este protocolo:

- Se realizan 2 reacciones de secuenciación si se quiere evaluar la secuencia en ambos sentidos. Se agregan los siguientes reactivos a un tubo que contiene 20 µl de aceite:
  - Cebador *sense* (1412) (reacción 1) y cebador *antisense* (2299)(reacción 2) (0,5 µM) (Tabla M.1).
  - 2-3 µl TRRM (Big Dye Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction).
  - 200-500 ng de plásmido (ó 30-90 ng amplímero)
  - Completar con H<sub>2</sub>O hasta 10 µl.
- Ambas reacciones se colocan en el termociclador obedeciendo los siguientes cambios de temperatura:
  - 94° C durante 3 min.
  - 96° C durante 30 seg.
  - 50° C durante 4 min.
  - 4° C durante 5 min.

Posteriormente la muestra se precipita siguiendo el protocolo de precipitación previamente expuesto.

El precipitado que ha sido obtenido, se trata de la siguiente manera antes de pasarlo por el equipo de secuenciación:

- El precipitado se resuspende en 20 µl de solución de secuenciación TSR (Template Suspension Reagent).
- Se incuba durante 10 min a T.A para que éste se disuelva.
- Se desnaturaliza la muestra a 97°C durante 2 min.
- Se incuba inmediatamente en hielo durante 10 min para que no renaturalice de nuevo.

En este momento, la muestra se puede pasar por el equipo de secuenciación.

### **Southern Blott**

El protocolo que se siguió para realizar la transferencia fue éste:

- Se incuba el gel durante 10 min en una solución de 0,25M HCl a T.A.
- Se hacen 2 lavados con H<sub>2</sub>O destilada.
- Se sumerge el gel en una solución desnaturalizante o base (1,5M NaCl; 0,5 M NaOH) durante 40 min y en agitación suave. La solución se cambia 2 veces.
- Se realizan 2 lavados con H<sub>2</sub>O destilada.
- Se sumerge el gel en una solución neutralizante (1M Tris HCl; 1,5M NaCl) durante 60 min y en agitación suave. Se realizan 2 cambios de la solución.
- Se realiza una transferencia a una membrana de nylon (Hybond-N) por capilaridad lenta (se deja incubando toda la noche). La transferencia se realiza de forma pasiva en una cubeta, en la que se monta un sistema de tipo *sandwich* de la siguiente manera: La membrana se humedece en H<sub>2</sub>O destilada, al igual que 3 papeles 3MM; y luego se colocan en una solución SSC 20X. Por otro lado, 2 papeles 3MM se colocan en el sistema tocando la solución SSC 20X. El gel se coloca con los pocillos hacia abajo y la membrana sobre él (es importante evitar las bombas de aire que se puedan formar entre ambos). Luego, se colocan 4 papeles 3MM de 5mm de tamaño más grande que el gel, sobre la membrana y finalmente se colocan varios papeles absorbentes y se deja transfiriendo toda la noche en la misma solución. Este sistema lo que permite es el paso de líquido (SSC 20X) en dirección ascendente, arrastrando por capilaridad (en la parte de arriba se encuentra un papel absorbente) la muestra desde el gel (parte inferior) a la membrana de nylon (parte superior).
- Al día siguiente, se desmonta el sistema y se marcan los pocillos del gel (con bolígrafo) sobre la membrana.

- La membrana se lava con SSC 6X
- La muestra se fija a la membrana en el UV-Stratalinker (Stratagene) durante 1 min a 320 nm.
- La membrana se guarda entre papels Watmann y en lugar seco hasta su hibridación.

Posteriormente la membrana fue hibridada con un cebador específico (Cebador 1412) (Tabla M.1) siguiendo el protocolo de hibridación previamente expuesto.

#### **4.2.14. Electroforesis de ácidos nucleicos**

En la realización de este trabajo se hicieron diferentes electroforesis con el fin de examinar el tamaño de los fragmentos que habían sido previamente amplificados, así como también la cuantificación y la digestión de otros fragmentos. El protocolo general que se llevó a cabo para la realización de cada una de las separaciones electroforéticas fue el siguiente:

- Se pesan 2 g de agarosa (Estándar Media EEO, Bio Rad, Sigma, USA) y se agregan 100 ml de *buffer* TBE 0,5X (Tris base 81 g, Ac. Bórico 13,8 g, 4,8 g EDTA en 1 litro de H<sub>2</sub>O).
- Se calienta la mezcla en el microondas, hasta que se observa la disolución completa de la agarosa.
- Se deja enfriar un poco y se agregan 8 µl de BrEt (10 mg/ml).
- Se prepara el gel en una cubeta de metacrilato utilizando el tamaño de los peines adecuados, en función de las muestras que se vayan a correr.
- Se cargan 8 µl de muestra + 2 µl de *buffer* de carga 5X (Ficoll 400 3g, 2 ml 0,5M EDTA pH=8, Azul de Bromofenol 0,024g en 20ml de H<sub>2</sub>O) en los diferentes pocillos, y en uno de ellos se cargan 10 µl del marcador de tamaño molecular conocido (Phi X 174/RsaI).
- Se corre el gel a 100 voltios durante 90 min.
- La visualización de los productos amplificados se hace en un transiluminador de luz UV, en el que los tamaños moleculares de los productos amplificados se comparan con el marcador de tamaño molecular.

Si bien es cierto que éste fue el protocolo que se utilizó para la mayoría de las separaciones electroforéticas, hubo ocasiones en los que se tuvo que utilizar una agarosa de mayor resolución (a una concentración superior) para poder discriminar aquellos productos amplificados que presentaban un tamaño muy parecido. Del mismo modo, el voltaje utilizado y el tiempo de la corrida se vieron ligeramente modificados. Las diferentes excepciones serán comentadas a continuación:

### **Elución del amplímero a partir del gel de agarosa:**

Para realizar los estándares que se emplearon en la curva de cuantificación tanto de MIP-1 $\beta$  como del gen de expresión constitutiva GAPDH en la PCR a tiempo real, se utilizó el kit de purificación de bandas GFX™ PCR DNA (Amersham Pharmacia Biotech) obedeciendo al siguiente protocolo:

- Se obtiene el amplímero de interés a partir de una amplificación por PCR.
- Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2%, agregando 1 g de low melting Nusieve-GTG y 1 g de Agarosa Estándar Media EEO (Ecogen, Madrid) a 100 ml de TBE buffer 0,5X.
- Se observan los amplímeros de diferentes tamaños en un transiluminador de luz UV.
- Se corta la banda correspondiente al producto amplificado de interés.
- Se pesa un eppendorf vacío.
- El trozo del gel que contiene la banda de interés, se introduce en el eppendorf que ha sido pesado previamente y se pesa de nuevo para determinar el peso neto del trozo de gel.
- Se añaden 10  $\mu$ l de *Capture Buffer* (Solución que contiene acetato y *Chaotrope*) por cada 10 mg de gel de agarosa.
- Se incuba a 60°C durante 5-15 min. Se hacen un par de vórtex durante el período de incubación, para facilitar la disolución completa de la agarosa.
- Se coloca la solución en la columna GFX (la cual contiene una matriz de fibra de vidrio).

- Se incuba 1 min a temperatura ambiente.
- Se centrifuga la columna durante 30 seg a 14.000 rpm y se descarta el eluido.
- Se agregan 500  $\mu$ l de *Wash Buffer* (10mM Tris-HCl pH= 8; 1mM EDTA, 80% etanol) a la columna.
- Se centrifuga por 30 segundos a 14.000 rpm y se descarta nuevamente el eluido.
- Se añaden 30-50  $\mu$ l de agua autoclavada.
- Se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 min. El eluido obtenido (muestra purificada) se conserva a -20°C.

### **Gel para cuantificar el fragmento eluido**

Para calcular la concentración de un fragmento determinado, empleamos un método de cuantificación en gel de agarosa, obedeciendo el siguiente protocolo:

- Se prepara un gel de agarosa al 2% (Ver protocolo general).
- Se carga un volumen conocido de la muestra problema en el gel y un marcador de DNA de diferentes diluciones y de concentración conocida (Phi X174/RsaI).
- La intensidad de la banda de la muestra problema de DNA se compara visualmente con la intensidad de la banda del marcador que corresponda a un tamaño equivalente. Debido a que la concentración del marcador es conocida, podremos establecer una relación entre ellas y calcular por aproximación la concentración del fragmento de interés.

### **Digestión de MIP-1 $\beta$ con MspI**

Al amplificar el cDNA de MIP-1 $\beta$  y el Estándar Interno, utilizando los cebadores  $\beta$ -sense y  $\beta$ -antisense, se obtienen 2 productos de diferentes tamaños (431 pb correspondiente al Estándar Interno y 315 pb correspondiente a MIP-1 $\beta$ ). Al realizar la digestión de los productos amplificados con la enzima MspI, se generan 2 fragmentos a partir del Estándar Interno y 3 del MIP-1 $\alpha$ . Debido a que el locus B no se digiere (315

pb) y presenta un tamaño muy parecido a uno de los fragmentos del Estándar Interno (290 pb), tuvimos que utilizar una agarosa de mayor resolución que nos permitiera separar y poder evidenciar con claridad cada una de las bandas. La agarosa utilizada fue la High Resolution (Bio Rad) y se preparó al 3,5% (3,5 g en 100 ml de buffer TBE 0,5X). El resto del protocolo es idéntico al descrito anteriormente. El gel se corrió durante 4 horas a 100 voltios. Posteriormente, la intensidad de las diferentes bandas fue cuantificada por densitometría utilizando el programa Quantity One de Bio Rad.

#### **4.2.15. ELISA para MIP-1 $\beta$**

Para determinar la cantidad de MIP-1 $\beta$  producida por los PBMCs y linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ tras su estimulación, seguimos el protocolo de *DuoSet ELISA Development System (human MIP-1 $\beta$ /CCL4)* de R&D System, como se describe a continuación:

##### **Preparación de la placa**

- Se agregan 100  $\mu$ l del anticuerpo de captura (Ac monoclonal anti-MIP-1 $\beta$ )(1 $\mu$ g/ml) a cada uno de los 96 pocillos de la placa.
- Se deja incubar durante toda la noche a temperatura ambiente.
- Se aspira el contenido de la placa y se lava 3 veces con un *buffer* de lavado (0,05% Tween 20 en PBS pH=7,2-7,4), dejando transcurrir un breve período de tiempo entre cada lavado. Los lavados consisten en la adición del tampón, seguida de su eliminación por inversión de la placa y secado por golpes fuertes contra papeles limpios.

##### **Bloqueo**

- Se añaden 300  $\mu$ l de buffer de bloqueo (PBS con 1% de BSA, 5% de sucrosa y 0,05% de NaN<sub>3</sub>) a cada uno de los pocillos.
- Se incuba a temperatura ambiente y en cámara húmeda por un mínimo de una hora.

- Se aspira la solución contenida en la placa y se realizan 3 lavados con el buffer de lavado, asegurando nuevamente que no queden residuos de solución en la placa y siguiendo el mismo procedimiento anterior.

### **Incubación del antígeno**

- Se agregan 100 µl de la muestra y de los diferentes estándares (todos por duplicado) a cada uno de los pocillos. Los estándares son muestras precuantificadas de la quimiocina recombinante, preparados a diluciones seriadas a partir de 1.000 pg/ml (estándar de mayor concentración), hasta 15,6 pg/ml (estándar de menor concentración). Además, uno de los pocillos es utilizado como control negativo (sólo tampón).
- Se deja incubar durante 2 horas a T.A y en cámara húmeda.
- Se aspira el contenido de cada uno de los pocillos y se realizan 3 lavados con el buffer de lavado de la manera habitual.

### **Incubación con el anticuerpo primario**

- Se agregan 100 µl de anticuerpo "goat anti-human" MIP-1B biotinilado a una concentración de 50 ng/ml a cada pocillo. El anticuerpo se diluye previamente con una solución de PBS pH=7,2-7,4 con 1% de BSA y se filtra posteriormente con un filtro de 0,2 µm de diámetro (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Se deja incubando durante 2 horas a T.A y en cámara húmeda.
- Se aspira el líquido presente en la placa y se realizan nuevamente 3 lavados con la solución de lavado de la manera descrita anteriormente.

### **Incubación con el anticuerpo secundario**

- Se agregan 100 µl de *Streptavidin-HRP* (Estreptavidina conjugada con *horseradish-peroxidase*), diluida previamente con PBS pH= 7,2-7,4 con 1% BSA (filtrado), a cada uno de los pocillos.

- Se deja incubar durante 20 min a temperatura ambiente, en cámara húmeda y aislado de la luz.
- Se aspira la solución de los pocillos y realizan 3 lavados.

#### **Adición del sustrato**

- Se añaden 100  $\mu$ l del sustrato (una mezcla a cantidades iguales del *Color Reagent A* (de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y del *Color Reagent B* (Tetramethylbenzidine)) a cada uno de los pocillos.
- Se deja incubar por 20 min a T.A en cámara húmeda y aislado de la luz.
- Se agregan 50  $\mu$ l de la solución de stop (Acido sulfúrico) y se valora el cambio de color producido.

- **Cuantificación**

La densidad óptica de la solución presente en cada pocillo, se determina a través de un lector para placas de ELISA (Personal Lab, Biochem) a una longitud de onda de 450 nm, extrapolarlo de la curva de valores del estándar, la concentración de la muestra, de la que se ha obtenido una determinada lectura colorimétrica. En la validación de los resultados, se aceptan variaciones del  $\pm 15\%$  en los valores de D.O., respecto a los valores establecidos por los estándares. La D.O. del control negativo, se debe restar a todos los valores de D.O. obtenidos, tanto de las muestras como de los estándares.

#### **4.2.16. Estadística**

En este apartado se pretende explicar el método utilizado para determinar las frecuencias alélicas, que se derivan del estudio de los diferentes polimorfismos que se han evaluado (MIP-1 $\beta$ , CCR5 y SDF-1), así como también mencionar las variables a partir de las cuales se realizó el estudio multivariante (en el que se correlacionaron los

valores de los linfocitos T CD4, T CD8, carga viral y el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ , en la población de los pacientes VIH+).

- **Determinación de la frecuencia alélica**: Partiendo de las variantes genotípicas, previamente calculadas para los distintos polimorfismos evaluados en este estudio, la distribución alélica poblacional, se calculó de la siguiente manera:

Partiendo de: N° de muestras Homocigotas HH= X

N° de muestras Heterocigotas Hh = Y

N° de muestras Homocigotas hh = Z

N° de muestras Totales = N

La frecuencia alélica es:

- Frecuencia del Alelo H=  $\frac{(2X+Y)}{2N} \times 100$
  - Frecuencia del Alelo h=  $\frac{(2Z+Y)}{2N} \times 100$
- **Estudio Estadístico**: Para realizar este estudio, se utilizó el programa SPSS para Windows, versión 9.0.1. A partir de éste, se correlacionaron las medias, las medianas y la desviación estándar de cada uno de los parámetros estudiados (Linfocitos T CD4+, T CD8+, carga viral y genotipo), con las diferentes variantes genotípicas de MIP-1 $\beta$  (BB, Bb y bb), tanto individualmente como de forma general en el estudio multiparamétrico, en el que se correlacionan los datos de todos estos parámetros entre sí.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Determinación del Polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ en distintas poblaciones.**

Estudios previos de nuestro grupo detectaron, que en el locus B de la quimiocina MIP-1 $\beta$ , se produce un cambio aminoacídico (A / G), localizado en la secuencia aceptora del segundo intrón, provocando que se exprese un lugar aceptor no-canónico para el proceso de corte y unión (*splicing*) del RNA mensajero, el cual, una vez traducido, provoca la pérdida de 15 pb y la síntesis de una proteína truncada carente de 5 aa. Por otro lado, se puede observar, que esta forma truncada va siempre acompañada por un cambio de base A<sub>260</sub> ► G en la secuencia, que altera la secuencia original de la proteína en el aminoácido 70, que pasa de ser la habitual serina del locus A, a la glicina característica del locus B. Es decir, esta delección afecta únicamente al locus B y no al locus A y por tanto cabe considerar que esta delección por *splicing* diferencial es una característica particular del locus B. (Ver Introducción).

Conociendo que el locus B del MIP-1 $\beta$  es codificante y capaz de generar una proteína truncada (con 5 aminoácidos menos), nos dispusimos a evaluar el polimorfismo de esta quimiocina y su incidencia, tanto en la población sana, como en diferentes poblaciones patológicas, entre las que destacan: A) individuos con enfermedades autoinmunes, tales como diabetes Mellitus y enfermedades tiroideas (Graves, Hashimoto, Bocio multinodular), B) infecciones víricas, como la hepatitis C y C) la infección por el VIH (sabiendo que el MIP-1 $\beta$  actúa como uno de los ligandos naturales del CCR5, y que éste ha sido descrito previamente como uno de los co-receptores principales del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)).

#### **5.1.1. PCR Específicas**

La técnica que empleamos en un primer intento, con el propósito de evaluar el polimorfismo del locus B del MIP-1 $\beta$  en las distintas poblaciones, fue la PCR-SSP. Debido a que la mutación se produce en la secuencia

aceptora del segundo intrón, la zona afectada está presente en la secuencia del DNA genómico del locus B y no en el mRNA procesado (cDNA). Por lo tanto, la muestra utilizada como *template* en cada uno de los casos, fue DNA genómico.

Para amplificar las muestras, utilizamos cebadores que fueron diseñados de forma específica para reconocer la mutación. De esta manera, a partir de una simple amplificación por PCR se podían diferenciar aquellos individuos que presentaban el alelo polimórfico de aquellos que presentaban la forma canónica del mismo alelo.

A partir de ahora seguiremos la siguiente nomenclatura para diferenciar ambos alelos: alelo B es aquel que da lugar a la proteína MIP-1βb (forma canónica de la misma), mientras que el alelo b, es el que produce una proteína truncada MIP-1βt (carente de 5 aa) una vez que ha sido procesada.

En cada una de las amplificaciones que se realizaron en este estudio, se utilizaron 3 controles sanos de genotipo conocido (es decir, muestras secuenciadas previamente): un homocigoto bb, un heterocigoto Bb y un homocigoto BB.

Las imágenes obtenidas a partir de las amplificaciones realizadas con esta pareja de cebadores, utilizando las muestras de los diferentes grupos de individuos (sanos y afectados de diferentes patologías), se pueden observar en la Fig. R1

Debido a que los cebadores utilizados reconocen de forma específica la mutación, sólo se van a amplificar aquellos individuos portadores del alelo b (bien sea los homocigotos bb o los heterocigotos Bb), mientras que los sujetos de genotipo BB quedarán sin amplificarse y no darán ningún tipo de señal.

Además, se puede observar que, si bien los genotipos bb y Bb son amplificados, la intensidad de la señal arrojada por de cada uno de ellos es diferente. En el caso de aquellos individuos que presentan el genotipo bb, se produce una amplificación mucho más eficiente y la intensidad de la señal obtenida es mucho mayor (el doble aproximadamente, ya que presenta los dos alelos bb), mientras que la señal obtenida por los individuos con el genotipo Bb es un poco más débil (sólo presenta un alelo b) (Fig R1).

La interpretación de los resultados se hizo, mediante la comparación visual de las señales obtenidas en cada una de las amplificaciones, con respecto a los controles, así como también la intensidad de cada una de ellas entre sí.

### **Amplificación de las muestras con cebadores específicos**

**bb      Bb      BB**

**Fig. R1:** Amplificaciones hechas a tres individuos de diferente genotipo con cebadores específicos para el alelo b, donde se pueden apreciar señales de intensidades diferentes, en función de la carga alélica. El individuo homocigoto bb, presenta el doble de la señal, que la del individuo heterocigoto, mientras que el sujeto portador del genotipo BB, permanece sin ser amplificado.

Debido a que la intensidad de las señales arrojadas por cada uno de los individuos fue el único parámetro de referencia que tuvimos para discriminar entre un genotipo homocigoto bb, heterocigoto Bb y homocigoto BB y que éste era relativamente impreciso en alguno de los casos [falsos homocigotos cuando en realidad eran heterocigotos, posiblemente por la falta de amplificación del alelo b (falsos BB), o bien por una mayor eficiencia en la amplificación del alelo b (falso bb)], como para determinar a ciencia cierta la identidad del alelo en estudio, nos vimos en la necesidad de emplear otra técnica que nos brindara más exactitud y precisión (como la hibridación), para poder definir las características de este polimorfismo.

Sin embargo, la técnica de PCR nos serviría como control o apoyo, para corroborar los resultados arrojados por la hibridación.

Los resultados obtenidos por esta técnica se resumen en la Tabla R1:

<b>Tabla R.1: Resultados del polimorfismo a través de la técnica PCR-SSP</b>						
<b>Grupos</b>	<b>BB</b>		<b>Bb</b>		<b>bb</b>	
	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Enfermedades Tiroideas Autoinmunes (n=16)	11	68,7	1	6,3	4	25
Diabetes Mellitus Tipo I (n=10)	6	60	3	30	1	10
VIH + (n=56)	15	26,8	26	46,4	15	26,8
<b>Controles Sanos (n=200)</b>	<b>140</b>	<b>70</b>	<b>23</b>	<b>11,5</b>	<b>37</b>	<b>18,5</b>

**Tabla R.1:** Resultados arrojados por la técnica de PCR-SSP utilizando cebadores específicos. La incidencia del polimorfismo del locus B se refleja en los diferentes grupos de individuos estudiados, en términos absolutos y en porcentajes.

La razón por la cual aplicamos dos técnicas (PCR-SSP y la hibridación post-PCR genérica) para determinar el polimorfismo del locus B del MIP-1 $\beta$ , se debió a que al comprobar la segregación mendeliana de ambos alelos (obtenidos por la primera técnica), el valor porcentual de los individuos homocigotos bb (18,5%) era superior al de los individuos heterocigotos (11,5%) y por lo tanto incongruente con lo esperado. Es por ello que decidimos reconfirmar nuevamente los datos utilizando otra técnica de mayor precisión y fiabilidad como la hibridación.

### **5.1.2. Hibridación post-PCR genérica**

La incapacidad de detectar con exactitud el genotipo de los diferentes individuos sometidos al estudio, nos llevó a elegir una técnica de mayor precisión como la hibridación, aplicada sobre la PCR genérica, en la que utilizamos unos cebadores específicos para el locus B, que fueron diseñados previamente por nuestro grupo (Ashhab, 1998). En esta amplificación el cebador *sense* (461) está dirigido hacia el exón 2, mientras que el cebador *antisense* (2299) está dirigido hacia el exón 3.

A partir de esta amplificación, pudimos observar que la intensidad de la señal obtenida, parecía bastante pobre e insuficiente, como para realizar

una buena hibridación (Fig. R.2). Es por ello que decidimos reamplificar el amplímero de manera de poder aumentar la intensidad de la señal.

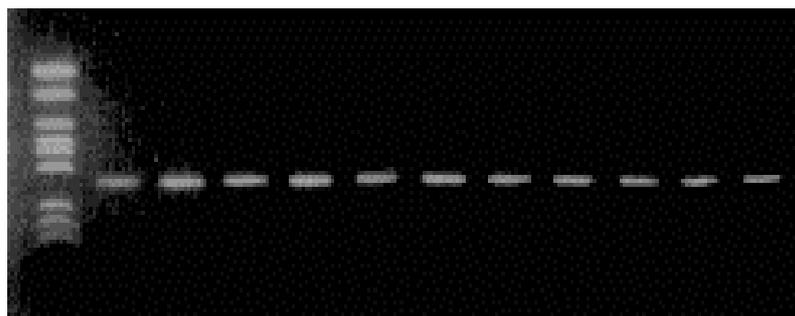
### **Amplificación de las muestras con cebadores genéricos**



**Fig. R.2.** Muestra una señal débil y tenue de las muestras amplificadas con los cebadores 461 (sense) y 2299 (antisense).

Para su reamplificación, diluimos el amplímero (1 / 500) en TE *buffer* y posteriormente lo volvimos amplificar bajo las mismas condiciones anteriores. La señales que obtuvimos a partir de la reamplificación, se muestra en la Fig. R.3.

### **Re-amplificación de las muestras con cebadores genéricos**



**Fig. R.3:** Muestras de gDNA reamplificadas con cebadores genéricos y normalizadas las intensidades para ser hibridadas posteriormente.

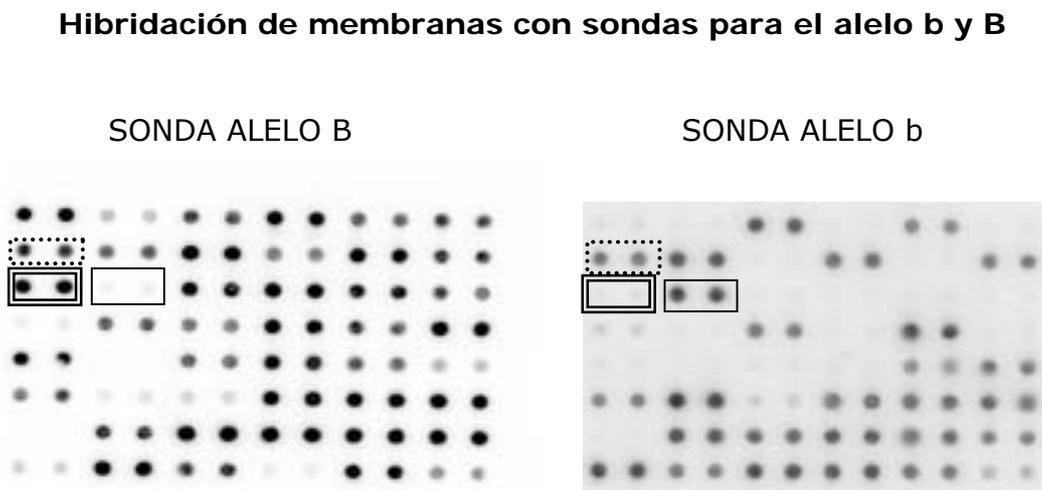
Como las señales obtenidas por las muestras reamplificadas parecían buenas para realizar la hibridación, procedimos a hibridar.

Cada una de las membranas fue hibridada dos veces utilizando sondas diferentes: la primera hibridación la realizamos con una sonda específica para el polimorfismo, ya que esta reconoce de forma específica la base mutada (sonda para el alelo b o sonda polimórfica). Posteriormente utilizamos una segunda sonda que hibridaba de manera específica el alelo B (sonda canónica). La secuencia que presentan las sondas es exactamente la misma; la única diferencia radica en la base que ha sido mutada.

En la realización de esta técnica también se utilizaron muestras controles de genotipo conocido, a partir de las cuales se pudieron validar los resultados.

La interpretación de los resultados se hizo de forma cualitativa, al comparar la intensidad de la señal arrojada por los controles, con las señales de cada uno de los individuos sometidos al estudio.

Las imágenes obtenidas a partir de las membranas hibridadas se muestran en la Fig. R.4.



**Fig. R.4:** Membranas hibridadas con dos sondas diferentes. A la izquierda, la membrana hibridada con una sonda específica para el alelo B y a la derecha, la misma membrana hibridada con la sonda específica para el alelo b. Las intensidades en ambas membranas se correlacionan. La presencia de una señal intensa en la figura de la izquierda, indicativa de un homocigoto BB, se correlaciona con la ausencia de señal en la figura de la derecha (  ). En el caso del heterocigoto (  ), encontraremos intensidades equivalentes en las dos membranas. Por último, los homocigotos bb, darán una señal intensa en la figura de la derecha, mientras que en la figura de la izquierda no darán señal (  ).

Al hibridar la membrana con la sonda canónica se observaron tres intensidades diferentes: la presencia de una señal intensa correspondía al genotipo BB, la señal de mediana intensidad correspondía a un heterocigoto Bb y la emisión de una señal tenue o ausencia de señal correspondía al genotipo bb.

Estos resultados, se confirmaron a través de la hibridación con la sonda polimórfica. Para ello, procedimos a deshibridar la membrana y volver a hibridar con esta otra sonda a una temperatura diferente.

La interpretación de los resultados se hizo igualmente de forma visual, obteniendo las siguientes imágenes: la presencia de una señal intensa correspondía al genotipo bb, la señal de intensidad media correspondía a la forma Bb, mientras que la ausencia de señal correspondería a la variante homocigota BB.

La realización de ambas hibridaciones en paralelo, nos sirvió para corroborar ambos resultados entre sí, ya que obviamente las señales emitidas por las dos membranas tenían que ser coherentes entre ellas, para poder validar un resultado. Si en la primera hibridación se obtiene una muestra que emite una señal intensa, al hibridar con la segunda sonda, esta señal debía ser prácticamente nula o sumamente débil y viceversa. Igualmente ocurre con el caso de los individuos de genotipo heterocigoto, en los que la hibridación con ambas membranas provocó una señal de intensidad intermedia.

La hibridación con dos sondas diferentes era reconfirmatoria y nos permitió aumentar aún más la precisión de los resultados obtenidos y poder discriminar ciertamente entre las tres variantes genotípicas diferentes. Los resultados que obtuvimos por medio de esta técnica se resumen en la Tabla R2.

Esta tabla refleja claramente las diferencias que hay en los valores absolutos de cada uno de los pacientes y los sujetos controles sanos, con respecto a los resultados obtenidos por la técnica de PCR específica (Tabla R.1).

Si analizamos estos datos con mayor detenimiento, se puede apreciar que la mayor imprecisión a la hora de definir un genotipo por la técnica de PCR específica radica en la poca diferencia que hay entre la señal emitida por los homocigotos bb y los heterocigotos. Si bien es cierto que los

homocigotos presentan los dos alelos polimórficos y por lo tanto el doble de la carga, la intensidad de la señal emitida debería ser el doble de la que emiten los individuos heterocigotos, ya que estos presentan sólo un alelo b y la señal debería estar reducida a la mitad. Sin embargo, en la práctica no ocurre así.

**Tabla R.2: Resultados del polimorfismo a través de la técnica de hibridación**

Grupos	BB		Bb		bb	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Enfermedades Tiroideas Autoinmunes (n=16)	11	68,7	4	25,0	1	6,3
Diabetes Mellitus Tipo I (n=10)	6	60,0	4	40,0	0	0
VIH + (n=56)	25	44,6	26	46,4	5	8,9
<b>Controles Sanos (n=200)</b>	<b>143</b>	<b>71,5</b>	<b>48</b>	<b>24,0</b>	<b>9</b>	<b>4,5</b>

**Tabla R.2:** La tabla muestra los datos arrojados a partir de las hibridaciones, en los que se evidencia una diferencia clara entre los porcentajes de los pacientes VIH+, con respecto a los controles sanos, mientras que el resto de los pacientes mantienen una cierta correlación con ellos. Los datos están representados, tanto en valores absolutos como en porcentuales.

Los resultados comparativos muestran que hubo una gran cantidad de homocigotos bb falsos positivos, determinados por la PCR específica, posiblemente en consecuencia de un exceso de amplificación del alelo b, en el caso de los heterocigotos, que aportarían una señal de mayor intensidad a la esperada. Por otro lado, tampoco se puede destacar la posibilidad de que existiera un fallo humano a la hora de interpretar los resultados y en consecuencia una incapacidad a la hora de discriminar entre las diferentes intensidades. Esta situación que era de esperar, confirmaba la poca precisión de la técnica a la hora de evaluar los resultados.

El estudio del polimorfismo realizado a través de las técnicas de PCR específica y corregido posteriormente a través de la hibridación, arrojó datos interesantes y mostró diferencias realmente significativas, en cuanto a la distribución genotípica de los diferentes grupos con respecto a la población de individuos sanos, sobre todo en el caso de los pacientes infectados por el VIH.

En los pacientes VIH+ se observa un aumento significativo en el porcentaje de individuos homocigotos bb (de un 4,5% asciende a un 8,9%) y de heterocigotos Bb (de un 24% asciende a un 46,4%) con respecto a los controles sanos y de manera recíproca destaca el bajo porcentaje de individuos homocigotos BB encontrados en estos pacientes, con respecto a los controles sanos estudiados (de un 71,5% desciende a un 44,6%).

En cuanto a los resultados obtenidos a partir de los pacientes diabéticos y tiroideos, se pudo observar que la distribución de genotipos es bastante equivalente a la de la población normal. Sin embargo, ambas poblaciones cuentan con una limitante que nos impide sacar conclusiones definitivas en cuanto a la distribución alélica de este polimorfismo: el escaso número de individuos evaluados no es estadísticamente significativo.

### **5.1.3. Secuenciación post- PCR génica**

Debido a la importancia que acarrea la obtención de estos resultados a partir de las técnicas de PCR y de hibridación (especialmente en los pacientes VIH+), y sabiendo que el incremento en el número de individuos evaluados puede aumentar la significación estadística, decidimos aumentar la muestra en cada uno de los grupos.

En esta oportunidad, se decidió evaluar el polimorfismo de 120 individuos más infectados por el VIH, 10 enfermos más con tiroiditis autoinmunes y 13 pacientes más con diabetes mellitus tipo I. Además decidimos evaluar un nuevo grupo de individuos infectados por el virus de la Hepatitis C.

A diferencia de la aproximación anterior, en la cual se determinó el polimorfismo a través de la hibridación con sondas específicas, en esta ocasión se utilizó la técnica de secuenciación nucleotídica.

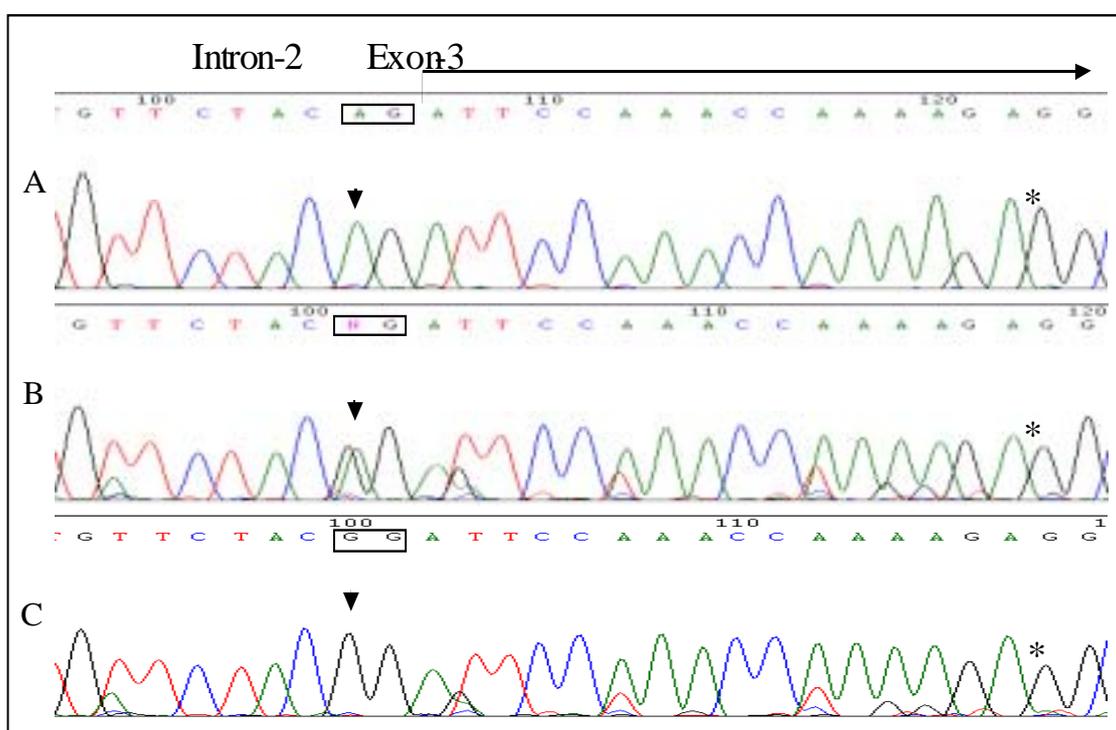
A pesar de que la técnica de hibridación es lo suficientemente sensible, como para arrojar resultados precisos y confiables, nos dio algunos problemas técnicos a la hora de ponerla en práctica y por esta razón decidimos cambiar de metodología.

La secuenciación es una técnica de mucha mayor precisión y a través de ella se pueden obtener resultados exactos y confiables en un período de tiempo más corto.

El gDNA de los diferentes individuos fue amplificado con cebadores específicos para el locus B (401 sense y el 2299 antisense) y posteriormente la secuencia ubicada en el límite del intrón2/exón 3, fue secuenciada utilizando un cebador específico en sentido antisense (2124as) (Tabla M.1).

La imagen obtenida a partir de las diferentes secuenciaciones, se representa en la Fig. R.5.

### Secuenciación con sonda específica para el alelo b



**Fig. R.5:** Secuencia de la zona que limita el intrón 2 con el exón 3 del locus B de MIP-1 $\beta$ , utilizando un cebador antisense (2124). Los tres genotipos han sido representados: **A:** Individuo homocigoto BB, **B:** Individuo heterocigoto Bb y **C:** individuo homocigoto bb. La base susceptible de mutación, ha sido encerrada en un recuadro. El asterisco, indica la posición en que se produce el cambio de base A<sub>260</sub> G, la cual ha sido detectada en varios gDNA de diferentes individuos y que es característica del locus B de MIP-1 $\beta$  (Ver introducción).

A partir de las imágenes obtenidas por las secuenciaciones, se pueden discriminar con precisión los tres genotipos.

Se puede observar claramente que los individuos portadores del genotipo homocigoto BB, presentan un único pico correspondiente a la Adenina (secuencia que ha permanecido inalterada), a diferencia de los individuos portadores del genotipo bb, (en los que hubo una mutación, A / G) en los que el pico que se obtiene, corresponde a una Guanina. Por el contrario, los individuos portadores de ambos alelos (heterocigotos), presentan dos picos, los cuales son representativos de cada una de las bases en cuestión.

Una vez determinados los genotipos de los diferentes grupos de individuos, quisimos evaluar de que manera se distribuye el polimorfismo del locus B en las diferentes patologías estudiadas, con respecto a los controles sanos. Para ello calculamos la frecuencia alélica en cada uno de los casos como se describe en el apartado de Sujetos y Metodología.

Las frecuencias alélicas calculadas de cada una de las poblaciones evaluadas se resumen en la Tabla R.3.

Grupos	Frecuencia genómica (%)			Frecuencia Alélica (%)	
	BB	Bb	bb	Alelo B	Alelo b
Enfermedades Tiroideas Autoinmunes (n=26)	69,2	26,9	3,8	82,7	17,3
Diabetes Mellitus Tipo I (n=23)	74,0	21,7	4,3	84,8	15,2
Hepatitis C (n=43)	65,1	27,9	6,9	79,1	20,9
VIH + (n=174)	51,7	39,6	8,6	71,5	28,5
<b>Controles Sanos (n=200)</b>	<b>70</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>83,5</b>	<b>16,5</b>

**Tabla R.3:** Incidencia del polimorfismo del locus B. Estudio sobre la población de controles sanos e individuos afectados de diferentes patologías. Se muestra también la frecuencia de cada uno de los alelos en las diferentes poblaciones.

La distribución poblacional del polimorfismo del locus B de MIP-1β, nos refleja una cierta homogeneidad entre la población control y las poblaciones de pacientes tiroideos, pacientes diabéticos y pacientes VHC. Sin embargo, no se observa lo mismo en la población de individuos VIH+.

El alelo b se presenta con una mayor incidencia en la población VIH+ con respecto a los controles sanos. Esto es debido a que hay un mayor número de individuos de genotipo Bb y bb distribuidos en esta población, con respecto a los controles. Los datos obtenidos reflejan claramente, que los individuos VIH+ de genotipo bb casi triplican el número de controles homocigotos bb (8,6% vs 3%). Igualmente se observa, que los individuos heterocigotos VIH+ representan casi un 50% más del porcentaje total de los individuos controles heterocigotos (39,6% vs 27%).

#### **5.1.4. Análisis Multiparamétrico de los pacientes VIH+**

A partir de este análisis se busca establecer una relación entre los valores de linfocitos T CD4+, T CD8+ y la carga viral de cada uno de los genotipos para el polimorfismo del locus B de MIP- $\beta$ , así como también determinar si en alguno de los grupos existe un parámetro o la combinación de dos de ellos que pueda o puedan definir alguna población.

- **Análisis Multiparamétrico de los pacientes VIH+ (BB)**

Analizando las tres variantes en conjunto, de los pacientes homocigotos BB, se pudo determinar que los tres parámetros muestran correlación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), como lo muestra la Tabla R4.A. En el estudio multivariante, se observa que los niveles de linfocitos T CD4+, es la variable que con más potencia representa esta población, ya que explica el 66,61% de la varianza (Tabla R.4.B). Por su parte los niveles de linfocitos T CD8+ también es un valor representativo para esta población (21,15%) y en conjunto con los linfocitos T CD4+, son los definen el 87,76% de este sub-grupo. Sin embargo, los valores de carga viral de estos individuos no parecen tener mucha importancia a la hora de definir las características clínicas de esta población. En consonancia con lo dicho a partir de este análisis se puede determinar que en conjunto, tanto los niveles de linfocitos T CD4+ como los de los linfocitos T CD8+ (con los que se correlacionan), son los que tienen más peso (0,83 y 0,87 respectivamente) y son los que definen mejor a esta población (Tabla R.4.C).

<b>Tabla R.4.A: Análisis multiparamétrico de los pacientes VIH+ BB</b>				
<b>Matriz de correlaciones</b>				
		<b>CD4</b>	<b>CD8</b>	<b>CV</b>
<b>Correlación</b>	<b>CD4</b>	1.000	0.623	-0.392
	<b>CD8</b>	0.623	1.000	-0.472
	<b>CV</b>	-0.392	-0.472	1.000
<b>Sig. (Unilateral)</b>	<b>CD4</b>	1.000	0.000	0.000
	<b>CD8</b>	0.000	1.000	0.000
	<b>CV</b>	0.000	0.000	1.000

<b>Tabla R.4.B: Varianza total explicada</b>		
<b>Componente</b>	<b>% de la varianza</b>	<b>% acumulado</b>
<b>CD4</b>	66.61	66.61
<b>CD8</b>	21.15	87.76
<b>Carga Viral</b>	12.24	100.00

<b>Tabla R.4.C: Matriz de componentes</b>	
<b>Componente</b>	
<b>CD4</b>	0.83
<b>CD8</b>	0.87
<b>Carga Viral</b>	-0.74

- **Análisis Multiparamétrico de los pacientes VIH+ (Bb)**

Al correlacionar las variables de los pacientes VIH+ de genotipo heterocigoto, de nuevo se pudo establecer que los niveles de los linfocitos T CD4+ y los T CD8+ se correlacionan de manera estadísticamente significativa entre sí ( $p < 0,05$ ); sin embargo, al comparar los niveles de carga viral con cada uno de los grupos celulares, se observa que estos se correlacionan significativamente de forma estadística con los niveles de linfocitos T CD4+ ( $p = 0,047$ ), mientras que no ocurre lo mismo con los

linfocitos T CD8+ ( $p=0,367$ ) (Tabla R.5.A). Así mismo, la Tabla R.5.B demuestra que el 49,53% de la varianza de esta población se puede definir a través de los niveles de linfocitos T CD4+, mientras que el 34,51% es definida por los niveles de linfocitos T CD8+. Por su parte los valores de carga viral, son los que con menor potencia representan este grupo, ya que definen sólo el 15,96% de la varianza.

<b>Tabla R.5.A: Análisis multiparamétrico de los pacientes VIH+ Bb</b>				
<b>Matriz de correlaciones</b>				
		<b>CD4</b>	<b>CD8</b>	<b>CV</b>
<b>Correlación</b>	<b>CD4</b>	1.000	0.452	-0.220
	<b>CD8</b>	0.452	1.000	0.045
	<b>CV</b>	-0.220	0.045	1.000
<b>Sig. (Unilateral)</b>	<b>CD4</b>	1.000	0.000	0.047
	<b>CD8</b>	0.000	1.000	0.367
	<b>CV</b>	0.047	0.367	1.000

<b>Tabla R.5.B: Varianza total explicada</b>		
<b>Componente</b>	<b>% de la varianza</b>	<b>% acumulado</b>
<b>CD4</b>	49.53	49.53
<b>CD8</b>	34.51	84.04
<b>Carga Viral</b>	15.96	100.00

<b>Tabla R.5.C: Matriz de componentes</b>		
<b>Componente</b>		
<b>CD4</b>	0.875	-0.057
<b>CD8</b>	0.784	0.441
<b>CV</b>	-0.323	0.915

Finalmente se pudiera comentar, que los niveles de células T CD4+ observados en los pacientes heterocigotos, constituyen el dato que tiene más peso dentro de esta población y por tanto es el dato que mejor la

define (0,875), aunque también se observa que los niveles de linfocitos T CD8+ tienen un peso importante (0,784) y por tanto pueden considerarse una variable relevante a la hora de caracterizar a esta población. Así mismo, los valores detectados de la carga viral en estos individuos, muestran tener también peso a la hora de definir esta población (-0,323), aunque en sentido cuantitativamente opuesto (Tabla R.5.C).

- **Análisis Multiparamétrico de los pacientes VIH+ (bb)**

El análisis realizado de los pacientes VIH+ de genotipo homocigoto bb, muestra que ninguna de las variables estudiadas refleja una correlación estadísticamente significativa, cuando se relaciona con las otras ( $p > 0,05$ ), probablemente debido al bajo número de muestras (Tabla R.6.A). A pesar de ello se observa que los valores de los linfocitos T CD4+ son de por sí, la variable más representativa y la que define con más potencia a casi la mitad de la varianza (49,53%). También se observa que los niveles de las células T CD8+ son representativos del 34,51% de este grupo y junto con los T CD4+, son los que definen la gran mayoría de la distribución de datos (84,04%). Por su parte, los niveles de carga viral, sólo son capaces de definir el 15,96% de la varianza de esta población (Tabla R.6.B).

<b>Tabla R.6.A: Análisis multiparamétrico de los pacientes VIH+ bb</b>				
<b>Matriz de correlaciones</b>				
		<b>CD4</b>	<b>CD8</b>	<b>CV</b>
<b>Correlación</b>	<b>CD4</b>	1.000	0.229	-0.224
	<b>CD8</b>	0.229	1.000	-0.156
	<b>CV</b>	-0.224	-0.156	1.000
<b>Sig. (Unilateral)</b>	<b>CD4</b>	1.000	0.237	0.242
	<b>CD8</b>	0.237	1.000	0.314
	<b>CV</b>	0.242	0.314	1.000

Por último podríamos comentar que los niveles de linfocitos T CD4+ detectados en estos pacientes, es el dato que tiene más peso (0,73),

seguido por los valores de T CD8+ (0,66) a la hora de definir de forma clínica las características de esta población. Curiosamente aquí, los datos de los valores de carga viral muestran tener un importante peso, pero en sentido cuantitativamente inverso (-0,66). Por ello deben considerarse como una posible variable a la hora de definir esta población (Tabla R.6.C).

<b>Tabla R.6.B: Varianza total explicada</b>		
<b>Componente</b>	<b>% de la varianza</b>	<b>% acumulado</b>
<b>CD4</b>	49.53	49.53
<b>CD8</b>	34.51	84.04
<b>Carga Viral</b>	15.96	100

<b>Tabla R.6.C: Matriz de componentes</b>	
<b>Componente</b>	
<b>CD4</b>	0.73
<b>CD8</b>	0.66
<b>CV</b>	-0.66

- **Análisis Multiparamétrico de los pacientes VIH+ (BB, Bb, bb)**

A partir de este análisis además de confrontar los niveles de linfocitos T CD4+, T CD8+ y carga viral, quisimos incluir también el genotipo, para determinar de alguna forma, si éste polimorfismo se correlaciona de manera significativa con alguna de las variables analizadas y si la presencia del alelo polimórfico ejerce algún peso a la hora de definir la población entera.

Al correlacionar entre sí los datos de todos los individuos VIH+, se observa que los valores de linfocitos T CD4+ y T CD8+ se correlacionan muy levemente ( $r=0,49$ ), al igual que la carga viral con los T CD4+ ( $r=-0,293$ ) y los T CD8+ ( $r=-0,211$ ) con significancias estadísticas ( $p<0,05$ ); sin embargo, se observa que el genotipo sólo presenta niveles de correlación estadísticamente significativos con los linfocitos T CD4+ del total de pacientes VIH+ ( $p=0,038$ ), aunque muy débiles ( $-0,150$ ). Con las células T CD8+ y la carga viral no tienen correlaciones significativas estadísticamente ( $p=0,135$  y  $p=0,096$  respectivamente) (Tabla R.7.A).

Por otro lado se observa que los linfocitos T CD4+, es la variable que mejor define al conjunto de los pacientes VIH+ (43,43%). Así mismo los datos reflejan que los linfocitos T CD8+ y la carga viral son elementos que definen porcentajes relativamente similares de la varianza, dentro de esta población (23,73% y 20,44% respectivamente); mientras que el genotipo sólo es capaz de influir como característica predominante en el 12,40% de la varianza de esta población (Tabla R.7.B).

<b>Tabla R.7.A: Análisis multiparamétrico de los pacientes VIH+ (BB, Bb, bb)</b>					
<b>Matriz de correlaciones</b>					
		<b>CD4</b>	<b>CD8</b>	<b>CV</b>	<b>GENOTIPO</b>
<b>Correlación</b>	<b>CD4</b>	1.000	0.493	-0.293	-0.150
	<b>CD8</b>	0.493	1.000	-0.211	-0.093
	<b>CV</b>	-0.293	-0.211	1.000	0.110
	<b>GENOTIPO</b>	-0.150	-0.093	0.110	1.000
<b>Sig. (Unilateral)</b>	<b>CD4</b>	1.000	0.000	0.000	0.038
	<b>CD8</b>	0.000	1.000	0.006	0.135
	<b>CV</b>	0.000	0.006	1.000	0.096
	<b>GENOTIPO</b>	0.038	0.135	0.096	1.000

<b>Tabla R.7.B: Varianza total explicada</b>		
<b>Componente</b>	<b>% de la varianza</b>	<b>% acumulado</b>
<b>CD4</b>	43.43	43.43
<b>CD8</b>	23.73	67.17
<b>CV</b>	20.44	87.60
<b>GENOTIPO</b>	12.40	100

Por último, el análisis de componentes de estas cuatro variantes nos reflejan que los valores que tienen más peso a la hora de definir la población de pacientes VIH+ son los niveles de linfocitos T CD4+(0.820), seguido de los linfocitos T CD8+ (0.764); mientras que los valores de carga viral y el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ , presentan una menor potencia (y además en sentido inverso) a la hora de definir esta población (Tabla R.7.C).

<b>Tabla R.7.C: Matriz de componentes</b>	
<b>Componente</b>	
<b>CD4</b>	0.820
<b>CD8</b>	0.764
<b>CV</b>	-0.598
<b>GENOTIPO</b>	-0.352

## **5.2. Otros polimorfismos que intervienen en la historia natural de la infección por el VIH+**

### **5.2.1. Polimorfismo del receptor CCR5**

La presencia de individuos resistentes al VIH (seronegativos a pesar de estar altamente expuestos al virus), motivó a los investigadores a determinar la causa de esta resistencia. Sus altos niveles de quimiocinas (Paxton *et al.*, 1996), junto con el hecho de que sus células no fueran infectadas por virus de cepas M-tropicas, pero sí por cepas T-tropicas, sugirieron algún mecanismo protector relacionado con el receptor CCR5 y no con el CXCR4.

La detección de una deleción de 32 pares de bases en el receptor CCR5 (Liu *et al.*, 1996) observada en estos pacientes seronegativos altamente expuestos al virus, inmediatamente se relacionó con la resistencia total de la enfermedad o el retraso de su progresión, al determinar que el 33% de los individuos homocigotos ( $\Delta 32/\Delta 32$ ) permanecen sin ser infectados, a pesar del alto riesgo que asumen ante una exposición constante al VIH (Liu *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996).

Dada la trascendencia de estos datos incluimos en nuestro estudio, la valoración del polimorfismo del receptor de quimiocinas CCR5, que fue evaluado a partir de la amplificación por PCR del gDNA de los individuos VIH+. La utilización de cebadores específicos para detectar la mutación en este gen, permite discriminar los diferentes genotipos por el tamaño del amplímero generado. Los individuos homocigotos para la forma mutada del gen, producen un amplímero de menor tamaño (32 pares de base menos) que el amplímero que generarán los individuos homocigotos para la forma *wild type* del gen. Sin embargo los individuos heterocigotos, muestran dos bandas que corresponderán a cada uno de los alelos amplificados. De esta manera a partir de un gel de electroforesis, se podrán discriminar cada una de las variantes alélicas para este polimorfismo.

A partir de las amplificaciones de PCR realizadas a cada uno de los pacientes VIH+ se pudo determinar la frecuencia alélica del polimorfismo de nuestra población (Ver Tabla R.8).

Tabla R.8: Frecuencias alélicas del polimorfismo de CCR5					
Grupos	Frecuencia genómica (%)			Frecuencia Alélica (%)	
	CCR5+/+	CCR5+/ $\Delta$ 32	$\Delta$ 32/ $\Delta$ 32	Alelo CCR5+/+	Alelo $\Delta$ 32
VIH + (n=138)	88,4 (n=122)	11,6 (n=16)	0	94,2	5,8
VIH+ BB	61,5 (n=75)	43,8 (n=7)	0	95,7	4,3
VIH+ Bb	34,4 (n=42)	56,2 (n=9)	0	91,2	8,8
VIH+ bb	4,1 (n=5)	0	0	100	0

**Tabla R.8:** La tabla resume los valores de la frecuencia genómica y la frecuencia alélica del polimorfismo del gen CCR5 de los individuos VIH+. Igualmente se relaciona este polimorfismo en base al del locus B de MIP-1 $\beta$  de los mismos individuos VIH+, tanto en términos absolutos como porcentuales.

Las frecuencias alélicas obtenidas a partir de este estudio, se correlacionan con las que se han reportado para este grupo étnico (caucásicos y europeos), que se corresponden con un 86-96% para el alelo CCR5+/+ y de un 4,4-14% para el alelo CCR5 $\Delta$ 32 (Martinson *et al.*, 1997), así como también a las frecuencias alélicas que se deducen de un estudio de pacientes VIH+ españoles (Martínez C., 2001), donde el alelo CCR5+/+ representa un 90,9%, mientras que el alelo CCR5 $\Delta$ 32 representa el 9%. No se encuentran homocigotos  $\Delta$ 32 por su potencial capacidad de resistencia, además de su baja frecuencia teórica (0,36%).

Además de esto, quisimos correlacionar el polimorfismo de MIP-1 $\beta$  con el del receptor CCR5, comparando cada una de las variantes genotípicas del gen CCR5 con las de MIP-1 $\beta$ . Los resultados obtenidos indican que no hay ninguna diferencia en cuanto a la distribución de los alelos CCR5+/+ y CCR5+/ $\Delta$ 32 en los diferentes genotipos de MIP-1 $\beta$ , respecto a los datos de distribución que se han reportado hasta ahora en la bibliografía. Sin embargo a pesar de esto, se puede observar que el mayor porcentaje de los pacientes heterocigotos para CCR5, presentan un genotipo Bb para MIP-1 $\beta$  (56,2%), en comparación con un 43,8% que es de genotipo BB. Así mismo, estos datos explican las diferentes frecuencias alélicas en que CCR5+/ $\Delta$ 32 se distribuye dentro del grupo de pacientes VIH+Bb (8,8%) con relación a la que se reporta para los homocigotos BB (4,3%).

### 5.2.2. Polimorfismo de la quimiocina SDF-1

La quimiocina SDF-1 (Stromal Cell Factor -1), ligando natural de CXCR4 (uno de los correceptores del VIH+), presenta una alteración genética a nivel de la variante beta. Esta alteración, se produce por una mutación a nivel de la región 3', donde se cambia una guanina por una adenina. Esta nueva secuencia alterada no se encuentra en la región codificante de la proteína, por lo que se le denomina región 3' no traducida.

Se ha visto que esta mutación no presenta un efecto protector hacia la infección; sin embargo sí que se ha observado que aporta ciertos beneficios en el retraso de la aparición de la enfermedad, sobre todo en los homocigotos para esta variante genómica, ya que los heterocigotos y los homocigotos habituales no ven influenciada significativamente su evolución. De nuevo, dada la trascendencia de estos datos evaluamos el polimorfismo de la quimiocina SDF-1, en nuestro grupo de pacientes VIH+.

Para ello, a partir de la amplificación por PCR y posterior digestión del amplímero con la enzima MspI, se distinguieron cada una de las variantes alélicas en función de los tamaños del transcrito amplificado tras la digestión con la enzima. Debido a que la secuencia que reconoce la enzima de restricción, se altera en la variante SDF-1 3'A, ésta enzima será capaz de digerir el amplímero de los individuos con la forma *wild type*, produciendo dos bandas de diferente tamaño, mientras que en los individuos con algún alelo para la forma SDF-1 3'A no se producirá la digestión del transcrito amplificado (por la mutación que se ha generado a este nivel). Esto provocará que la enzima no reconozca dicha secuencia y no sea capaz de digerir el fragmento, manteniendo inalterado el tamaño del transcrito que ha sido inicialmente amplificado. Paralelamente, en los los individuos heterocigotos, se generarán tres bandas de diferentes tamaños: una se corresponde con la presencia del alelo SDF-1 3'A (la que se mantiene sin digerir), mientras que las otras dos, de menor tamaño, se corresponden con la presencia del alelo SDF-1+/+ que ha sido digerido por la enzima. De esta manera, aplicando la técnica de PCR y la posterior digestión con la enzima MspI, se pudo definir en un gel de electroforesis el polimorfismo de la quimiocina SDF-1 en la población de VIH+.

Aplicando esta metodología, las frecuencias genómicas y las frecuencias alélicas de estos individuos fueron calculadas (de la manera como se describe en el apartado de Estadística de la sección de Sujetos y Metodología), obteniendo los resultados que se resumen en la Tabla R.9.

Los resultados obtenidos a partir de este estudio, demuestran que existe una correlación entre las frecuencias en que los alelos SDF-1+/+ y SDF-1 3'A se distribuyen en esta población y los que se han reportado para éste grupo étnico (caucásicos, hispánicos y asiáticos) en la bibliografía, que se corresponden con un 79% para el alelo SDF-1+/+ y de un 16-26% para el alelo SDF-1 3'A (O'Brien et al., 1998; Winkler et al., 1998). No se encuentran homocigotos SDF-1 3'A, probablemente por su capacidad de resistencia, además de su baja frecuencia.

<b>Tabla R.9: Frecuencias alélicas del polimorfismo de SDF-1</b>					
<b>Grupos</b>	<b>Frecuencia genómica (%)</b>			<b>Frecuencia Alélica (%)</b>	
	<b>SDF-1+/+</b>	<b>SDF-1+/3'A</b>	<b>SDF-1 3'A/3'A</b>	<b>Alelo SDF-1+/+</b>	<b>Alelo SDF-1 3'A</b>
VIH+ (n=155)	71 (n=110)	29 (n=45)	0 (n=0)	<b>85,5</b>	<b>14,5</b>
VIH+ BB	55,5 (n=61)	48,9 (n=22)	0	<b>86,7</b>	<b>13,2</b>
VIH+ Bb	38,1 (n=42)	40,0 (n=18)	0	<b>85,0</b>	<b>15,0</b>
VIH+ bb	6,4 (n=7)	11,1 (n=5)	0	<b>79,2</b>	<b>20,8</b>

**Tabla R.9:** La tabla muestra las frecuencias genómicas y las frecuencias alélicas del polimorfismo de la quimiocina SDF-1 de los individuos VIH+, calculadas a partir de los datos arrojados por la amplificación del gDNA y posterior digestión del transcrito obtenido con la enzima MspI. Igualmente se relaciona el polimorfismo de SDF-1 en base al del locus B de MIP-1β de los pacientes VIH+, expresado tanto en valores absolutos como porcentuales.

Por otro lado quisimos estudiar la relación entre el polimorfismo descrito para SDF-1 y el descrito para el locus B de MIP-1β (Tabla R.9). Para ello evaluamos la frecuencia en que se distribuye cada una de las variantes de SDF-1 (SDF-1+/+ y SDF-1 3'A), en cada una de las variantes genómicas de MIP-1β (BB, Bb y bb). Los resultados obtenidos demuestran, que la frecuencia en que el alelo SDF-1 3'A se distribuye dentro del grupo VIH+ BB (13,2%), VIH+ Bb (15,0%) y el total de la población VIH+ (14,5%) es menor a la que se describe en la literatura (16-26%); sin

embargo a diferencia de los anteriores, los pacientes VIH+ de genotipo bb sí que presentan una distribución normal de este alelo (20,8%). Así mismo se observa, que dentro de nuestro grupo de pacientes VIH+, la frecuencia en que el alelo SDF-1 3'A se encuentra dentro de los individuos homocigotos bb, es mayor a la de los homocigotos BB y heterocigotos.

### **5.3. Diseño de un estándar interno que permita el estudio de expresión diferencial de los loci A y B de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$ .**

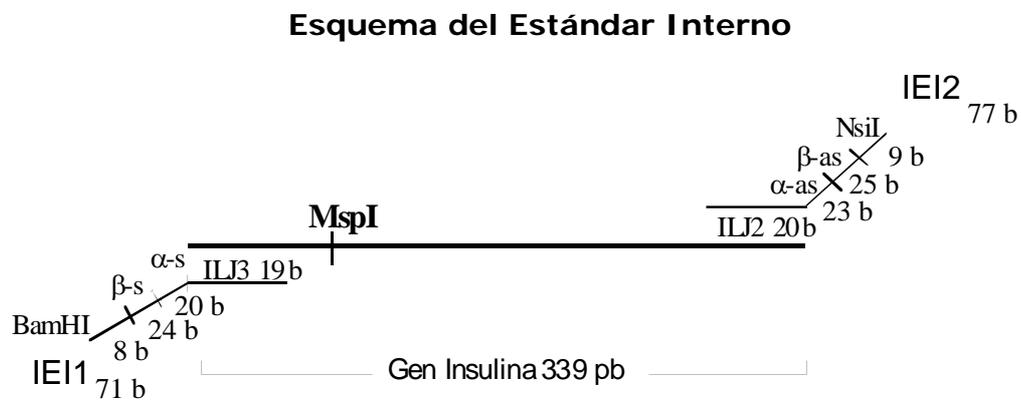
La importancia de estudiar el mecanismo de expresión y de regulación de ambos loci para las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  se fundamenta en que éstas, por medio de su expresión, pueden definir la localización y la composición del infiltrado leucocitario (principalmente monocitos y linfocitos) (Baggiolini *et al*, 1994), regulando potencialmente el funcionamiento del sistema inmune (Sallusto *et al*, 1999) y de los órganos linfoides en situaciones fisiológicas y patológicas (Ashhab *et al*, 2001).

Por otro lado, valdría la pena recordar que, MIP-1 $\beta$  es uno de los ligandos naturales de CCR5, uno de los correceptores del VIH-1. El uso de este receptor, implica que MIP-1 $\beta$ , junto con RANTES y MIP-1 $\alpha$ , pueden considerarse factores supresores principales de la entrada del VIH-1 en la célula diana. Teniendo en cuenta este hallazgo y conocedores del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ , nos propusimos definir las diferencias en los patrones de expresión de las tres variantes de esta quimiocina, ya que estas variantes potencialmente pueden explicar comportamientos funcionales distintos y de alguna manera, la influencia de este polimorfismo en la historia natural de distintas patologías, entre ellas la infección por el VIH.

Para determinar los niveles de expresión de los loci A y B, de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , diseñamos un Estándar Interno que permite controlar el proceso de amplificación, en una RT-PCR competitiva, discriminando cada uno de los loci de interés, a través de la digestión del amplímero y del estándar con una endonucleasa de restricción. Esta aproximación experimental se ha desarrollado para cuantificar los mRNA de los loci A y B tanto de MIP-1 $\beta$  como de MIP-1 $\alpha$ .

### 5.3.1. Generación de un Estándar Interno que controla la RT-PCR y coamplifica con el cDNA de MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$ .

Como se ha comentado anteriormente, para determinar las diferencias de expresión a nivel cuantitativo de los loci A y B, de las quimiocinas MIP-1 $\beta$  y MIP-1 $\beta$ , nos vimos en la necesidad de diseñar un Estándar Interno, que controlara el proceso de amplificación y de digestión de ambos loci (Fig. R.6)



**IEI1:** CGGGATCC CGCAACTTTGTGGTAGATTACTAT TTCCGTCACCTGCTCAGAAT TGGAGATGGGTGGGAGTGT  
 BamHI  $\beta$ -sense  $\alpha$ -sense ILJ3

**IEI2:** CCAATGCAT AAATAATGGAAATGACACCTAATAC GAAGAGG TAGCTGTGGAGGTCAC AGGGCTTTATTCCATCTCTC  
 NsiI  $\beta$ -antisense  $\alpha$ -antisense ILJ2

**Fig. R.6:** Esquema del Estándar Interno utilizado en la RT-PCR. La línea gruesa representa el amplímero de la insulina con el punto de corte para la enzima MspI. Las líneas más finas representan los cebadores híbridos IEI1 e IEI2, cuya secuencia específica se describe en la parte inferior. Estos cebadores contienen la secuencia de los cebadores sense y anti-sense de la insulina, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y las dianas de restricción BamH1 y Nsi1. Las abreviaturas b y pb, se refieren a las longitudes de las diversas regiones expresadas en bases y pares de bases respectivamente.

Este estándar se obtuvo a partir de la amplificación de un gen no relacionado (la insulina), utilizando cebadores híbridos, los cuales

generarían un producto amplificado con dos características importantes: Por un lado, el peso molecular de este amplímero es distinto al de los amplímeros que queremos evaluar (este hecho es un elemento clave en la diferenciación por tamaño de los diferentes cDNAs generados en la reacción de amplificación) y por otro lado, sus extremos contienen las secuencias de los cebadores que se pretenden utilizar, en la amplificación del cDNA tanto de MIP-1 $\alpha$  como de MIP-1 $\beta$ .

En la selección del gen de partida, optamos por una secuencia 3' no traducida del último intrón del gen de la insulina, ya que el hecho de utilizar un intrón de un gen tejido específico, de alguna manera nos garantizaba no encontrar interacciones competitivas con el cDNA sintetizado. Además el amplímero presenta en su interior la secuencia palindrómica reconocida por la enzima de restricción MspI (CCGG), la cual actúa como diana de restricción y elemento de control fundamental en la diferenciación del locus A y B de estas quimiocinas genéticamente relacionadas.

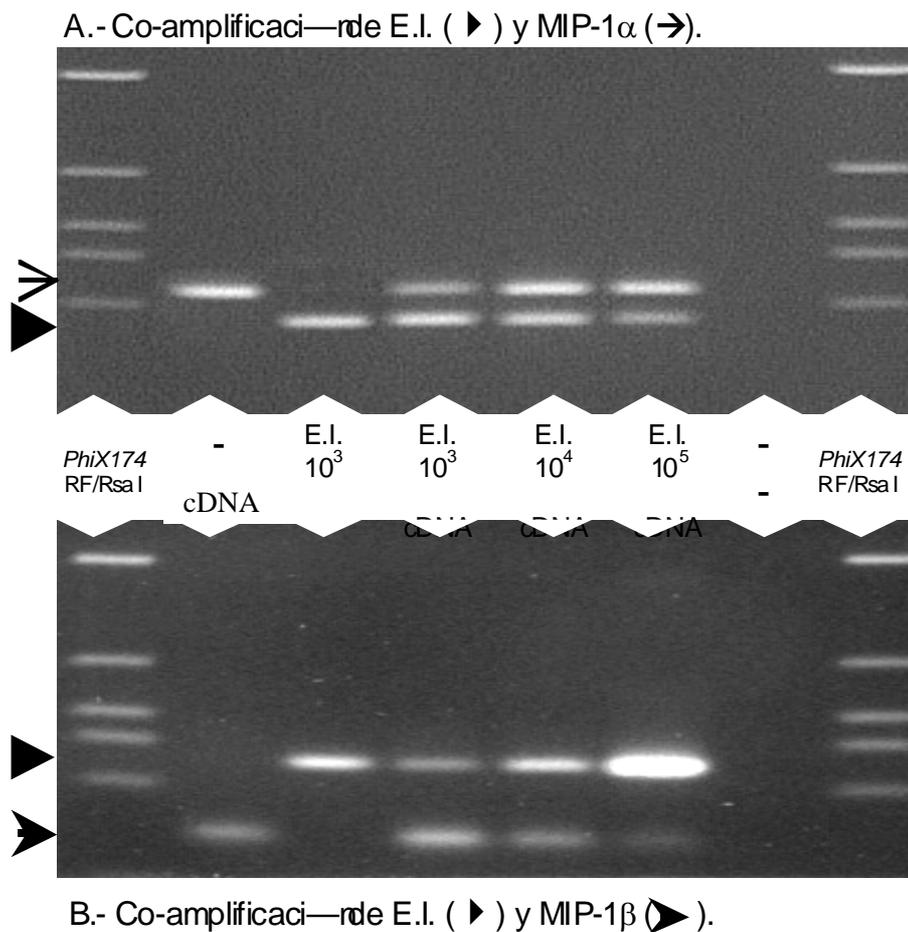
Luego de realizar la amplificación por PCR, decidimos clonar el producto obtenido (448 pb) en un vector eucariota (pZero) para poder disponer de un Estándar Interno homogéneo, con una secuencia nucleotídica controlada por secuenciación automática. De esta manera, el Estándar Interno, una vez crecido en bacterias con el plásmido recombinante y purificado después de su liberación con enzimas de restricción (BamH1 o Nsi) nos sirve como control precuantificado en nuestras amplificaciones. Esta estrategia ha resultado útil a la hora de disponer de cantidades ilimitadas de un Estándar Interno que compite en la amplificación tanto de MIP-1 $\alpha$  como de MIP-1 $\beta$ .

Al coamplificar el cDNA de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  con el estándar interno, se obtiene la imagen que se muestra en la Fig. R.7.

En el caso de MIP-1 $\alpha$  (Fig. R.7.A), al realizar la RT-PCR competitiva utilizando los cebadores  $\alpha$ -sense y  $\alpha$ -antisense, se generan dos productos amplificados que pueden ser fácilmente distinguibles a través de la electroforesis en gel de agarosa, por sus diferentes pesos moleculares, ya que el transcrito del gen en estudio, rinde un producto de 404 pb (en el caso del locus A) y 407 pb (en el caso del locus B); mientras que el producto amplificado que se genera a partir del Estándar Interno, es de 382 pb (de menor peso molecular).

En el caso de MIP-1 $\beta$ , cuando realizamos la RT-PCR competitiva utilizando los cebadores específicos para MIP-1 $\beta$  ( $\beta$ -sense y  $\beta$ -antisense), el producto amplificado que se obtiene a partir del Estándar Interno, es de mayor peso molecular (431 pb) que el transcrito de MIP-1 $\beta$  (315 pb, tanto para el locus A, como para el locus B), como refleja la Fig. R.7.B

### Coamplificación del EI con MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$



**Fig R.7:** Comparación de las coamplificaciones del EI con MIP-1 $\alpha$  o MIP-1 $\beta$  de la línea celular U-937 estimulada. **A)** Muestra la coamplificación del EI y el cDNA de MIP-1 $\alpha$ , en el que la banda superior corresponde al amplímero de MIP-1 $\alpha$  (404 pb); mientras que la banda inferior corresponde al amplímero del EI (382 pb). **B)** Muestra la coamplificación del EI y el cDNA de MIP-1 $\beta$ , donde la banda superior corresponde al amplímero del EI (431 pb), mientras que la banda de menor tamaño corresponde al amplímero del cDNA de MIP-1 $\beta$  (315 pb).

Estos resultados y un sinfín de experimentos posteriores, demuestra que el estándar interno es perfectamente coamplificable con los cDNAs de ambas quimiocinas y fácilmente distinguible de cada una de ellas en gel de agarosa, por las diferencias de los pesos moleculares.

### **5.3.2. Cuantificación en número de copias del gen de interés a partir de la PCR competitiva**

Para determinar si existe alguna diferencia de expresión a nivel del mRNA y de regulación de los loci de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  tras la inducción con diferentes estímulos, utilizamos este sistema que nos permite evaluar, además de las diferencias relativas que pudiera presentar cada locus, las variaciones en términos absolutos. Para ello, cuantificamos primero cada situación, y luego mediante la digestión con MspI, determinamos la proporción en que cada uno de estos loci se expresa y su participación en el proceso de síntesis de la proteína.

El Estándar Interno, como hemos dicho y demostrado, además de controlar el proceso de amplificación, por medio de la PCR competitiva, nos permite realizar la cuantificación del cDNA de interés (MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ) en número de copias iniciales.

La manera de determinar la concentración inicial de los genes en estudio, se hace a través de la comparación del número de copias que la PCR amplifica, a partir de cantidades conocidas del Estándar Interno, con respecto al gen de interés.

Una vez realizada la densitometría de las diferentes bandas que se producen tras la amplificación, y haber determinado la intensidad de cada una de ellas, se relacionan por extrapolación de los estándares precuantificados, los valores obtenidos de las muestras problema. A partir de esta relación se puede cuantificar la cantidad inicial del gen de interés.

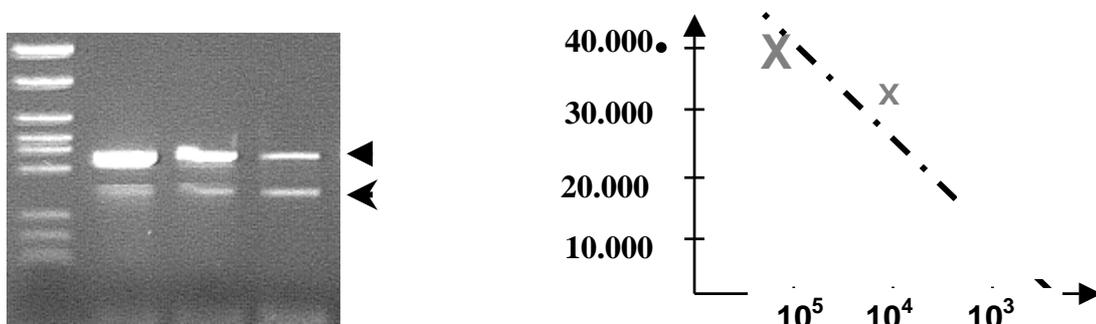
Como ejemplo mostramos los estudios hechos con cDNAs de la línea U-937, previamente normalizados para la enzima de expresión celular constitutiva (house-keeping gene) GAPDH (Glutaraldeído-fosfato-deshidrogenasa), con los cebadores específicos para MIP-1 $\beta$ . La Fig. R.8.A, muestra una electroforesis en gel de agarosa, donde se observan los

amplímeros de MIP-1 $\beta$ , generados a partir de los cDNAs de la línea U-937, utilizando los cebadores  $\beta$ -sense y  $\beta$ -antisense.

Los amplímeros correspondientes al Estándar Interno, además de presentar un peso molecular mayor, hecho que permite una clara diferenciación, se generan a partir de concentraciones iniciales conocidas ( $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  número de copias respectivamente).

A partir de las intensidades obtenidas por densitometría de cada una de las bandas del Estándar Interno, se grafica de manera logarítmica el número de copias iniciales, respecto a las densidades ópticas de sus amplímeros resueltos electroforéticamente. De esta forma, teniendo en cuenta el valor densitométrico de los amplímeros de la muestra problema, podemos calcular su concentración, al extrapolar el número de copias iniciales (Ver Fig.R.8.B).

### Cuantificación de la reacción competitiva



**Fig. R.8:** Cuantificación de la reacción competitiva. **A)** Electroforesis en gel de agarosa de una coamplificación del EI a concentraciones decrecientes ( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ) y de MIP-1 $\beta$  correspondiente al cDNA de la línea U-937 estimulada (cantidad fija). **B)** Gráfica lineal de la amplificación, donde se cuantifica la cantidad de MIP-1 $\beta$  total a través de una extrapolación. Para ello, se grafican (de manera logarítmica) la copias iniciales del EI respecto a las densidades ópticas de los amplímeros correspondientes (unidades arbitrarias) evaluados por densitometría. A partir de esta relación, el número de copias iniciales de la muestra problema se determinará extrapolando el valor densitométrico del cDNA en la recta.

Es así, como a partir de la implementación de este sistema es realmente fácil y práctico determinar cuantitativamente la expresión de ambas quimiocinas tras la estimulación con diferentes inductores.

### **5.3.3. El Estándar Interno actúa como control de la digestión utilizando la enzima de restricción MspI.**

El protocolo de coamplificación que hemos descrito anteriormente, además de controlar el proceso de amplificación, nos permite determinar el nivel de expresión de los loci A y B, tanto de MIP-1 $\alpha$  como de MIP-1 $\beta$ , a través de la digestión con la enzima de restricción MspI.

El hecho de que el Estándar Interno genere un producto de amplificación que contiene la secuencia diana para la enzima MspI (CCGG), nos permite monitorizar la reacción, ya que a partir de la digestión de este amplímero, se generan dos fragmentos de diferente tamaño molecular, fácilmente distinguible (Tabla R.10).

En el caso de MIP-1 $\alpha$ , al coamplificar el cDNA de la línea U-937 y el Estándar Interno, utilizando los cebadores  $\alpha$ -sense y  $\alpha$ -antisense, se generan dos amplímeros de diferente tamaño por parte de MIP-1 $\alpha$  (404 pb correspondiente al locus A y 407 pb correspondientes al locus B), mientras que el Estándar Interno, genera un fragmento de menor tamaño (382 pb). Sin embargo, luego de realizar la digestión con la enzima MspI, debido que el amplímero generado por el locus A de MIP-1 $\alpha$  presenta la secuencia de restricción CCGG repetida 3 veces, se obtienen 4 fragmentos de diferente tamaño (176, 138, 62 y 28 pb respectivamente), a diferencia del locus B, que sólo generará dos fragmentos (231 y 176 pb), ya que esta secuencia se encuentra sólo una vez. Por parte del Estándar Interno, la digestión provoca la liberación de dos fragmentos de diferente tamaño (265 y 117 pb), que son perfectamente distinguibles de la longitud del resto de los fragmentos generados (los correspondientes a MIP-1 $\alpha$ ).

En cuanto a MIP-1 $\beta$ , al coamplificar el cDNA de la línea U-937 y el Estándar Interno, utilizando los cebadores  $\beta$ -sense y  $\beta$ -antisense, el producto que se obtiene a partir del Estándar Interno es de mayor peso molecular (431 pb) que el generado por MIP-1 $\beta$  (315 pb). Posteriormente, al digerir ambos productos con la enzima MspI, el Estándar Interno

generará dos fragmentos de diferente tamaño (290 y 141 pb), mientras que MIP-1 $\beta$  generará tres: dos que corresponden al locus A (190 y 126 pb) y uno que corresponde al locus B (315 pb). El locus B se mantiene inalterable como una única banda, ya que su producto amplificado no contiene la secuencia de restricción CCGG y la enzima no puede digerirlo, conservando de esta manera su tamaño original.

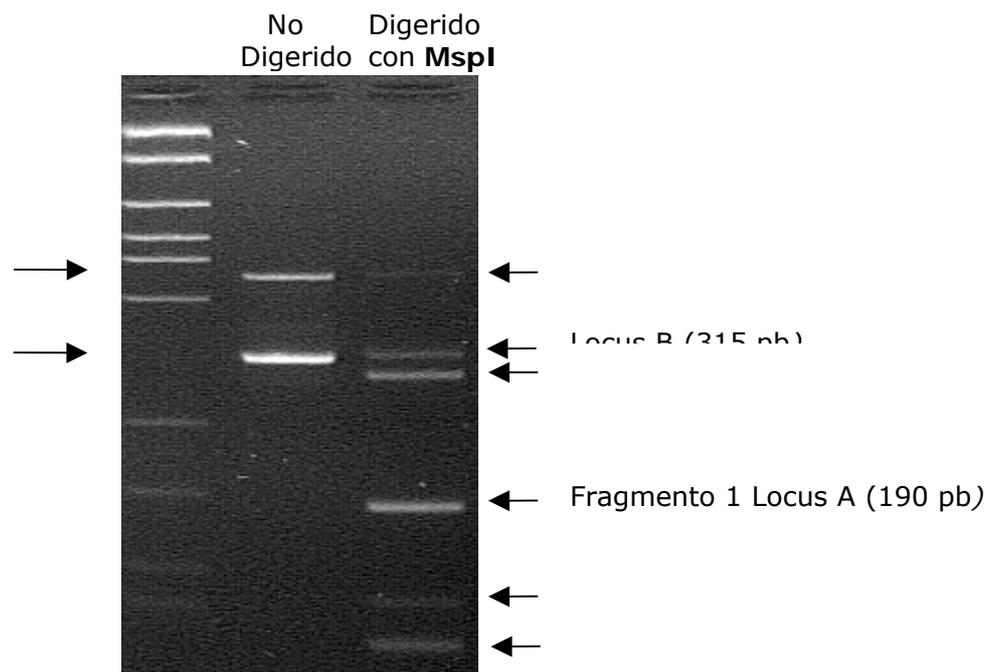
<b>Tabla R.10: Longitud (en pb) de los productos de amplificación y de los fragmentos de restricción tras RT-AFLP para MIP-1<math>\alpha</math> y MIP-1<math>\beta</math></b>				
	<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>		<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	
<b>Digestión con MspI</b>	-	+	-	+
<b>Moldes para PCR</b>				
		265		290
<b>EI</b>	382		431	
		117		141
		176 (A)		190 (A)
	404 (A)	138 (A)	315 (A)	
		62 (A)		126 (A)
<b>cDNA</b>		28 (A)		
		231 (B)		
	407 (B)		315 (B)	315
		176 (B)		

**Tabla R.10:** La tabla muestra los pesos moleculares (en pares de base) de los amplímeros producidos tras la amplificación del EI y el cDNA de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  con cebadores específicos para cada una de ellas. También se muestran los diferentes fragmentos generados tras la digestión de estos amplímeros, con la enzima MspI, denotando entre paréntesis los transcritos de diferente tamaño que se producen a partir del locus A (A) y del locus B (B).

De hecho, es en el estudio de MIP-1 $\beta$  donde se demuestra la mayor utilidad del Estándar Interno como control de la digestión con MspI, ya que se torna imprescindible valorar el nivel de digestión parcial de la misma. Este nivel de digestión parcial, calculado como porcentaje de la densidad

restante de la banda de 431 pb respecto a la de 290 pb ponderada por 1,48 (relación entre las 431 pb y las 290 pb de ambas bandas), nos permite reevaluar con un nivel mayor de precisión, la cuantificación densitométrica del locus B, evitando que se sobrevalore su expresión por la proporción de locus A no digerido y a su vez la del locus A que si no, se vería subvalorado (Fig. R.9).

### Digestión del Estándar Interno y MIP-1 $\beta$ con MspI



**Fig. R.9:** Discriminación de las isoformas de MIP-1 $\beta$ . La figura muestra la resolución electroforética de la digestión del locus A de la quimiocina y del EI, utilizando la enzima de restricción MspI, en comparación con las mismas muestras sin digerir. El carril izquierdo muestra dos bandas de diferente peso molecular, que se corresponden a los amplímeros del EI y de MIP-1 $\beta$  sin digerir. La banda de mayor tamaño (431 pb) corresponde al EI, mientras que la banda inferior (315 pb), corresponde al MIP-1 $\beta$ . El carril de la derecha, muestra la digestión de ambos amplímeros con la enzima MspI, a partir de la cual, se generan 5 fragmentos de diferente tamaño molecular de los cuales, 2 bandas corresponden a la digestión del locus A de MIP-1 $\beta$  (190 y 126 pb), 2 corresponden al EI (290 y 141 pb) y una banda al cDNA del locus B que no ha sido digerido y que conserva su tamaño inicial (315 pb). Así mismo, se señalan los restos de EI que permanecen sin ser digeridos, por falta de digestión de la enzima (digestión parcial).

#### **5.3.4. Uso de la RT-AFLP para evaluar la expresión génica de MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$ .**

Para determinar las posibles diferencias que pudieran existir, a nivel de la regulación y de la expresión de los mRNAs tanto del locus A como del locus B de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , decidimos emplear la metodología anteriormente expuesta de coamplificación del cDNA del gen de interés junto con un Estándar Interno, y la digestión sucesiva de ambos fragmentos. De esta manera, a partir de los diferentes fragmentos generados por la digestión con la enzima MspI, se cuantifica densitométricamente la intensidad de cada una de las bandas obtenidas.

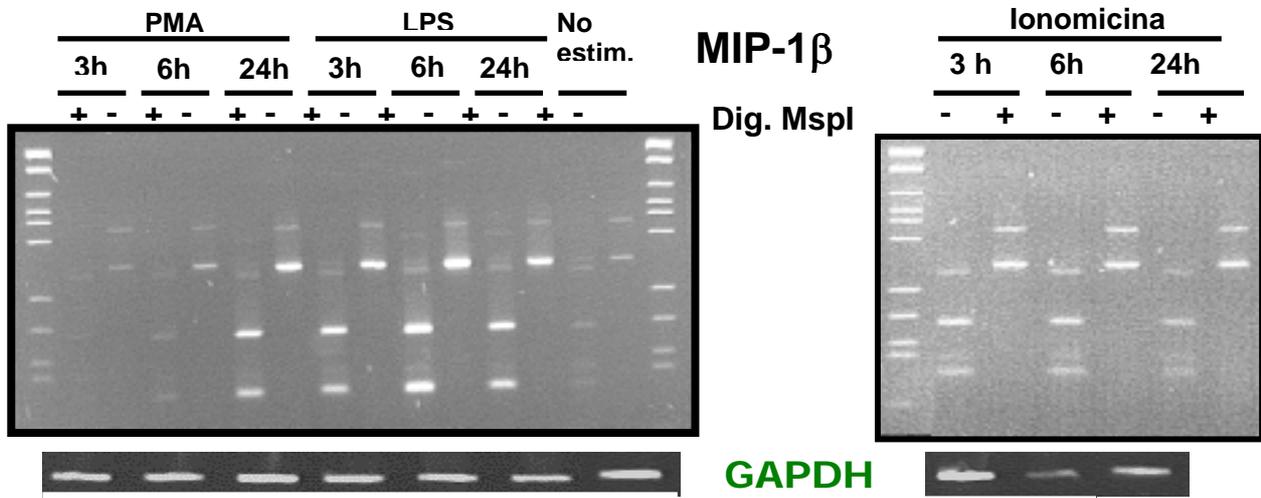
Debido a que la concentración inicial del Estándar Interno es conocida, se pueden estimar de forma semi-cuantitativa el número de copias transcritas por el locus A o el locus B de ambas quimiocinas al extrapolar la intensidad de cada una de las bandas con el número de copias del Estándar Interno. La información obtenida a través de esta metodología, es sumamente valiosa, ya que obtendremos de una forma muy exacta, la proporción en que cada uno de los loci contribuye a que se sintetice determinada quimiocina.

El principio sobre el cual se ha diseñado esta metodología, la hace cien por ciento aplicable tanto para MIP-1 $\alpha$  como para MIP-1 $\beta$ ; sin embargo los experimentos que hemos realizado en este trabajo, sólo se refieren a MIP-1 $\beta$ .

En este estudio, evaluamos las posibles diferencias de expresión y de regulación de los mRNAs tanto del locus A como del locus B del MIP-1 $\beta$ , para la línea mielomonocítica U-937, luego de haberla estimulado con LPS, Ionomicina y PMA durante 3, 6 y 24 horas (Fig R.10.A). Una vez calculada la intensidad de cada una de las bandas por densitometría y tras haber analizado y ponderado los resultados, se determinó la manera en que cada uno de los estímulos contribuye a inducir la expresión de cada locus de MIP-1 $\beta$ . Las diferencias de expresión obtenidas, se pueden observar en la Fig.R.10.B.

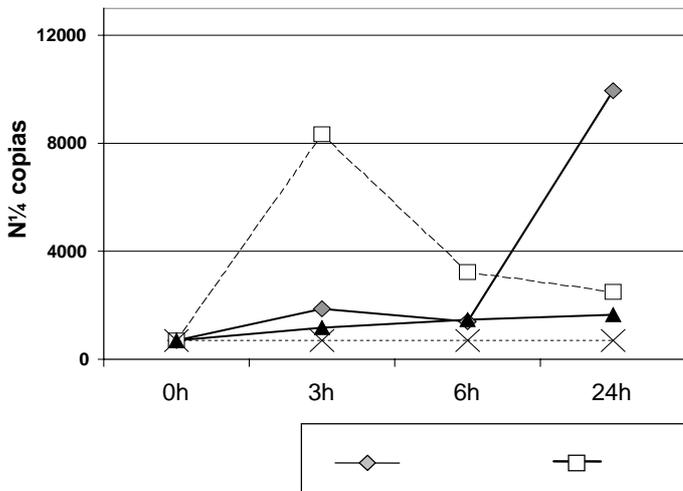
Estimulación de la línea celular U-937 con LPS, PMA e Ionomicina.

A A)

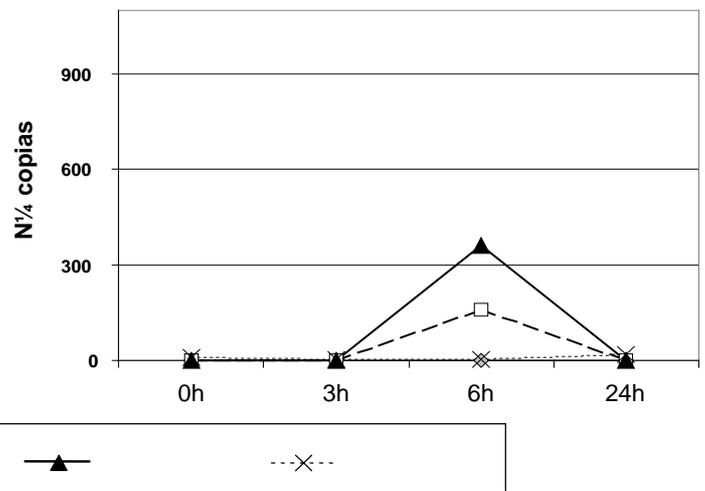


B B)

1.- Cuantificación de la expresión de MIP-1§ Locus A



2.- Cuantificación de la expresión de MIP-1§ Locus B



**Fig.R.10:** Análisis semicuantitativo de los loci de MIP-1 $\beta$ , tras la estimulación de células U-937. **A)** Imagen electroforética de la cinética (situación basal, 3 h, 6 h y 24 h post-estímulo) de inducción de la expresión de ambos loci tras la estimulación con LPS, PMA e Ionomicina. Así mismo se muestra la digestión (+) y la no digestión (-) con la enzima MspI en cada uno de los casos y la normalización previa de cada una de las muestras con GAPDH (imagen inferior) **B)** Cuantificaciones normalizadas de la expresión de MIP-1 $\beta$  tanto del locus A (lado izquierdo) como del locus B (lado derecho) tras las estimulaciones con LPS, PMA e Ionomicina.

En el locus A, el LPS consigue su pico de inducción máxima a las 3 horas, mientras que el PMA lo consigue a las 24 horas. Por su parte la ionomicina no parece influenciar de manera significativa la expresión del locus A, ya que los valores se mantienen inalterados durante todo el período de estimulación.

En cuanto al locus B, tanto la Ionomicina como el LPS, consiguen los niveles de expresión máximos a las 6 horas (siendo la ionomicina la que induce una mayor expresión), mientras que el PMA parece no inducir de ninguna manera al locus B.

Además de los análisis individuales de cada locus, habría que realizar uno comparativo en el que se observa, que si bien el PMA es el que consigue generar una expresión máxima del locus A, en el locus B no ejerce ningún efecto aparente. Lo contrario sucede con la ionomicina, la cual ejerce una inducción máxima del locus B a las 6 horas, mientras que en el locus A, no parece tener ningún efecto. Estas diferencias claras nos han permitido demostrar que los estímulos inductores actúan de manera diferente y con cinéticas muy distintas sobre el locus A y el locus B de MIP-1 $\beta$ , lo cual implica diferencias a nivel de sus promotores, que hasta ahora no han sido estudiadas de forma comparativa.

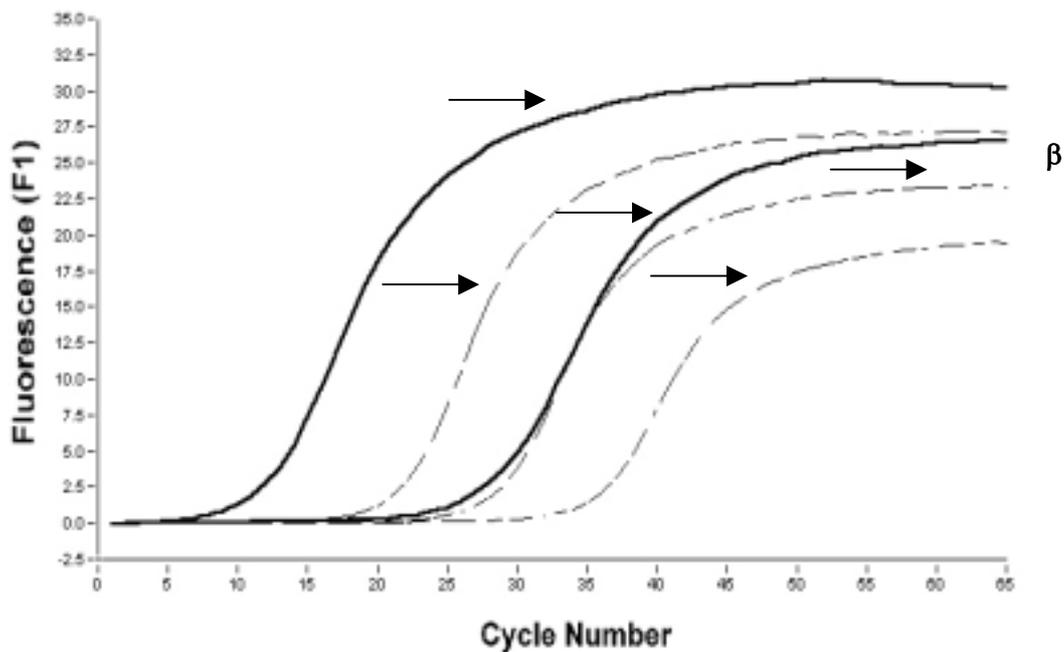
### **5.3.5. Comparación de las cinéticas del Estándar Interno con respecto a los cDNAs de MIP-1 $\beta$ en la reacción de amplificación por rt-PCR.**

La metodología que se ha descrito anteriormente, a partir de la cual se puede valorar de forma semi-cuantitativa, la expresión de los loci del gen de interés, utilizando un Estándar Interno precuantificado y la digestión posterior con la enzima MspI es totalmente válida y fiable, aunque no del todo precisa (el Estándar Interno es de distinto peso molecular, lo que conceptualmente puede hacer que su eficiencia de amplificación sea radicalmente distinta a la del gen de interés coamplificado). Sin embargo, gracias a los adelantos técnicos de los últimos años, es posible realizar una cuantificación más ajustada, utilizando la técnica de RT-PCR a tiempo real con SYBR Green. Esta es una técnica que cuenta con una alta reproductibilidad y precisión, además de permitir una reducción en el

tiempo del estudio (como mínimo elimina el estudio electroforético post-amplificación).

La RT-PCR a tiempo real, además de cuantificar de manera rápida y precisa, cuenta con una característica sumamente importante, que es la monitorización continua durante el proceso de amplificación a través de un fluorocromo intercalante (SYBER Green). Este fluorocromo emite una señal de fluorescencia en cada uno de los ciclos de amplificación, lo cual nos permite evidenciar la cantidad de producto que se va generando a lo largo del tiempo. Tomando en cuenta esta característica y suponiendo que el comportamiento del Estándar Interno es equiparable al del gen en estudio, elegimos esta técnica para corroborarlo (Fig. R.11).

### Cinéticas de amplificación del EI y MIP-1 $\beta$ por rt-PCR



**Fig. R.11:** Comparación de las cinéticas de amplificación del Estándar Interno con relación al cDNA del MIP-1 $\beta$ . Se muestran las curvas obtenidas por rt-PCR (PCR a tiempo real). Las curvas obtenidas corresponden a las amplificaciones de las diluciones seriadas del Estándar Interno (10<sup>7</sup> y 10<sup>6</sup> copias) y de los amplímeros pre-cuantificados de MIP-1 $\beta$  (10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>5</sup> copias).

Para ello comparamos las cinéticas de amplificación de los cDNAs del gen de interés con respecto a los del Estándar Interno, amplificando simultáneamente los transcritos de MIP-1 $\beta$ , previamente cuantificados y de diluciones seriadas ( $10^7$ ,  $10^6$ , y  $10^5$  copias respectivamente), junto con los amplímeros del Estándar interno de concentraciones iniciales conocidas ( $10^7$  y  $10^6$  copias). La amplificación se realizó utilizando cebadores  $\beta$ -sense y  $\beta$ -antisense.

Como se observa en la Fig.R.11, aunque las curvas de amplificación del Estándar Interno no son idénticas a las del cDNA de MIP-1  $\beta$ ; si se puede asumir que son equiparables, en especial las pendientes que indican una eficiencia en la amplificación también equivalente (número de moléculas amplificadas). Por otra parte, este estudio mostró que en el rango comprendido entre  $10^7$  y  $10^5$  copias iniciales, es donde se produce una mayor semejanza en la cinética de las curvas, ya que a medida que disminuimos la concentración inicial, la disparidad entre ellas se hace más notable.

A partir de las imágenes obtenidas por esta amplificación, concluimos que el Estándar Interno, puede considerarse una aproximación metodológica en la determinación semicuantitativa de la expresión de los loci del gen de interés.

#### **5.4. Estudio de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ luego de la estimulación con IL-2 y PHA.**

Como se ha comentado anteriormente, MIP-1 $\beta$  es una quimiocina que, al igual que MIP-1 $\alpha$  y RANTES, ejerce un efecto anti-viral y de alguna manera protector frente a la infección por el VIH. Este efecto protector depende principalmente de la síntesis de MIP-1 $\beta$  por los linfocitos T CD8+.

Conocedores de la existencia de dos loci génicos (locus A y locus B) que codifican para MIP-1 $\beta$  y del papel de uno de ellos (locus B) en definir un polimorfismo para esta quimiocina (Ashhab, *et al.*, 1998), nos planteamos estudiar la expresión de cada locus por separado en distintos grupos celulares (linfocitos T CD8+ y PBMCs) de pacientes VIH+ y controles sanos,

intentando discernir como cada uno de los loci contribuye a la producción de toda la proteína sintetizada en un momento dado.

Como hemos señalado en los resultados anteriores, el diseño de una estrategia para la valoración de cada una de las variantes de esta quimiocina, se hace realmente necesario por la gran similitud, tanto en longitud como en secuencia, que presentan estas isoformas. Es por ello que hemos utilizado como estrategia metodológica la aplicación de un Estándar Interno que, al permitirnos controlar la eficiencia de la digestión (a partir de la cual discriminaremos ambos loci), nos posibilita cuantificar de manera precisa, la expresión de cada uno de los loci.

Antes de que se desarrollara la técnica de PCR a tiempo real, el uso de controles internos (en cada tubo de amplificación) había sido la aproximación metodológica más idónea para controlar el proceso de amplificación. Sin embargo esta nueva tecnología, en la que se produce un seguimiento continuo de la reacción en general, permite utilizar el mismo molde (un amplímero), como estándar precuantificado, en tubos amplificados simultáneamente.

Así, gracias al uso de la PCR a tiempo real, podemos cuantificar de manera aún más precisa el mRNA de la quimiocina de interés, discriminando luego por digestión (con el estándar Interno como control añadido), la cantidad relativa en que cada loci contribuye al total.

A partir de la validación del principio a aplicar, hemos usado la técnica de RT-PCR a tiempo real para la cuantificación del total codificado por ambos loci A y B. En esta aproximación, el Estándar Interno, se añadirá posteriormente al amplímero para controlar el proceso de digestión e inversamente poder determinar el grado de digestión parcial que se produce. Este hecho es realmente importante y significativo en el caso de MIP-1 $\beta$ , puesto que el locus B se identifica por la falta de digestión y sólo el control de ésta, permite asegurar la cantidad total de este locus.

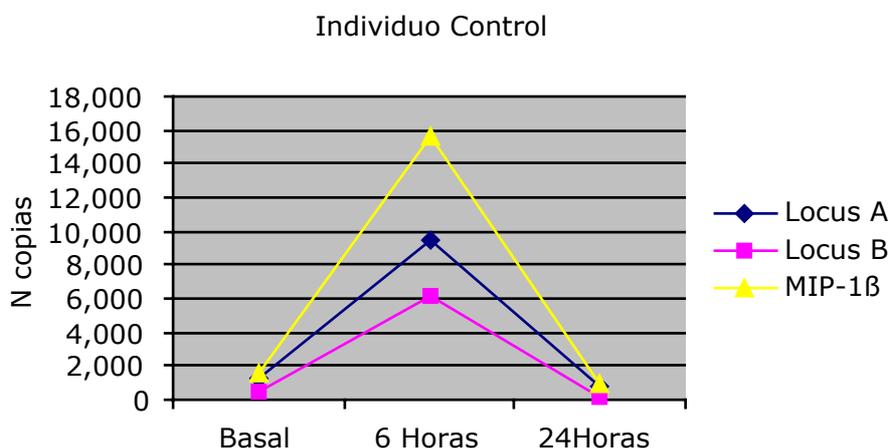
**5.4.1. Estudio de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$  en PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ tras la estimulación con IL-2 y PHA.**

**5.4.1.1. Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de PBMCs en individuos control y pacientes VIH+ de genotipo BB.**

- **Individuo Control:**

Los resultados obtenidos a partir de la estimulación realizada con PHA e IL-2, están representados en la Fig. R.12 y la Tabla R.11. La cinética que se observa en la gráfica y los datos representados en la tabla, nos reflejan que ambos loci se inducen de manera semejante tras la estimulación, consiguiendo niveles máximos de expresión a las 6 horas.

**Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total en PBMCs de individuos control (BB)**



**Fig. R.12:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total, tras la estimulación de individuos control (BB) con PHA e IL-2.

Los niveles de expresión de ambos loci reflejan que, al cabo de las 6 horas, el número de copias incrementadas en el locus B es proporcionalmente superior al que se incrementa en el locus A (1,91 veces

más). Igualmente se observa que al cabo de las 24 horas, el locus B es capaz de *down* regular su expresión de una manera más eficiente (2,32 veces más) que el Locus A. Sin embargo, en cada uno de los tiempos evaluados se puede observar que el Locus A se expresa más que el B, tanto en términos absolutos como en términos relativos.

<b>Tabla R.11: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de PBMCs de Individuo Control (BB)</b>				
		<b>Tiempos</b>		
		<b>Basal</b>	<b>6 Horas</b>	<b>24 Horas</b>
<b>CONTROL</b>	Nº copias Locus A	1.230	9.525	734
	Nº copias Locus B	416	6.136	205
	Nº copias MIP-1 $\beta$	1.646	15.661	939
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	75	61	78
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	25	39	22
	Inducción Locus A (veces)		7,7 (RB)	12,9 (R6H)
	Inducción Locus B (veces)		14,7 (RB)	29,9 (R6H)
	Relación Inducción Locus B / Locus A		1,91	2,32
	Relación Expresión Locus A/Locus B	2,95	1,55	3,58

**Tabla R.11:** Cuantificación normalizada (respecto a 10.000 copias de GAPDH) de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$ , tras la estimulación de PBMCs de Individuo Control (BB) (RB: Respecto al basal; R6H: Respecto a las 6H).

- **Pacientes VIH+:**

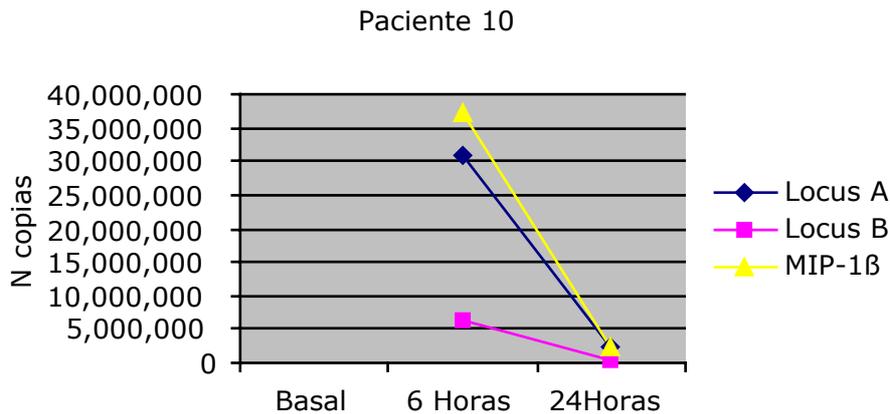
Debido al escaso número de células con las que contamos para hacer estas determinaciones y a algunos problemas técnicos, no fue posible obtener los resultados del estado basal de las células de este paciente.

En la gráfica que muestra la Fig. R.13 se puede apreciar claramente, que las cinéticas que describen el comportamiento de ambos loci es similar. Ambos estímulos consiguen inducir a las 6 horas, los niveles máximos de expresión en cada locus.

Luego de haber alcanzado los niveles máximos de expresión, se observa que el número de copias de cada uno de los loci disminuye, al cabo de las 24 horas. En este punto, los datos de la tabla reflejan que, a pesar de que el Locus B es el que menos contribuye a la síntesis global de la

quimiocina, tanto en términos absolutos como relativos, es el que *down* regula de forma más efectiva, es decir, que la relación en que disminuye el el número de copias en el locus B, es mucho mayor (2,36 veces) a la disminución que se produce en el locus A.

**Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total en PBMCs de pacientes VIH+ (BB)**



**Fig. R.13:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total tras la estimulación de PBMCs de pacientes VIH+ (BB).

		Tiempos		
		Basal	6 Horas	24 Horas
<b>PACIENTE 10</b>	Nº copias Locus A		30.920.645	2.315.408
	Nº copias Locus B		6.272.159	199.378
	Nº copias MIP-1 $\beta$		37.192.803	2.514.786
	% Locus A / MIP-1 $\beta$		83	92
	% Locus B / MIP-1 $\beta$		17	8
	Inducción Locus A (veces) (R6H)			13,35
	Inducción Locus B (veces) (R6H)			31,46
	Relación Inducción Locus B / Locus A			2,36
	Relación Expresión Locus A/Locus B		4,9	11,61

**Tabla R.12:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de PBMCs Pacientes VIH+ (BB) (R6H: Respecto a las 6H).

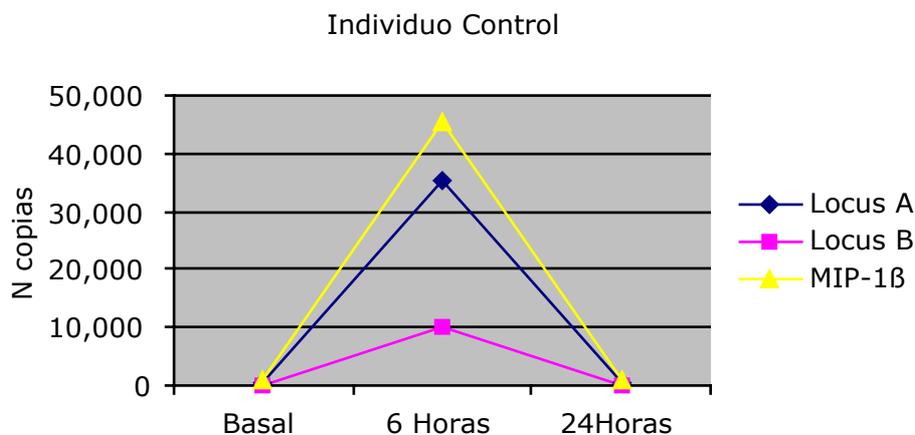
Además de esto podemos añadir, que en todas las determinaciones realizadas, los valores obtenidos a partir del locus A son cuantitativamente mayores a los del locus B, refrendando la observación de que el locus A es el principal gen responsable del total de MIP-1 $\beta$  sintetizado por los PBMCs.

#### 5.4.1.2. Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de PBMCs en individuos control y pacientes VIH+ de genotipo Bb.

- **Individuo Control:**

Los resultados obtenidos a partir de la estimulación de los PBMCs en individuos control demuestran que el comportamiento de ambos loci es similar, mostrando niveles máximos de expresión al cabo de 6 horas de haber sido inducidos (Fig. R.14 y Tabla R.13). También se puede inferir a partir de los datos que se muestran en la tabla, que las variaciones más significativas ocurren en el locus B y son ellas las responsables, de los cambios porcentuales que ocurren respecto a la contribución de cada uno de los loci a la síntesis total de la quimiocina.

#### Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$ total en PBMCs de individuo control (Bb)



**Fig R.14:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total tras la estimulación de PBMCs de individuos control (Bb).

<b>Tabla R.13: Expresión de los loci A y B de MIP-1β tras estimulación de PBMCs de Individuo Control (Bb)</b>				
		<b>Tiempos</b>		
		<b>Basal</b>	<b>6 Horas</b>	<b>24 Horas</b>
<b>CONTROL</b>	Nº copias Locus A	641	35.097	649
	Nº copias Locus B	125	10.221	114
	Nº copias MIP-1β	765	45.319	763
	% Locus A / MIP-1β	84	77	85
	% Locus B / MIP-1β	16	23	15
	Inducción Locus A (veces)		54 (RB)	54 (R6H)
	Inducción Locus B (veces)		81 (RB)	89 (R6H)
	Relación Inducción Locus B / Locus A		1,49	1,65
	Relación Expresión Locus A/Locus B	5,12	3,43	5,69

**Tabla R.13:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1β, tras la estimulación de PBMCs de pacientes VIH+ (Bb) (RB: Respecto al Basal; R6H: Respecto a las 6H).

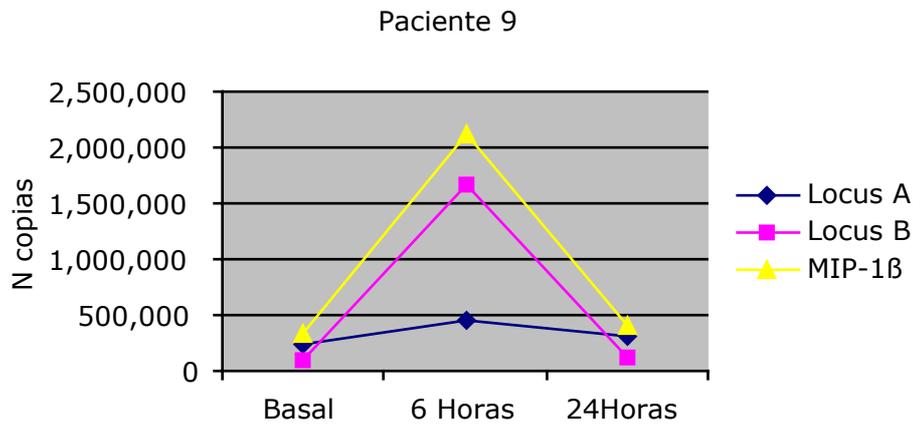
A pesar de que los valores absolutos reflejan una predominancia del locus A sobre el B, en cada una de las situaciones evaluadas, la proporción en que se inducen y se down regulan es diferente.

Los niveles de expresión, detectados en el locus B al cabo de las 6 horas, demuestran que el número de copias totales que han sido incrementadas, superan las copias que se han incrementado por parte del locus A (1,49 veces más). De la misma manera se observa, como al cabo de las 24 horas, la cantidad de copias que disminuyen en la expresión del locus B, es 1,65 veces más que la diferencia que se detecta en el número de copias del locus A.

- **Pacientes VIH+:**

La cinética de inducción que refleja el comportamiento de ambos loci, tras la estimulación con IL-2 y con PHA, nos indican que éste es similar; sin embargo existen algunas diferencias interesantes en cuanto a la variación de expresión que se detectan en cada locus. (Fig. R.15 y Tabla R.14).

### Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$ total en PBMCs de paciente VIH+ (Bb)



**Fig. R.15:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total, tras la estimulación de PBMCs de pacientes VIH+ (Bb).

Si bien es cierto que ambos loci al cabo de las 6 horas alcanzan los niveles máximos de expresión, la proporción en que se inducen, en cada una de las situaciones evaluadas, es diferente.

En estado basal, el porcentaje de expresión que se detecta en el locus A es superior al del locus B (69% vs 31% respectivamente). Sin embargo, al cabo de las 6 horas debido a que el incremento en el número de copias que se produce en el locus B es superior (8,18 veces más), al que se detecta en locus A, éste pasa a representar el mayor porcentaje de expresión (79% vs 21%) respecto al total del número de copias de MIP-1 $\beta$ . Sin embargo, al cabo de las 24 horas, se observan sus niveles de expresión más bajos, y comparativamente con el locus A, es el componente que menos aporta a la síntesis global de MIP-1 $\beta$  (27% vs 73% respectivamente). Esto se debe a que el número de copias que disminuyen en el locus B es mucho mayor, tanto en términos absolutos como en términos relativos (10,22 veces más), a las que que disminuyen el locus A.

<b>Tabla R.14: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de PBMCs de Paciente VIH+ (Bb)</b>				
		<b>Tiempo</b>		
		<b>Basal</b>	<b>6 Horas</b>	<b>24 Horas</b>
<b>PACIENTE 9</b>	Nº copias Locus A	227.603	446.009	303.238
	Nº copias Locus B	103.955	1.667.009	110.863
	Nº copias MIP-1 $\beta$	331.558	2.113.019	414.101
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	69	21	73
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	31	79	27
	Inducción Locus A (veces)		2,0 (RB)	1,4 (R6H)
	Inducción Locus B (veces)		16 (RB)	15 (R6H)
	Relación Inducción Locus B / Locus A		8,18	10,22
	Relación Expresión Locus A/Locus B	2,19	0,27	2,74

**Tabla R.14:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de PBMCs de individuos controles (Bb) (RB: Respecto al Basal; R6H: Respecto a las 6H).

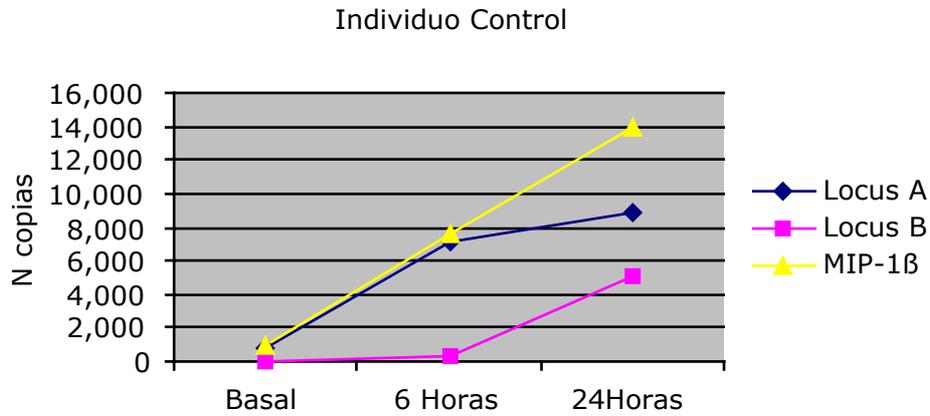
#### **5.4.1.3. Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ de genotipo bb.**

- **Individuo Control:**

Los datos sobre la estimulación de los PBMCs con IL-2 y PHA demuestran, que los loci A y B de MIP-1 $\beta$  se inducen de manera similar, como lo reflejan las cinéticas representadas en la Fig. R.16. Sin embargo, a pesar de que ambos loci, consiguen su máxima expresión a las 24 horas de haber sido inducidos, la proporción en que ésta aumenta en cada uno de los loci y en las distintas situaciones evaluadas, es diferente.

En el locus A el mayor incremento en el número de copias se observa al cabo de las 6 horas (8,4 veces) de haber estimulado los PBMCs, mientras que en el locus B se produce luego de las 24 horas (131 veces).

**Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total en PBMCs de individuo control (bb)**



**Fig. R.16:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total tras la estimulación de PBMCs de individuos control (bb).

		Tiempos		
		Basal	6 Horas	24 Horas
<b>CONTROL</b>	Nº copias Locus A	853	7.175	8.870
	Nº copias Locus B	39	352	5.119
	Nº copias MIP-1 $\beta$	892	7.528	13.989
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	96	95	63
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	4	5	37
	Inducción Locus A (veces) (RB)		8,4	10
	Inducción Locus B (veces) (RB)		9,0	131
	Relación Inducción Locus B / Locus A		1,07	12,6
	Relación expresión Locus A/Locus B	21,8	20,3	1,73

**Tabla R.15:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$ , tras la estimulación de PBMCs de individuo control (bb) (RB: Respecto al Basal)

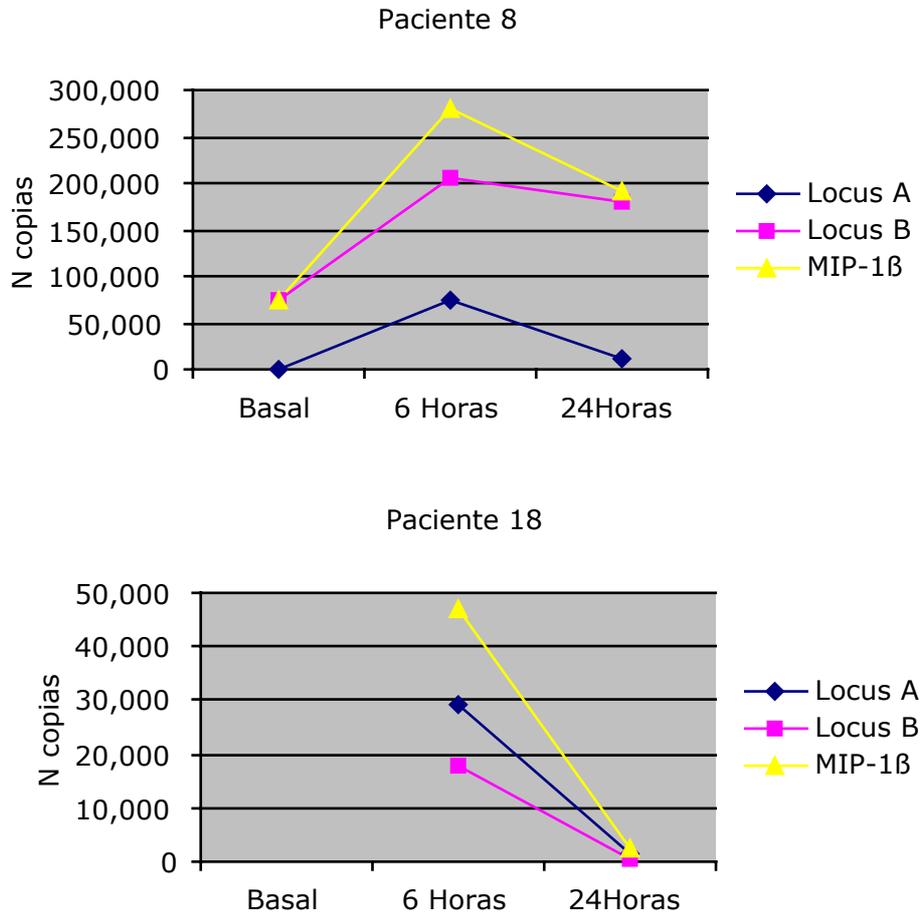
Por otro lado, se observa que en términos absolutos, el locus A se expresa más que el B en cada una de las situaciones, como lo demuestra la relación de expresión entre ambos loci (Tabla R.15). Sin embargo, el número de copias totales que han sido incrementadas en el locus B, es mucho mayor que las que se observan en el locus A (12,6 veces más). Este incremento, también se ve reflejado en el aumento de expresión porcentual

de este locus con respecto al total, que pasa de un 5% (a las 6 horas) a un 37% al transcurrir las 24 horas.

- **Pacientes VIH+:**

En la Fig.R.17 se muestran las gráficas que corresponden a la estimulación de los PBMCs de dos pacientes VIH+ diferentes, en los que se puede observar que, si bien el comportamiento que reflejan las cinéticas de cada locus es similar, los niveles de expresión que éstos alcanzan, difieren en ambos pacientes.

**Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total en PBMCs de pacientes VIH+ (bb)**



**Fig. R.17:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total tras la estimulación de PBMCs de Pacientes VIH+ (bb).

En el paciente 8 se observa que, al cabo de las 6 primeras horas, el locus B se expresa más que el locus A (74% vs 26%), aunque éste último se induzca proporcionalmente más (65 veces (183/2,8) con respecto al locus B). Por otro lado en el paciente 18 se observa que, el locus A es el que se expresa más (62% vs 38%) al cabo de las 6 horas de haber sido inducido. Debido a la incapacidad de poder determinar el nivel de expresión de los loci de este paciente en estado basal, no podemos aseverar nada al respecto, sobre la proporción en que se inducen cada uno de ellos es esta situación (Tabla R.16).

Así mismo se pudo establecer que, al cabo de las 24 horas la expresión de ambos loci disminuye; sin embargo, mientras que en el paciente 8 la *down* regulación del locus A es proporcionalmente mayor a la que se produce en el locus B (6,1 veces más); en el paciente 18 es el locus B el que *down* regula de forma más eficiente (1,6 veces más).

Tabla R.16: Expresión de los loci A y B de MIP-1β tras estimulación de PBMCs de Pacientes VIH+ (bb)				
		Tiempos		
		Basal	6 Horas	24 Horas
<b>PACIENTE 8</b>	Nº copias Locus A	399	73,192	10,637
	Nº copias Locus B	73,192	206,789	179,981
	Nº copias MIP-1β	73,591	279,981	190,618
	% Locus A / MIP-1β	57	26	36
	% Locus B / MIP-1β	63	74	64
	Inducción Locus A (veces)		183 (RB)	6,8 (R6H)
	Inducción Locus B (veces)		2,8 (RB)	1,1 (R6H)
	Relación Inducción Locus B / Locus A		0,02	0,16
	Relación Expresión Locus A/Locus B	0.01	0,35	0,06
<b>PACIENTE 18</b>	Nº copias Locus A		28,964	1,666
	Nº copias Locus B		17,822	641
	Nº copias MIP-1β		46,786	2,307
	% Locus A / MIP-1β		62	72
	% Locus B / MIP-1β		38	28
	Inducción Locus A (veces) (R6H)			17
	Inducción Locus B (veces) (R6H)			28
	Relación Inducción Locus B / Locus A			1.60
	Relación Expresión Locus A/Locus B		1.63	2.60

**Tabla R.16:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1β tras la estimulación de PBMCs de pacientes VIH+ (bb) (RB: Respecto al Basal; R6H: Respecto a las 6 H).

#### **5.4.2. Estudio de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ en Linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ tras la estimulación con IL-2 y PHA.**

Los linfocitos T CD8+ han sido considerados por varios investigadores, como uno de los elementos inmunológicos claves en el proceso de defensa contra la infección por el VIH. La actividad anti-viral ejercida por estas células puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos: indirectamente a través de la liberación de factores solubles con propiedades anti-virales, o directamente por medio de la lisis celular desencadenada por el reconocimiento específico del antígeno (Otto, 1998).

La actividad citotóxica específica de los linfocitos T CD8+, observada en individuos infectados por el VIH, se ha asociado con una progresión lenta de la enfermedad, además de haberse descrito como uno de los mecanismos anti-virales más eficaces que hay (Koup *et al.*, 1994; Borrow *et al.*, 1994). Este hallazgo se ha correlacionado con los experimentos *in vitro* que demuestran que los linfocitos T CD8+ también pueden suprimir la infección viral por un mecanismo no citolítico (Walker *et al.*, 1986), a través de la liberación de factores solubles con actividad anti-viral (Walker and Levy, 1989; Brinchmann *et al.*, 1990), que posteriormente se han identificado como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES (Cocchi *et al.*, 1995).

El estudio que hemos realizado en los linfocitos T CD8+ de individuos sanos y pacientes VIH+, nos permite determinar los niveles de expresión de cada uno de los loci de MIP-1 $\beta$ , tras la estimulación con IL-2 y PHA, así como también la influencia de los diferentes genotipos en sus mecanismos de regulación.

##### **5.4.2.1. Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ de genotipo BB.**

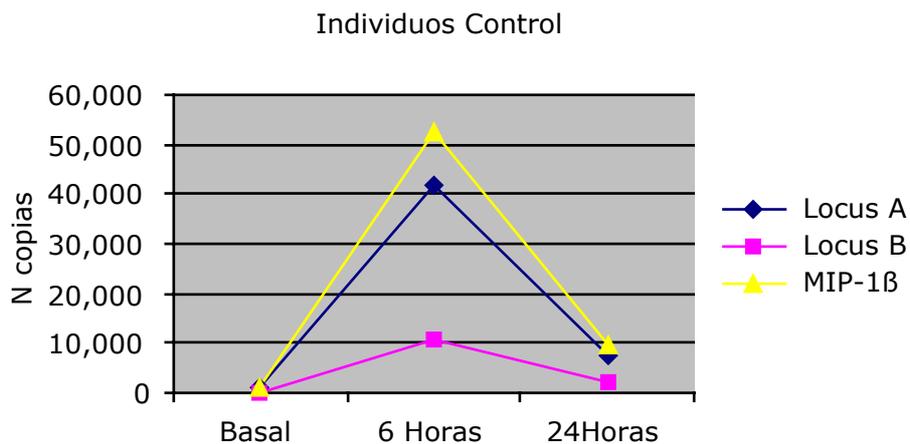
- **Individuos Control:**

A partir de las cuantificaciones densitométricas de cada uno de los fragmentos digeridos por la enzima MspI se pudo determinar el número de copias de cada locus de MIP-1 $\beta$ .

A partir de la gráfica que se presenta en la Fig. R.18, se observa que los loci A y B de MIP-1 $\beta$ , se comportan de manera semejante tras el estímulo de linfocitos T CD8+, alcanzando niveles máximos de expresión, luego de haber transcurrido 6 horas. Sin embargo, a pesar de que su comportamiento es equivalente, los datos reflejados en la Tabla R.17 indican que, la proporción en que se inducen cada uno ellos es diferente.

En cuanto al locus B, se observa que el incremento de la expresión, en número de copias, es proporcionalmente mayor (2,3 veces más) que el incremento que se produce en el locus A, aunque éste sólo represente el 20% de las copias totales calculadas para la quimiocina en estas primeras 6 horas.

#### **Cuantificación de la expresión de los loci A y B de y de MIP-1 $\beta$ tras estimulación de linfocitos T CD8+ de individuo control (BB)**



**Fig. R.18:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total, tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control (BB).

Por su parte, el locus A demuestra ser más eficiente en la *down* regulación que ocurre al cabo de las 24 horas (con muy poca diferencia), respecto al locus B; además de representar la mayor contribución para la síntesis global de la quimiocina, en cada una de las situaciones evaluadas.

Tabla R.17: Expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras estimulación de linfocitos T CD8+ de Individuo Control (BB)				
		Tiempos		
		Basal	6 Horas	24 Horas
<b>CONTROL</b>	N° copias Locus A	1.003	41.922	7.527
	N° copias Locus B	112	10.771	2.095
	N° copias MIP-1 $\beta$	1.116	52.694	9.622
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	90	80	78
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	10	20	22
	Inducción Locus A (veces)		41 (RB)	5,5 (R6H)
	Inducción Locus B (veces)		96 (RB)	5,1 (R6H)
	Relación Inducción Locus B / Locus A		2,30	0,92
	Relación Expresión Locus A/Locus B	8,96	3,89	3,59

**Tabla R.17:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control (BB) (RB: Respecto al Basal; R6H: Respecto a las 6H).

- **Pacientes VIH+**

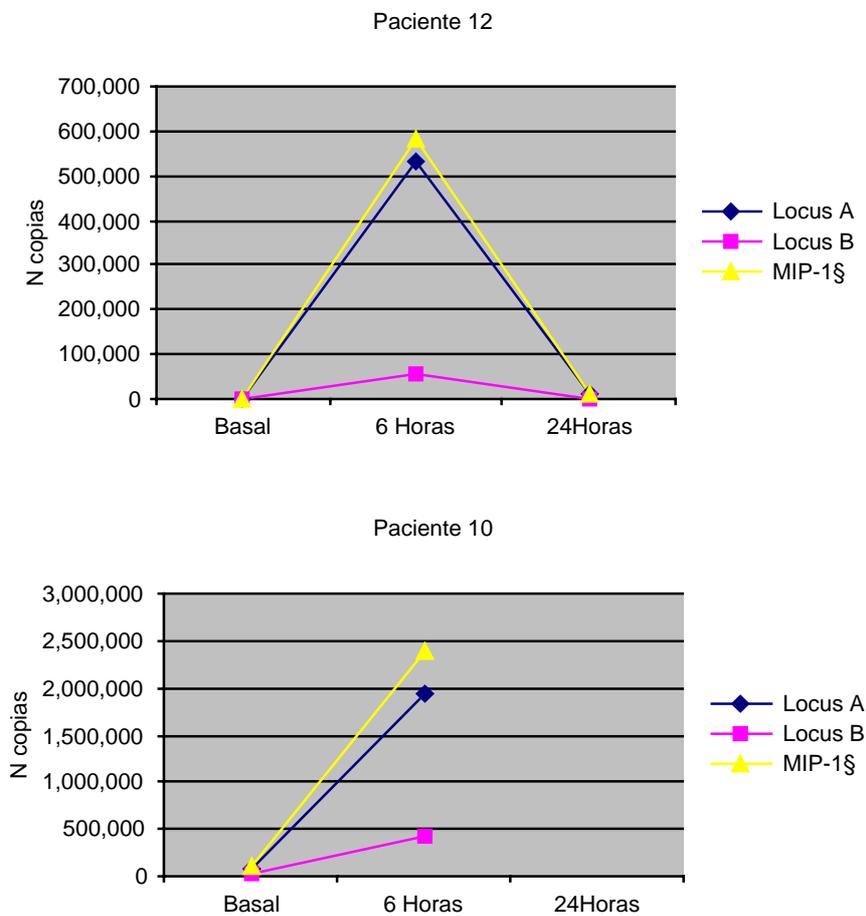
En la gráfica se puede observar que, a pesar de que los dos loci presentan una cinética parecida, ya que la inducción máxima de ambos se consigue al cabo de las 6 horas de haber recibido el estímulo, la proporción en que cada uno de ellos se inducen es diferente, así como también los niveles de expresión y su participación en la síntesis total de la proteína en las diferentes situaciones evaluadas (Tabla R.18 y Fig R.19).

A pesar de que los números absolutos nos reflejan que el locus B, de los pacientes 12 y 10 se expresa en una menor proporción con respecto al locus A, ya que a las 6 horas sólo representan el 10% y el 19% respectivamente, del número de copias totales estimadas para la quimiocina, éste consigue inducirse 1,54 veces más que el locus A, en el paciente 12, mientras que en el paciente 10 se induce sólo 1,04 veces más.

Posteriormente al cabo de las 24 horas, en ambos loci se observa una *down* regulación de la expresión, siendo más efectiva la que se detecta en el locus B. En cuanto al paciente 12, la disminución de la expresión en número de copias del locus B, representa aproximadamente el doble (1,9 veces) de la que se produce en el locus A. En cuanto al paciente 10, no se pudo establecer relación alguna entre ambos loci por falta de datos.

Por otra parte, en ambos pacientes se detecta una expresión cuantitativamente superior del locus A respecto al locus B, en cada una de las evaluaciones realizadas (93-95% en el paciente 12 y 81-82% en el paciente 10).

**Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (BB)**



**Fig. R.19:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total, tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (BB).

<b>Tabla R.18: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de Pacientes VIH+ (BB)</b>				
		<b>Tiempos</b>		
		<b>Basal</b>	<b>6 Horas</b>	<b>24 Horas</b>
<b>PACIENTE 12</b>	N° copias Locus A	1.950	529.476	12.009
	N° copias Locus B	131	54.885	650
	N° copias MIP-1 $\beta$	2	584.362	12.660
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	93	90	95
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	7	10	5
	Inducción Locus A (veces)		271 (RB)	44 (R6H)
	Inducción Locus B (veces)		419 (RB)	84 (R6H)
	Relación Inducción Locus B / Locus A		1,54	1,9
	Relación Expresión Locus A/Locus B	14,89	9,65	18,48
	<b>PACIENTE10</b>	N° copias Locus A	81.971	1.947.678
N° copias Locus B		17.724	434.828	
N° copias MIP-1 $\beta$		99.694	2.382.506	
% Locus A / MIP-1 $\beta$		82	81	
% Locus B / MIP-1 $\beta$		18	19	
Inducción Locus A (veces) (RB)			23,8	
Inducción Locus B (veces) (RB)			24,5	
Relación Inducción Locus B / Locus A			1,03	
Relación Expresión Locus A/Locus B		4,62	4,48	

**Tabla R.18:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (BB) (RB: Respecto al Basal; R6H: Respecto a las 6H).

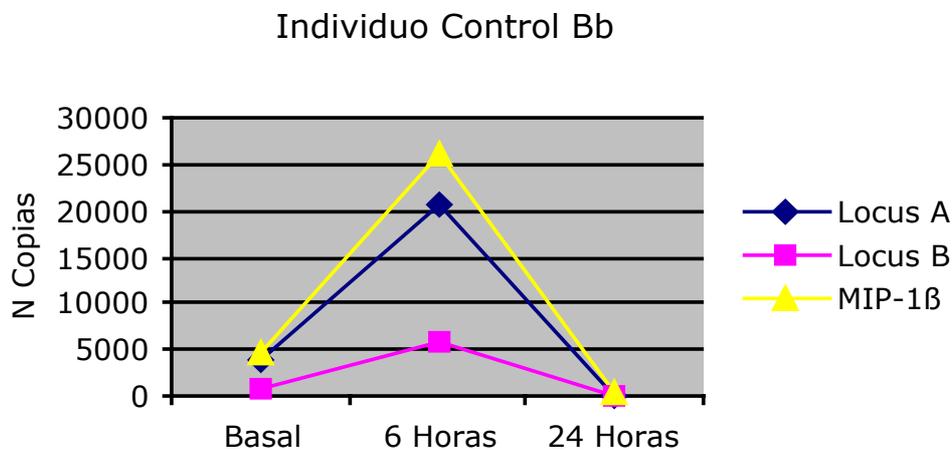
#### **5.4.2.2. Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de linfocitos T CD8+ en individuos control y pacientes VIH+ de genotipo Bb.**

- **Individuos Control:**

En cuanto a los controles sanos de genotipo Bb, se observa que los estímulos aplicados, provocan un máximo de inducción en ambos loci a las 6 horas, como lo refleja la Fig R.20.

A partir de los datos obtenidos, se puede observar que ambos loci, además de inducirse de forma equivalente mostrando cinéticas similares, también se inducen en proporciones prácticamente iguales, ya que el incremento en la expresión del locus B, sólo supera 1,02 veces al incremento en número de copias que se produce en el Locus A (Tabla R.19).

**Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total en linfocitos T CD8+ de individuo control (Bb)**



**Fig. R.20:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control (Bb).

Posteriormente al cabo de las 24 horas, se observa una disminución en la expresión de ambos loci, alcanzando incluso niveles inferiores a los basales. Igualmente se puede ver, que la proporción en que disminuye el número de copias del locus A es 6,5 veces más a la que se observa en el locus B, reflejando una *down* regulación más efectiva por su parte. Debido a este efecto, sólo en esta situación, el locus A pasa a ser el contribuyente minoritario en la síntesis total de la quimiocina, representando el 36% del total de copias de MIP-1 $\beta$  (Tabla R.19).

<b>Tabla R.19: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de Individuo Control (Bb)</b>				
		<b>Tiempos</b>		
		<b>Basal</b>	<b>6 Horas</b>	<b>24 Horas</b>
<b>CONTROL</b>	Nº copias Locus A	3.725	20.476	95
	Nº copias Locus B	958	5.650	170
	Nº copias MIP-1 $\beta$	4.683	26.126	265
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	80	78	36
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	20	22	64
	Inducción Locus A (veces)		5,5 (RB)	215 (R6H)
	Inducción Locus B (veces)		5,9 (RB)	33 (R6H)
	Relación Inducción Locus B / Locus A		1,07	0,15
	Relación expresión Locus A/Locus B	3,89	3,62	0,56

**Tabla R.19:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (Bb) (RB: Respecto al Basal; R6H: Respecto a las 6H).

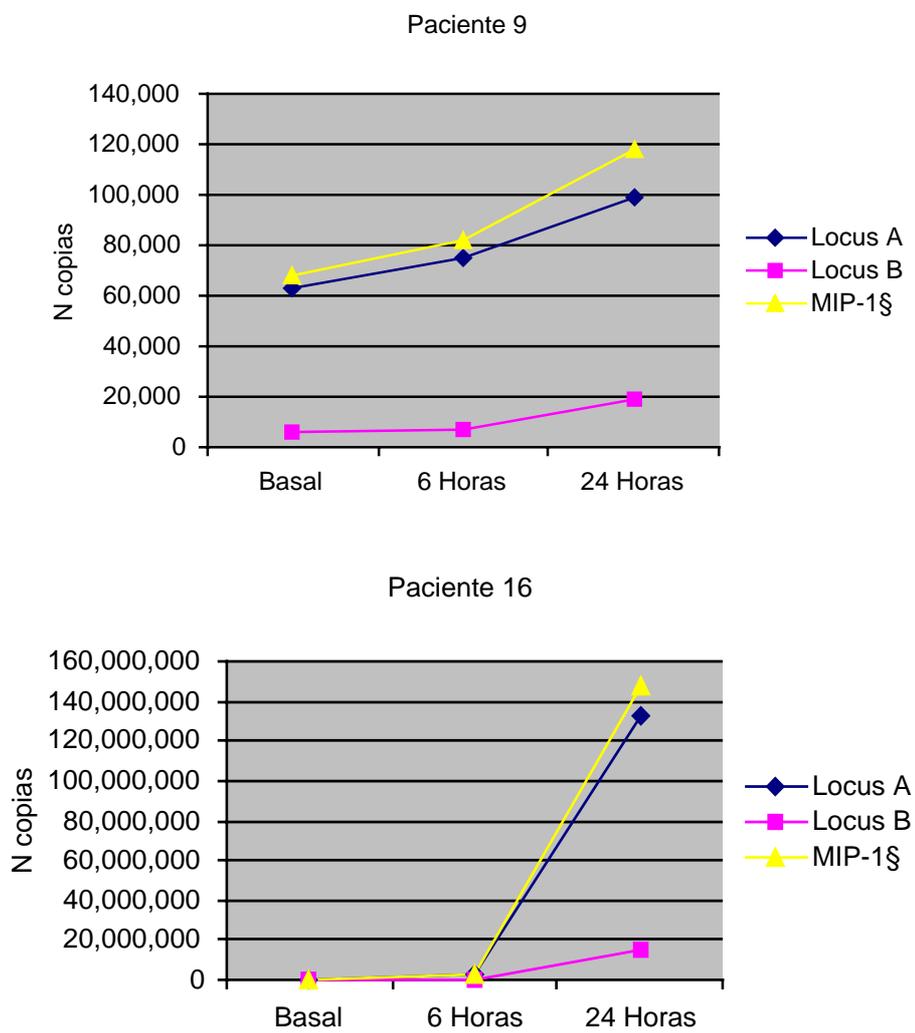
- **Pacientes VIH+:**

En la Fig. R.21 se muestran las cinéticas que se producen en cada uno de los loci de MIP-1 $\beta$ , luego de inducir su expresión con IL-2 y PHA.

A través de las cinéticas representadas en las gráficas, se deduce que el comportamiento de ambos loci tras la estimulación es similar, consiguiendo inducir al máximo la expresión de cada uno de ellos al cabo de las 24 horas; sin embargo, los datos representados en la tabla demuestran algunas diferencias. A pesar de que el locus A expresa un mayor número de copias en términos absolutos y representa más del 80% del total de las copias de MIP-1 $\beta$ , al cabo de las 24 horas; se observa que el incremento que se produce en el locus B, es superior al que se detectan en el locus A, siendo más del doble en los pacientes 9 y 16 (2,58 y 2,19 veces respectivamente) (Tabla R.20).

Por otro lado habría que recalcar que la expresión del locus A, en términos absolutos, es siempre mayor a la del locus B, tanto en estado basal como post-estimulación. En los pacientes 9 y 16 el número de copias determinadas para el locus A representa más del 80% del total de copias de la quimiocina, reafirmando una vez más, que la mayor contribución a la síntesis global de la quimiocina viene dada por el locus A.

**Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total en linfocitos T CD8+ en pacientes VIH+ (Bb)**



**Fig R.21:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (Bb).

<b>Tabla R.20: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de Pacientes VIH+ (Bb)</b>				
		<b>Tiempos</b>		
		<b>Basal</b>	<b>6 Horas</b>	<b>24 Horas</b>
<b>PACIENTE 9</b>	N° copias Locus A	62.557	75.490	99.012
	N° copias Locus B	5.602	6.966	19.286
	N° copias MIP-1 $\beta$	68.159	82.456	118.298
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	93	90	83
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	7	10	17
	Inducción Locus A (veces) (RB)		1,2	1,6
	Inducción Locus B (veces) (RB)		1,2	3,4
	Relación Inducción Locus B / Locus A		1,03	2,18
	Relación expresión Locus A/Locus B	11,17	10,84	5,13
<b>PACIENTE 11</b>	N° copias Locus A	89.233		1.264.843
	N° copias Locus B	10.291		241.469
	N° copias MIP-1 $\beta$	99.524		1.506.313
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	90		84
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	10		16
	Inducción Locus A (veces) (RB)			14,2
	Inducción Locus B (veces) (RB)			23,5
	Relación Inducción Locus B / Locus A			1,66
	Relación expresión Locus A/Locus B	8,67		5,24
<b>PACIENTE 16</b>	N° copias Locus A	531	2.656.559	132.889.953
	N° copias Locus B	23	293.284	14.914.925
	N° copias MIP-1 $\beta$	554	2.949.843	147.804.878
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	96	90	90
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	4	10	10
	Inducción Locus A (veces) (RB)		5.003	250.264
	Inducción Locus B (veces) (RB)		12.751	648.475
	Relación Inducción Locus B / Locus A		2,55	2,59
	Relación expresión Locus A/Locus B	23,09	9,06	8,91

**Tabla R.20:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (Bb) (RB: Respecto al Basal).

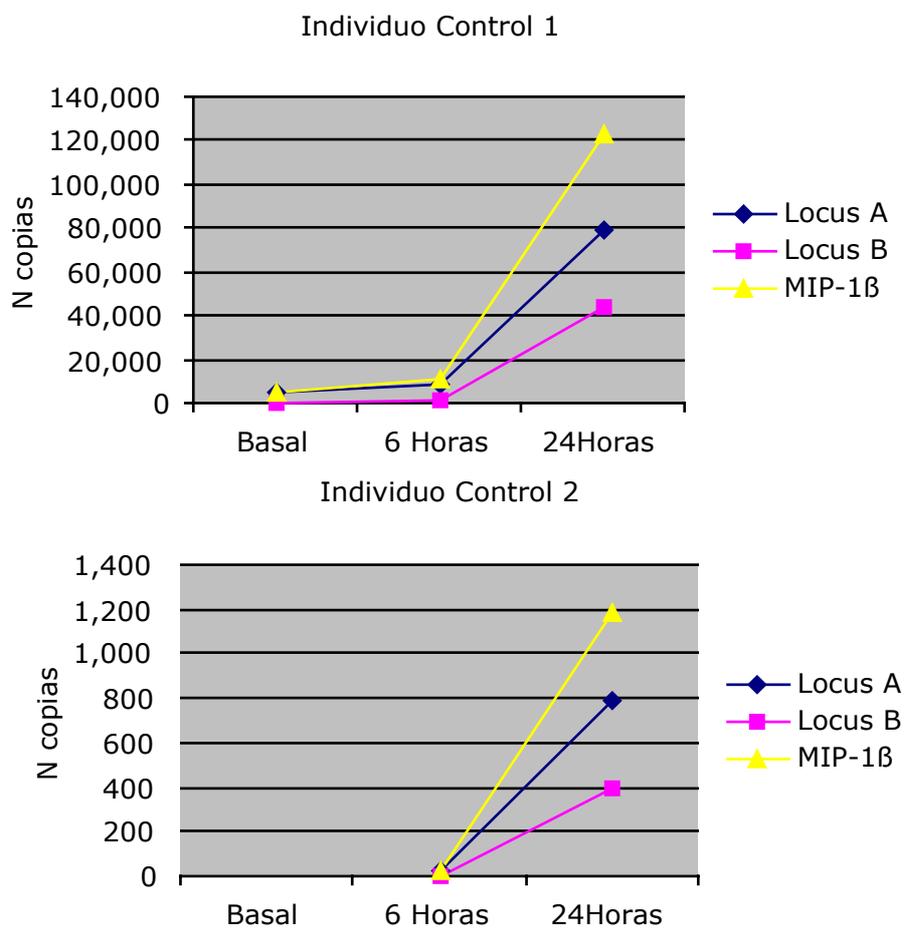
#### **5.4.2.3. Regulación de la expresión de los loci A y B de MIP-1 $\beta$ tras la estimulación de linfocitos T CD8+ en individuos control y pacientes VIH+ de genotipo bb.**

- **Individuos Control:**

La gráfica de la Fig. R.22 y los datos contenidos en la Tabla R.21, reflejan que el comportamiento de los loci A y B tras la inducción con IL-2 y

PHA es similar. En ambos individuos control, la expresión máxima se consigue a las 24 horas de haber recibido el estímulo.

### Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$ total en linfocitos T CD8+ de individuos control (bb)



**Fig. R.22:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control (bb).

También se observa que, a pesar que el locus A se expresa cuantitativamente más que el locus B en cada una de las situaciones estudiadas (más del 64% en el control 1 y 96% en el control 2), el incremento de la expresión (en número de copias) del locus B es proporcionalmente superior al del locus A, al cabo de las 24 horas (13,2 y 11,6 veces más en el control 1 y 2 respectivamente) (Tabla R.21).

<b>Tabla R.21: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de Individuos Control (bb)</b>				
		<b>Tiempos</b>		
		<b>Basal</b>	<b>6 Horas</b>	<b>24 Horas</b>
<b>Control 1</b>	Nº copias Locus A	4.894	8.678	78.751
	Nº copias Locus B	206	1.819	43.296
	Nº copias MIP-1 $\beta$	5.100	10.497	122.678
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	96	83	64
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	4	17	36
	Inducción Locus A (veces) (RB)		1,8	16
	Inducción Locus B (veces) (RB)		8,8	213
	Relación Inducción Locus B / Locus A		4,98	13,2
	Relación expresión Locus A/Locus B	23	4,77	1,79
<b>Control 2</b>	Nº copias Locus A		23	785
	Nº copias Locus B		1	399
	Nº copias MIP-1 $\beta$		24	1.183
	% Locus A / MIP-1 $\beta$		96	96
	% Locus B / MIP-1 $\beta$		4	4
	Inducción Locus A (veces) (R6H)			34
	Inducción Locus B (veces) (R6H)			399
	Relación Inducción Locus B / Locus A			11,6
	Relación expresión Locus A/Locus B		23	1,97

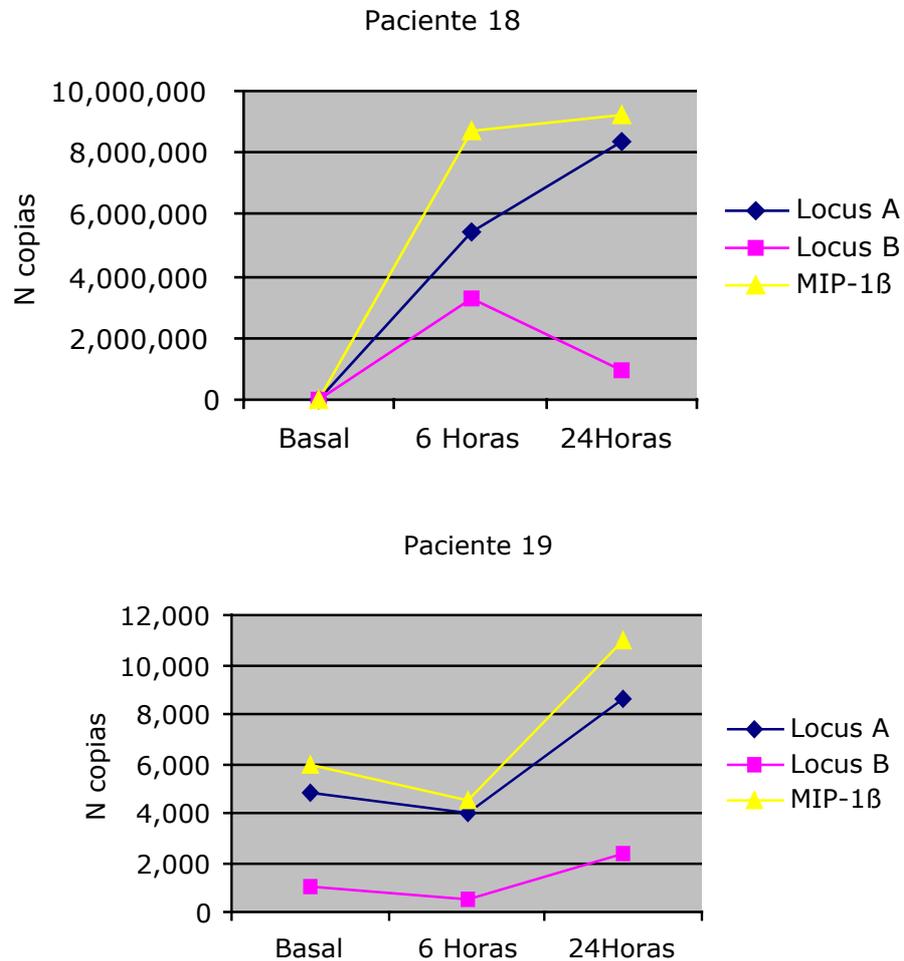
**Tabla R.21:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de individuos control (bb) (RB: Respecto al Basal; R6H: Respecto a las 6H).

- **Pacientes VIH+**

Los resultados obtenidos a partir de las estimulaciones realizadas a los linfocitos T CD8+ de estos pacientes, se encuentran expresados en la Tabla R.22 y en la Fig. R.23

Estas gráficas nos resumen el efecto que producen la IL-2 y el PHA a nivel de la expresión de los dos loci que codifican para MIP-1 $\beta$ . A través de ellas se observan ciertas discrepancias en cuanto a la cinética que refleja el comportamiento del locus B. Mientras en el paciente 19 ambos loci alcanzan su inducción máxima a las 24 horas, en el paciente 18 sólo lo consigue el locus A, ya que el locus B lo hace a las 6 horas.

**Cuantificación de la expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total en linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (bb)**



**Fig R.23:** Cinética de expresión de los loci A y B y de MIP-1 $\beta$  total, tras la estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (bb).

Por otro lado también se ha observado que, a pesar de que el locus B se induce en una mayor proporción que el locus A (1,25 veces más en el paciente 19 a las 24 horas, mientras que en el paciente 18 lo hace a las 6 horas 12,7 veces más), en términos absolutos la expresión del locus A es mucho mayor que la del locus B en ambos pacientes y en cada una de las situaciones evaluadas.

<b>Tabla R.22: Expresión de los loci A y B de MIP-1<math>\beta</math> tras estimulación de linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ (bb)</b>				
		<b>Tiempos</b>		
		<b>Basal</b>	<b>6 Horas</b>	<b>24 Horas</b>
<b>PACIENTE 18</b>	Nº copias Locus A	20.947	5.413.920	8.343.248
	Nº copias Locus B	987	3.262.705	92.144
	Nº copias MIP-1 $\beta$	21.934	8.676.625	9.264.684
	% Locus A / MIP-1 $\beta$	95	62	90
	% Locus B / MIP-1 $\beta$	5	38	10
	Inducción Locus A (veces)		258 (RB)	398 (RB)
	Inducción Locus B (veces)		3.305 (RB)	35 (R6H)
	Relación Inducción Locus B / Locus A		12,7	0,08
	Relación Expresión Locus A/Locus B	21,2	1,66	90
	<b>PACIENTE 19</b>	Nº copias Locus A	4.860	3.974
Nº copias Locus B		1.041	557	2.318
Nº copias MIP-1 $\beta$		5.900	4.532	10.973
% Locus A / MIP-1 $\beta$		82	87	78
% Locus B / MIP-1 $\beta$		18	13	22
Inducción Locus A (veces) (RB)			0,8	1,8
Inducción Locus B (veces) (RB)			0,5	2,2
Relación Inducción Locus B / Locus A			0,65	1,25
Relación Expresión Locus A/Locus B		4,67	7,13	3,73

**Tabla R.22:** Cuantificación normalizada de la expresión del locus A, locus B y MIP-1 $\beta$  tras la estimulación de linfocitos T CD8+ pacientes VIH+ (bb) (RB: Respecto al Basal; R6H: Respecto a las 6H).

### **5.5. Determinación de los niveles de MIP-1 $\beta$ producidos por PBMCs y linfocitos T CD8+ estimulados con IL-2 y PHA.**

Para validar los resultados obtenidos por el estudio de mRNA y determinar si el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ , altera o condiciona de alguna manera la síntesis de la proteína, evaluamos su producción a partir de linfocitos T CD8+ purificados y de PBMCs estimulados con IL-2 y PHA, de pacientes VIH+ e individuos control de genotipo homocigoto (BB) y homocigoto (bb).

Además de esto, el estudio intenta correlacionar los tiempos de inducción máxima de la quimiocina a niveles del mRNA, con los tiempos en que se detecta la mayor producción de esta proteína en el sobrenadante a partir de la estimulación celular.

### 5.5.1. Determinación de los niveles de MIP-1 $\beta$ producidos por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+.

La producción de la quimiocina MIP-1 $\beta$ , a partir de PBMCs estimulados con IL-2 y PHA, tanto de pacientes VIH+ como de individuos control de genotipo homocigoto BB y bb, fue realizada a las 6 horas y a las 24 horas de haber estimulado las células.

- **PBMCs de individuos homocigotos BB:**

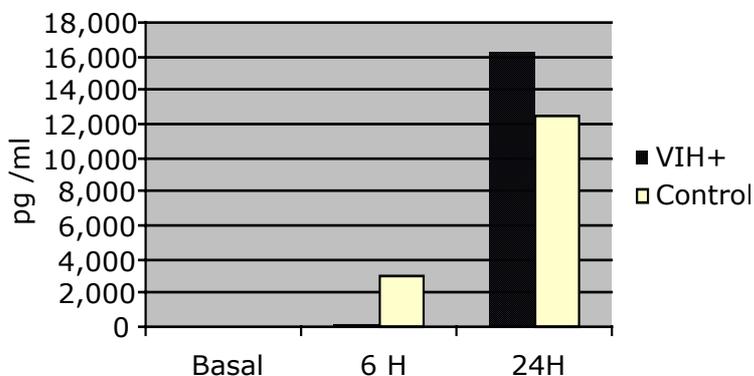
Como se observa en la Tabla R.23, los niveles de quimiocina detectados en estado basal son similares en ambos casos. Sin embargo, al estimular las células, se detectan algunas diferencias en los niveles de proteína que han sido cuantificadas (Fig. R.24 ).

<b>Tabla R.23: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ (BB)</b>			
	<b>Tiempos</b>		
	<b>Basal</b>	<b>6 H</b>	<b>24 H</b>
<b>VIH+</b>	8,8	229,6	16.226
<b>Control</b>	10,8	3.071	12.547

**Tabla R.23:** Cuantificación de la producción de MIP-1 $\beta$  total a partir de linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB), tras su estimulación con IL-2 y PHA en pg/ml.

Durante las primeras 6 horas se observa, que la cantidad de quimiocina que ha sido producida a partir de los PBMCs de los individuos control es mayor a la que se ha detectado en los pacientes VIH+. Sin embargo, los niveles de proteína detectados al cabo de las 24 horas demuestran, que los pacientes VIH+ han sido capaces de sintetizar una mayor cantidad de proteína durante ese tiempo.

**Producción de MIP-1 $\beta$  por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ (BB)**



**Fig. R.24:** Cuantificación de la producción de MIP-1 $\beta$  total, a partir de individuos control y pacientes VIH+ (BB) tras su estimulación con IL-2 y PHA en pg/ml.

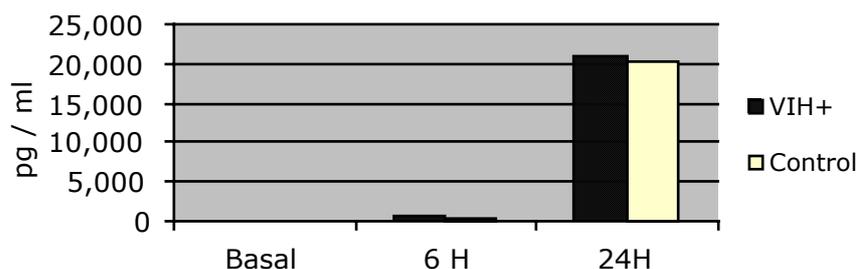
- **PBMCs de individuos homocigotos bb:**

La producción de MIP-1 $\beta$ , a partir de PBMCs tanto de individuos control como de pacientes VIH+, demuestran que en estado de reposo, las células de los controles son capaces de producir más cantidad de proteína que la de los pacientes, como lo muestra la Tabla R.24. Sin embargo, luego de haber inducido las células con IL-2 y PHA, se observa que los niveles de quimiocina que se han producido al transcurrir las 6 horas y las 24 horas, son mayores en los pacientes VIH+ que en los individuos control. (Fig. R.25)

<b>Tabla R.24: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ (bb)</b>			
	<b>Tiempos</b>		
	<b>Basal</b>	<b>6 H</b>	<b>24 H</b>
<b>VIH+</b>	15	686,65	21.040
<b>Control</b>	24,49	354,75	20.144

**Tabla R.24:** Cuantificación de la producción de MIP-1 $\beta$  total, a partir de linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB) tras su estimulación con IL-2 y PHA en pg/ml.

### Producción de MIP-1 $\beta$ por PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ (bb)



**Fig. R.25:** Cuantificación de la producción de MIP-1 $\beta$  total, a partir de individuos control y pacientes VIH+ (BB) tras su estimulación con IL-2 y PHA en pg/ml.

#### 5.5.2. Determinación de los niveles de MIP-1 $\beta$ producidos por linfocitos T CD8+ purificados de individuos control y pacientes VIH+.

La determinación de la quimiocina en el sobrenadante de linfocitos T CD8+, tanto de pacientes VIH+ como de individuos control de genotipo homocigoto BB y bb, fue realizada a las 6 horas y a las 24 horas de haber inducido las células con IL-2 y PHA.

- **Linfocitos T CD8+ de individuos homocigotos BB:**

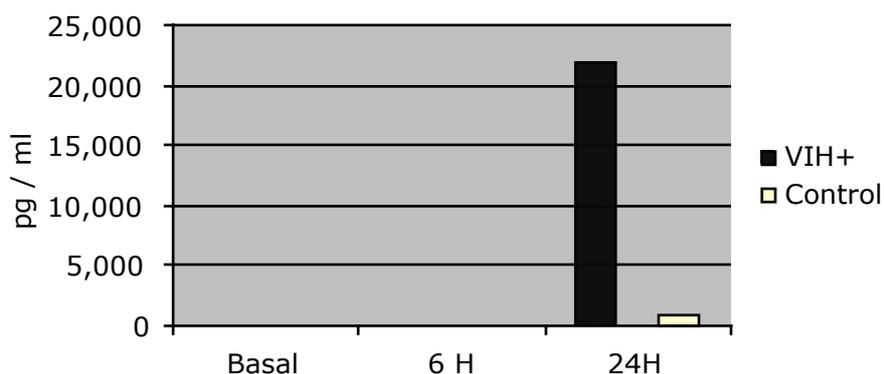
La gráfica que muestra la Figura R.26 refleja, que los niveles de quimiocina secretados a partir de los linfocitos T CD8+ de individuos VIH+, difieren sustancialmente con respecto a los niveles que se detectan en los individuos control. Estas diferencias se observan ya a niveles basales, pero sobre todo después de transcurrir las 24 horas (Tabla R.25).

<b>Tabla R.25: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB)</b>			
	<b>Tiempos</b>		
	<b>Basal</b>	<b>6 H</b>	<b>24 H</b>
<b>VIH+</b>	7,7	482	21.910
<b>Control</b>	15,7	156	940

**Tabla R.25:** Cuantificación de la producción de MIP-1 $\beta$  total, a partir de linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB) tras su estimulación con IL-2 y PHA en pg/ml.

En situación basal, los niveles de quimiocina detectados en los individuos control, representan el doble de los que se han producido a partir de los pacientes VIH+. Sin embargo, luego de inducir las células con IL-2 y PHA, se observa que la producción de proteína en pacientes VIH+ se realiza de una manera más eficiente, detectando diferencias significativas al cabo de las 24 horas. La relación que se establece entre estos valores es aproximadamente 23 veces más.

**Producción de MIP-1 $\beta$  por linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB)**



**Fig. R.26:** Cuantificación de la producción de MIP-1 $\beta$  total, a partir de linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB) tras su estimulación con IL-2 y PHA en pg/ml.

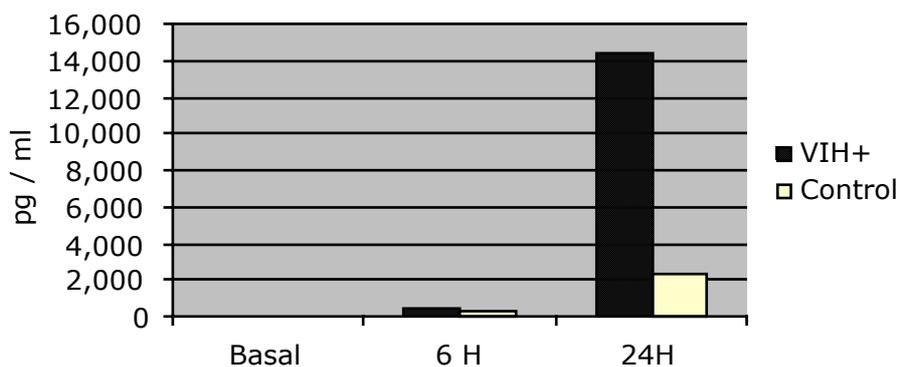
- **Linfocitos T CD8+ de individuos homocigotos bb:**

Los resultados obtenidos a partir de la estimulación de los linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ y de individuos control, muestran algunas diferencias en cuanto a los niveles de MIP-1 $\beta$  sintetizados (Tabla R.26 y Fig. R.27).

<b>Tabla R.26: Producción de MIP-1<math>\beta</math> por linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (bb)</b>			
	<b>Tiempos</b>		
	<b>Basal</b>	<b>6 H</b>	<b>24 H</b>
<b>VIH+</b>	15	499	14.339
<b>Control</b>	16	316	2.263

**Tabla R.26:** Cuantificación de la producción de MIP-1 $\beta$  total, a partir de linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (Bb) tras su estimulación con IL-2 y PHA en pg/ml.

**Producción de MIP-1 $\beta$  por linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (bb)**



**Fig. R.27:** Cuantificación de la producción de MIP-1 $\beta$  total, a partir de linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (bb) tras su estimulación con IL-2 y PHA en pg/ml.

Los niveles de quimiocina que se detectan a niveles basales son prácticamente iguales, tanto en pacientes como en controles (Tabla R.26). Sin embargo, a partir del momento en que se estimulan las células, se detecta una mayor cantidad de proteína en los pacientes VIH+, especialmente al transcurrir las 24 horas, donde la cantidad de quimiocina que ha sido producida hasta ese momento, es significativamente mayor a la que se detecta en los individuos control (6,3 veces más).

## **5.6. Estudio de la expresión del receptor CCR5 en PBMCs y linfocitos T CD8+ purificados, estimulados con IL-2 y PHA de individuos control y pacientes VIH+.**

### **5.6.1. Estudio de la expresión del receptor CCR5 en monocitos estimulados con IL-2 y PHA.**

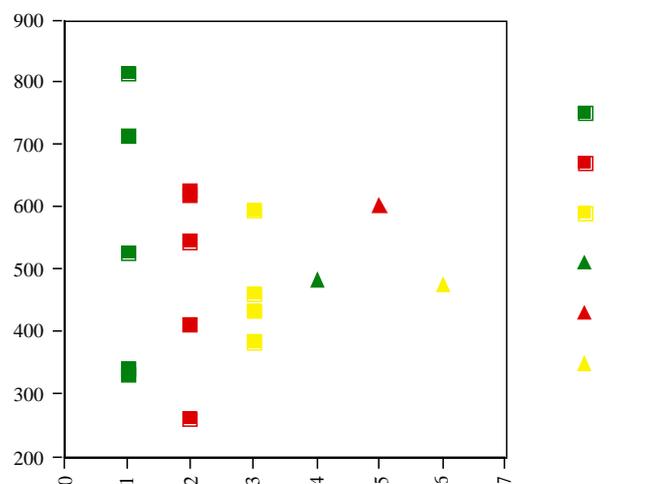
Para establecer las posibles diferencias de expresión del receptor CCR5 en monocitos (analizados en base a FSC y SSC) de individuos control y pacientes VIH+ y determinar si estos pudieran estar relacionados con el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ , marcamos con anticuerpos anti-CCR5 las células y determinamos las diferencias a niveles absolutos y relativos entre los monocitos de pacientes y los controles, al igual que los diferentes genotipos entre sí.

En cuanto a los controles, se observa un menor porcentaje de monocitos que expresan CCR5 en el individuo Homocigoto BB (7%), aunque en términos absolutos sea el homocigoto bb, el que presente un menor número de células positivas para el receptor (476 céls/ $\mu$ l) (Fig. R.28 y Tabla R.27). Por el contrario se ha visto, que si bien el individuo heterocigoto y el homocigoto bb, son los que presentan en promedio un mayor porcentaje de monocitos que expresan CCR5 (8%), en términos absolutos es el heterocigoto, el que presentan el mayor número de monocitos con expresión positiva para el receptor (601 céls/ $\mu$ l), ya que del homocigoto bb sólo 476 céls/ $\mu$ l expresan el receptor.

Tabla R.27: Expresión de CCR5 en Monocitos de individuos control y pacientes VIH+						
		Monocitos (%)		Monocitos Abs (cél/s/μl)		
		Media		Media		
<b>Pacientes</b>	BB	10.40	± 3,13	BB	546	± 215
	Bb	9.20	± 2,38	Bb	492	± 155
	bb	6.25	± 0,95	bb	468	± 89
<b>Controles</b>	BB	7		BB	482	
	Bb	8		Bb	601	
	bb	8		bb	476	

**Tabla R.27:** Expresión del receptor CCR5 en monocitos tanto en términos porcentuales como absolutos, tras la estimulación con PHA e IL-2.

### Expresión de CCR5 en monocitos de individuos control y pacientes VIH+ (BB, Bb, bb)



**Fig. R.28:** Expresión del receptor CCR5 en monocitos de individuos control y pacientes VIH+, tras la estimulación con PHA e IL-2.

En cuanto a los pacientes, se observa que tanto en porcentaje (6,25%) como en términos absolutos (468 células/μl), los homocigotos bb son los que presentan el menor número de células con expresión de CCR5. Por

el contrario los homocigotos BB son los que presentan la mayor proporción de monocitos con expresión para este receptor (10,4%).

### 5.6.2. Estudio de la expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD4+ de PBMCs estimulados con IL-2 y PHA.

A partir de la estimulación de los PBMCs de individuos control y pacientes VIH+ realizada con IL-2 y PHA, se hizo un marcaje utilizando anticuerpos específicos para la molécula CD4 y el receptor CCR5, con el fin de determinar las posibles diferencias que puedan existir entre la expresión del receptor y esta subpoblación linfocitaria; en relación a los diferentes genotipos, para el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ .

Los resultados obtenidos nos reflejan que la expresión del CCR5 en linfocitos T CD4+ es diferente en individuos control y en pacientes VIH+ (Fig. R.29 y Tabla R.28).

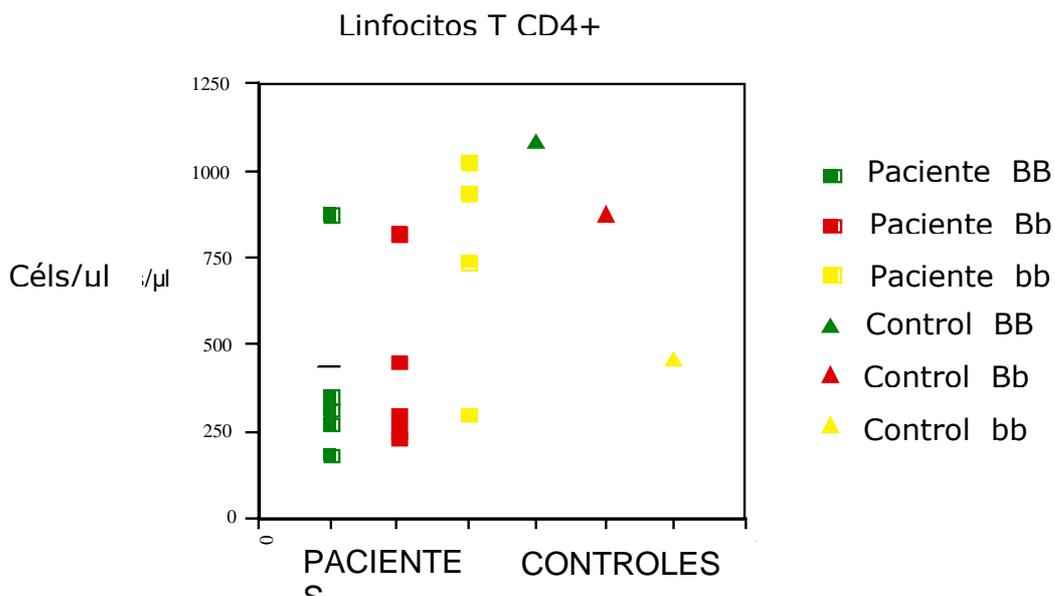
Tabla R.28: Expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ de individuos control y pacientes VIH+						
		CD4 (%)		CD4 Abs (céls/ $\mu$ l)		
		Media		Media		
<b>Pacientes</b>	BB	20,8	$\pm$ 9,7	BB	392.80	$\pm$ 273
	Bb	24,4	$\pm$ 5,3	Bb	407.20	$\pm$ 244
	bb	28,0	$\pm$ 9,4	bb	747.75	$\pm$ 323
<b>Controles</b>	BB	47,0		BB	1085	
	Bb	42,0		Bb	872	
	bb	27,0		bb	455	

**Tabla R.28:** Expresión del receptor CCR5, en términos porcentuales y absolutos, en linfocitos T CD4+ tras la estimulación con PHA e IL-2.

Tanto en valores absolutos como en valores relativos, la cantidad de células T CD4+ que expresan este receptor en los pacientes es inversa a la que se observa en los individuos control y pareciera estar relacionada con la presencia del alelo polimórfico del locus B de MIP-1 $\beta$ .

En los individuos control se observa que el sujeto de genotipo BB, presenta un mayor porcentaje de linfocitos que expresan CCR5 (47%), mientras que en el individuo homocigoto bb, se detectan niveles inferiores de expresión (27%). Esta situación se ha visto alterada en el caso de los pacientes VIH+, donde los portadores del genotipo BB, presentan la media de expresión más baja en estas células (20,8%), a diferencia de los pacientes de genotipo bb, en los que se han detectado los niveles promedio de expresión más altos (28%).

**Expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB, Bb, bb)**



**Fig. R.29:** Expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD4+ de individuos control y pacientes VIH+ tras la estimulación con PHA e IL-2.

### 5.6.3. Estudio de la expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD8+ de PBMCs estimulados con IL-2 y PHA.

A partir de las estimulaciones realizadas de los linfocitos T CD8+, quisimos determinar si existe alguna diferencia en la expresión del receptor CCR5 y esta subpoblación celular de pacientes VIH+, con respecto a los individuos control (con genotipos diferente para el polimorfismo de MIP-1 $\beta$ ), tanto en términos relativos como en valores absolutos. Para ellos hicimos un marcaje con anticuerpos específicos para el receptor.

Los resultados obtenidos demuestran que la expresión del receptor CCR5 predomina más sobre los linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ que sobre las células de los individuos control (Fig. R.30 y Tabla R.29).

Tabla R.29: Expresión de CCR5 en linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+						
		CD8 (%)			CD8 Abs (cél/s/ $\mu$ l)	
		Media			Media	
<b>Pacientes</b>	BB	54	$\pm$ 7,9	BB	949	$\pm$ 207
	Bb	42	$\pm$ 13,8	Bb	1.628	$\pm$ 684
	bb	44	$\pm$ 5,4	bb	1.144	$\pm$ 326
<b>Controles</b>	BB	17		BB	401	
	Bb	15		Bb	312	
	bb	21		bb	356	

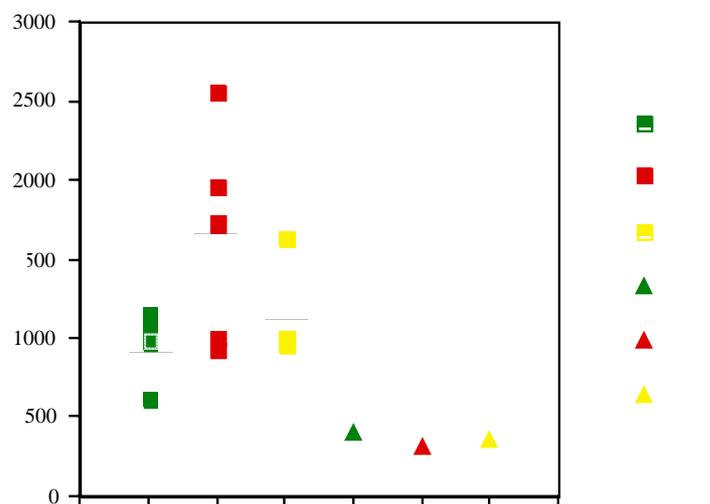
**Tabla R.29:** Expresión del receptor CCR5, en linfocitos T CD8+ tanto en términos porcentuales como absolutos, tras la estimulación con PHA e IL-2.

En cuanto a los controles, se observa que existen pequeñas diferencias entre los valores absolutos y relativos de las células que expresan el receptor y los genotipos evaluados. Se ha determinado que el individuo bb es el que presenta un mayor porcentaje de células que expresan CCR5 (21%); sin embargo en términos absolutos, es el homocigoto BB el que presenta más células con expresión positiva para este receptor (401 células/ $\mu$ l), a pesar de que en términos relativos, sólo el 17% de la células expresen el receptor. Así mismo se observa que tanto en términos

porcentuales (15%), como en términos relativos (312 céls/ $\mu$ l), el individuo heterocigoto Bb es el que revela una menor expresión.

En cuanto a los pacientes VIH+, se observa que existen diferencias más marcadas en cuanto al número de células totales que expresan el receptor, entre los diferentes genotipos y con respecto a los controles. En los pacientes de genotipo BB se observa la mayor expresión del receptor, donde el 54% de las células promedio son positivas para él, y que representa el triple de la que se obtuvo por parte de los individuos BB controles. Por otro lado, los pacientes de genotipo bb, muestran un menor porcentaje de células que expresan este receptor (44%); sin embargo este porcentaje es el doble del individuo control. Por su parte los heterocigotos, en términos porcentuales son los que presentan una menor expresión del receptor (42%), a pesar de que los valores absolutos reflejen que son el grupo que presenta más células con expresión positiva (1.628 céluas/ $\mu$ l).

#### Expresión de CCR5 en linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ (BB, Bb, bb)



**Fig. R.30:** Expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD8+ de individuos control y pacientes VIH+ tras la estimulación con PHA e IL-2.

## 6. DISCUSIÓN

Entre las diversas características de las quimiocinas, la duplicidad de funciones redundantes entre ellas se acompaña de duplicidades genéticas en muchos de los casos. La razón que explica la aparición de copias alélicas, estrechamente relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional, no está del todo claro, aunque sin duda esta duplicidad puede resultar ventajosa para suplir funciones originales de una proteína que ha sido alterada (esta alteración puede pasar inadvertida en muchos de los casos) o para posibilitar la aparición de nuevas funciones.

Aunque es ampliamente conocido, es sin duda pertinente recordar que la evolución de las especies depende de la variación genética y de la selección natural de la misma. En este sentido los fenotipos, que son los que incrementan la capacidad de adaptación de los organismos en un ambiente dado, vienen determinados por los genotipos individuales.

La diversidad de genotipos que se presentan en una población dada, es el producto de la mezcla de genes en cada generación, que originan diferentes combinaciones genotípicas en los descendientes. A pesar de que estas nuevas combinaciones genotípicas se producen en cada generación mediante la transmisión y la recombinación mendeliana, este proceso habitualmente no da lugar a nuevos alelos, por lo que únicamente a partir de mutaciones es que se logra obtener nueva información genética.

En base a estos conceptos, es que decidimos orientar nuestros estudios hacia la evaluación del papel del polimorfismo de MIP-1 $\beta$ , comparando su participación fisiopatogénica, tanto en la población normal como en diferentes poblaciones patológicas, entre las cuales los pacientes VIH+ se presentan como un grupo candidato en el que el citado polimorfismo, posiblemente podría jugar un papel patogénico importante.

### **6.1. Metodologías desarrolladas para determinar el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ .**

De manera general, se habla de polimorfismo cuando para un mismo carácter, se observan dos o más variantes alélicas en una misma población. Más concretamente, el término polimorfismo genético se refiere a las

variantes de secuencias que en una población tiene un determinado gen. En el caso del locus B de la quimiocina MIP-1 $\beta$ , el cambio de base que se produce a nivel de la secuencia aceptora del segundo intrón favorece la aparición de un lugar aceptor no-canónico para el proceso de corte y unión del mRNA y provoca la síntesis de una proteína más pequeña. Además, como todos los polimorfismos genéticos, éste puede utilizarse como marcador de determinados grupos de la población, aunque en casos como el que nos ocupa, en el que el polimorfismo varía según la longitud del mRNA procesado, es habitual encontrar una herencia codominante.

En este estudio, con el fin de determinar el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$  aplicamos la técnica de PCR-SSP, que se fundamenta en la detección de sustituciones de una sola base en el fragmento de DNA que ha sido analizado por amplificación específica. De esta manera, a partir de una simple amplificación por PCR del DNA genómico, utilizando cebadores específicos capaces de reconocer de forma precisa la base que ha sido alterada, es posible distinguir la presencia del alelo polimórfico (alelo b). De hecho, la técnica fue diseñada para que amplificara únicamente aquellos individuos portadores del alelo polimórfico, de manera que sólo los individuos homocigotos bb y heterocigotos Bb podrían ser amplificados por esta pareja de cebadores. Una vez amplificados cada uno de estos genotipos, la diferenciación entre ellos se basaría en la comparación de las intensidades obtenidas en el gel de agarosa, tras haber realizado la electroforesis del amplímero: en el caso de los individuos homocigotos bb, se esperaba obtener una intensidad de señal superior a la de los individuos heterocigotos, ya que presenta el doble de la carga alélica; sin embargo en muchos de los casos no ocurrió así. En cuanto a los individuos homocigotos BB, la interpretación de los resultados fue más certera y precisa, a pesar de basarse en la ausencia de amplímero, situación en principio no recomendable cuando se trabaja con la PCR. En cualquier caso, el hecho de que la interpretación de los resultados se basara únicamente en la comparación visual entre las intensidades arrojadas a partir de la amplificación de los controles (muestras de genotipo conocido previamente secuenciadas) y de los pacientes, resultó ser la limitante más importante de esta técnica.

Las imprecisiones de esta técnica se hicieron evidentes a la hora de determinar la distribución de homocigotos y heterocigotos en base a una herencia mendeliana, a partir las frecuencias alélicas de cada uno de los grupos, puesto que el estudio rindió resultados diferentes a los esperados. En nuestro caso, si bien esta técnica sencilla hubiese podido definir el polimorfismo en las diferentes poblaciones estudiadas, su importante nivel de imprecisión a la hora de interpretar los resultados hizo que buscásemos otras alternativas.

De este modo, al realizar la hibridación de las muestras con sondas específicas, se pudo observar que el principal error cometido al interpretar los resultados obtenidos por PCR fue la discriminación entre los individuos homocigotos bb y los heterocigotos, puesto que la PCR-SSP nos hacía sobrevaluar en la mayoría de los casos las intensidades de los heterocigotos, confundiéndolos con homocigotos bb.

Respecto a la técnica de hibridación, aunque experimentalmente resulta un poco más compleja y engorrosa, que la técnica de amplificación por PCR, los resultados fueron (como era de esperar), más precisos y confiables. Fue por esta razón por la que decidimos corroborar los resultados ya obtenidos, a través de esta segunda metodología.

El DNA de los individuos sometidos al estudio, previamente inmovilizado en una membrana de nitrocelulosa, fue hibridado con sondas marcadas radiactivamente que reconocen de forma específica el alelo mutado (alelo b) y el alelo canónico (alelo B). La interpretación de los resultados se hizo de forma visual, correlacionando las intensidades arrojadas por las membranas hibridadas con las dos sondas. La correspondencia entre ambos resultados fue decisiva a la hora de interpretar los diferentes genotipos y fue lo que hizo aumentar el grado de precisión en los resultados obtenidos. Sin embargo, esta técnica, a pesar de que mostró ser bastante más confiable y precisa, también resultó ser mucho más engorrosa en su puesta a punto. La diferencia de una sola base en la secuencia genómica provoca que las temperaturas de hibridación y de los lavados correspondientes sean ligeramente diferentes; además esta pequeña diferencia teórica se redujo de manera significativa en la práctica, ocasionando problemas a la hora de definir las temperaturas a usar en el protocolo a seguir.

Además de la aplicación de estas dos metodologías, también fue realizada la secuenciación de las muestras a partir de una amplificación genérica con el fin de determinar inequívocamente el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ . Esta técnica sin duda, resultó ser la más específica, la más confiable y la que nos permitió definir el verdadero genotipo de algunos casos muy puntuales, en los que éste no se podía precisar con las técnicas anteriores. Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas vale la pena recalcar, que hubiera sido poco recomendable determinar por esta técnica, el genotipo de todos y cada uno de los individuos debido al costo sumamente elevado que esto hubiera implicado.

Finalmente, los resultados obtenidos a través de esta metodología, en conjunción con los resultados previamente determinados por la PCR y la hibridación, muestran que respecto a la distribución alélica del polimorfismo (en la población normal), el alelo b es claramente minoritario (16,5%) pero superior al 1% convenido como valor mínimo de referencia para valorar la "validez genética" de un polimorfismo (Jorde L., Carey J. and White R., 1996). Así mismo se pudo establecer, que la distribución genotípica y la frecuencia alélica del polimorfismo del locus B, en individuos afectados de enfermedades tiroideas, diabetes *mellitus* y hepatitis C, se corresponde con los valores obtenidos en la población normal. En cambio, los pacientes VIH+ analizados muestran diferencias claras y estadísticamente significativas en cuanto a su distribución genotípica poblacional, con respecto a los individuos sanos. En estos pacientes se encuentra que el porcentaje de los individuos heterocigotos (36,9%) es una vez y media más que el de los individuos heterocigotos sanos (27,0%), y los homocigotos bb (8,6%) VIH+ son aproximadamente el triple de los homocigotos bb (3,0%) sanos. Así mismo se observa, que el porcentaje de los pacientes VIH+ homocigotos BB (51,7%) es mucho menor que el encontrado en los individuos sanos (70,0%). Cabe reseñar, que esta mayor distribución del alelo b en pacientes VIH+, también se observa como tendencia en la infección por el VHC, aunque con una menor significancia estadística. Sin embargo, sólo en los pacientes VIH+ se observa una mayor discrepancia entre la distribución poblacional de éste polimorfismo y las frecuencias de los alelos b y B.

## **6.2. Influencia del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ en pacientes VIH+ y su relación con otros parámetros clínicos.**

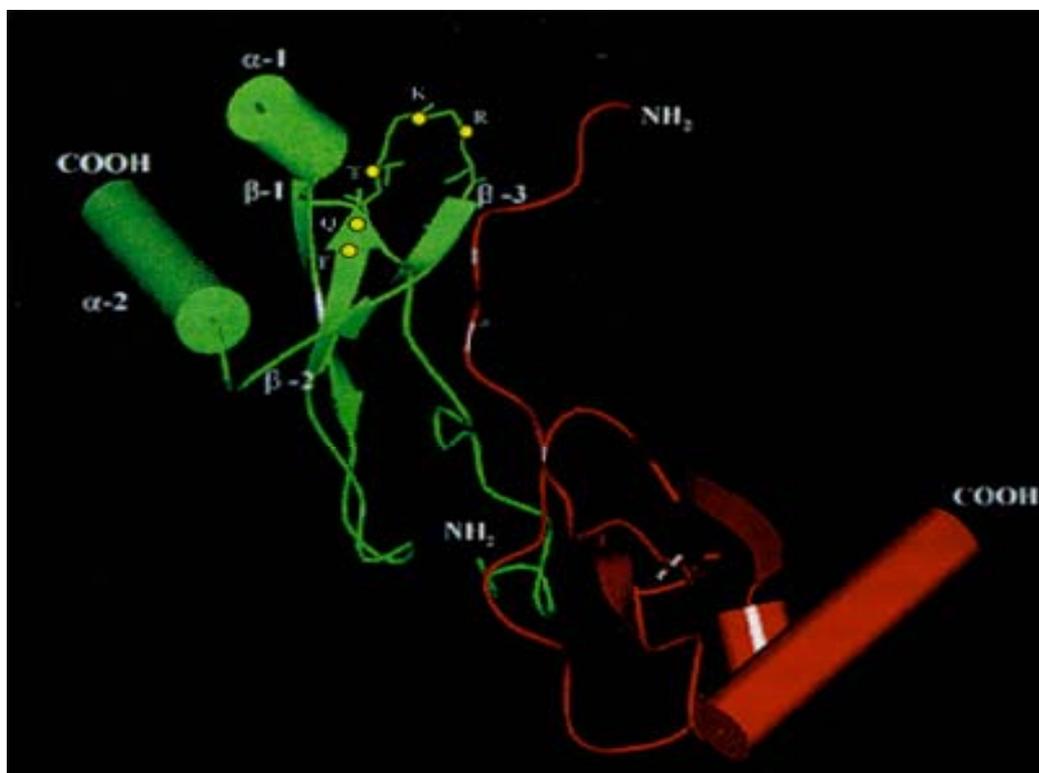
La quimiocina MIP-1 $\beta$ , como se ha comentado previamente en la introducción, es ligando natural del receptor de quimiocinas CCR5, al igual que MIP-1 $\alpha$  y RANTES. La importancia de estas tres quimiocinas en la historia natural de la infección por el VIH, quedó definida por Cocchi y colaboradores (Cocchi *et al.*, 1995), al identificarlas como los principales factores supresores de las cepas M-trópicas, que se caracterizan por infectar células de la estirpe monocito-macrofágica. El efecto anti-viral que ejercen estas quimiocinas quedó demostrado al identificar al CCR5 como uno de los correceptores del VIH. Como se ha dicho, la actividad anti-viral de estas quimiocinas es ejercida a través del receptor CCR5, bien sea a través de un bloqueo del mismo (impidiendo que el virus se una a él), o bien por medio de una *down* regulación de éste en la superficie celular. De esta manera el virus queda "imposibilitado" para unirse a su receptor y provocar la infección.

El polimorfismo descrito para el locus B de la quimiocina de MIP-1 $\beta$ , en el que se produce un cambio a nivel del DNA genómico en la secuencia aceptora del segundo intrón, provoca la delección de las primeras 15 pb del exón 3, y en consecuencia la síntesis de una proteína que carece de 5 aa. Estos aminoácidos son Phe<sub>65</sub>, Gln<sub>66</sub>, Thr<sub>67</sub>, Lys<sub>68</sub> y Arg<sub>69</sub> (Fig. 1.D). Estudios de la estructura proteica de MIP-1 $\beta$ , revelan que los aminoácidos Phe<sub>65</sub>, Thr<sub>67</sub> y Lys<sub>68</sub> son residuos que se encuentran altamente conservados en la familia de las CC quimiocinas. También se ha descrito que los residuos Phe<sub>65</sub> y Gln<sub>66</sub> son residuos que intervienen en la formación de la segunda hoja  $\beta$ , que mantiene de alguna forma la estabilidad de la estructura, al interactuar con la primera y la tercera hoja  $\beta$  (Ashhab, 1998).

Por otro lado, se ha descrito que ésta quimiocina se puede presentar en forma de dímeros o tetrámeros en solución (Clore and Gronenborn, 1995; Czaplewski *et al.*, 1999) y que el estado de multimerización en que se encuentre adquiere cierta importancia, al revelar que ésta proteína es capaz de unirse a su receptor, en forma de dímeros o monómeros, con efectos funcionales distintos (Laurence *et al.*, 1998).

La carencia de estos aminoácidos pudieran ejercer un efecto negativo en cuanto a la estructura proteica, en primer lugar porque alterarían la formación de la segunda hoja  $\beta$  y en segundo lugar, porque se verían comprometidas las interacciones que se establecen entre la segunda y la tercera hoja de la estructura proteica. En definitiva, esta delección podría alterar tanto la estabilidad de la proteína como la capacidad de formar dímeros, y en consecuencia provocar cambios en la función biológica original o tal vez pérdida de la misma.

### Estructura dimérica de MIP-1 $\beta$



**Fig. D.1:** Esquema de la estructura dimérica normal en la que se indica el segmento delecionado de cinco aminoácidos (FQTKR) con puntos amarillos. Las dos hélices  $\alpha$  y las tres hojas  $\beta$  también se muestran en esta estructura, que fue obtenida a partir de la base de datos y del análisis proteico utilizando el programa Turbo-Frodo (Imágen obtenida gracias a la colaboración del Dr. Baldomer Oliva).

Los resultados obtenidos a partir del estudio del polimorfismo que hemos realizado en los pacientes VIH+ demuestran, que éstos presentan

una distribución genómica diferente a la que se observa en la población normal. Estas frecuencias de homocigotos y heterocigotos, sin duda, determinan la frecuencia alélica de la población, y en este estudio su comparación corrobora que existe una diferencia significativa en cuanto a la incidencia del alelo polimórfico en pacientes VIH+ (28,5%) con respecto a los individuos sanos (16,5%).

Hipotéticamente hablando pudiéramos suponer que la quimiocina MIP-1 $\beta$ t codificada por el alelo b, al carecer de estos cinco aminoácidos, perdería su estabilidad proteica y por ende sus funciones biológicas normales. Si recordamos que MIP-1 $\beta$  presenta propiedades anti-virales y protege en cierta forma a las células del huésped frente a la infección por el VIH de las cepas M-trópicas (principalmente), pudiéramos suponer que en los individuos homocigotos bb, en los que ambos alelos polimórficos codifican inevitablemente una proteína no plenamente funcional, las células quedarían parcialmente “desprotegidas” frente a la infección del virus. De esta manera, los individuos homocigotos bb tendrían más probabilidades de contraer la infección.

En cuanto a los pacientes VIH+ de genotipo heterocigoto, si bien es cierto que no quedan totalmente “desprotegidos”, ya que portan el alelo B (que codifica para una proteína funcional), sí que pudiéramos pensar que presentan una mayor susceptibilidad frente a la infección por el VIH de cepas M-trópicas. Esta suposición se pudiera explicar, a través de la diferencia de las frecuencias genómicas que se observan en estos individuos respecto a los controles sanos, y que en consecuencia contribuyen a que en los pacientes VIH+ la frecuencia del alelo polimórfico (28,5%) sea mayor a la que se observa en los individuos control (16,5%).

Sin embargo, esta teoría adquiriría una mayor importancia si se comprueba que el locus B de la quimiocina MIP-1 $\beta$  desempeña un rol funcional distinto al del locus A, ya que si esto no es cierto y ambas quimiocinas promueven actividades biológicas similares, parece lógico asumir que la quimiocina MIP-1 $\beta$ , codificada por el locus A, debería compensar la incapacidad de MIP-1 $\beta$ t en el desempeño de las actividades biológicas normales. Es por ello que se precisa la realización de estudios funcionales adicionales que determinen las diferencias y similitudes entre ambos loci del gen de MIP-1 $\beta$ .

En el proceso de infección por el VIH que transcurre desde el momento en que el virus es capaz de penetrar las células del huésped hasta que se desarrolla la enfermedad o SIDA, hay varios parámetros clínicos a tener en cuenta y que son indicativos de la evolución del proceso. Estos parámetros son los valores de los linfocitos T CD4+, los T CD8+ y la carga viral principalmente.

Se ha descrito que los niveles de los linfocitos T CD4+ tienden a estar disminuidos desde el primer momento de la infección, debido a que la molécula CD4 que se expresa en la superficie de estas células es el principal receptor del virus. Por su parte la carga viral tiende a variar dependiendo de la capacidad funcional del sistema inmunitario: se ha demostrado que ésta se encuentra aumentada en la fase inicial de la enfermedad y posteriormente tiende a aumentar de nuevo en la fase progresiva de la misma. Sin embargo los linfocitos T CD8+, que son los que constituyen la principal defensa inmunológica contra el virus, bien sea a través de la liberación de  $\beta$ -quimiocinas (como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES) o ejerciendo un efecto citolítico y directo sobre las células que presenten el antígeno, comienzan a disminuir en la etapa final de la enfermedad (Yang O., 1998), cuando el virus ha vencido el sistema inmune y se pone de manifiesto el deterioro generalizado de este sistema.

Tomando en cuenta estos tres parámetros, definitorios y característicos de la enfermedad, evaluamos como la presencia del alelo polimórfico condiciona de alguna manera las fluctuaciones o los niveles de estas variables.

Los resultados obtenidos a partir del estudio multiparamétrico, en el que se confrontaron estas tres variables con el genotipo de los pacientes, indican que sólo existe una clara relación estadísticamente significativa con los linfocitos T CD4+ ( $p=0,038$ ), aunque pudimos observar que el genotipo de MIP-1 $\beta$  por sí solo, no tiene peso estadístico a la hora de definir la distribución multiparamétrica de una población.

Por otro lado, la quimiocina MIP-1 $\beta$ t pudiera tener una implicación biológica importante, al suponer que la alteración que se produce en su estructura proteica pudiera comprometer la interacción con los proteoglicanos e impedir que ésta se concentre en los lugares donde se está produciendo el proceso inflamatorio, lo cual constituye un paso fundamental

en el reclutamiento de subtipos celulares específicos, y cuya mala función podría explicar una disminución de la respuesta celular específica. De éste modo, se pudiera plantear de forma hipotética, que esta quimiocina una vez secretada por las células responsables, al no poder adherirse a los proteoglicanos, no se mantendría en los tejidos, y pudiera ser eliminada con mayor facilidad. Sin embargo, antes de hacer algún tipo de afirmación concluyente, habría que realizar ensayos que demuestren esta posibilidad.

### **6.3. Utilidad y aplicabilidad del Estándar Interno en la valoración del mRNA de MIP-1 $\beta$ .**

Las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  se han caracterizado por intervenir en el desarrollo de múltiples actividades fisiológicas y patológicas como hemos mencionado anteriormente en la introducción. Así, su expresión y producción local definen la localización de ciertas células inmunitarias, contribuyendo al buen funcionamiento del sistema. Por otro lado, el hecho de que estas quimiocinas no sean constitutivas, sino que se induzcan bajo ciertas condiciones especiales, nos obligan a evaluar de forma cuantitativa la expresión del RNA mensajero en cada una de ellas, ya que los cambios que se produzcan a estos niveles, pudieran implicar alteraciones en el comportamiento y el desempeño de funciones distintas en las células.

La falta de reactivos específicos (Acs específicos) contra las variantes, nos impide aplicar métodos de detección proteicos para su evaluación diferencial, por lo que el análisis de la cantidad de mRNA, a pesar de que constituye un método indirecto, es por el momento la única aproximación posible.

La necesidad de crear una herramienta que nos permita un estudio preciso de la expresión de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , radica en la existencia de dos loci génicos codificantes (locus A y locus B) semejantes, pero distintos, para cada una de ellas. Así, hay que tener en cuenta la gran similitud que existe entre ambos loci, donde los mensajeros no sólo se asemejan en tamaño (en longitud son prácticamente iguales), sino que sus secuencias aminoacídicas presentan un 99% de homología. Este hecho nos obliga a diseñar estrategias muy precisas que permitan discriminar entre las diferentes isoformas y estudiarlas por separado, determinando así la

contribución de cada uno de los loci en el proceso de síntesis global de la quimiocina.

Para este tipo de análisis, la técnica de RT-PCR permite realizar el estudio; sin embargo, hay que tener en cuenta que en el proceso de amplificación, las cinéticas de cada uno de los moldes pueden converger en la meseta de máxima amplificación, lo cual hace necesario controlar en que momento se encuentra la reacción. Hace unos años, existían diferentes maneras de controlar el proceso, aunque el uso de controles internos (en el mismo tubo de la reacción) había demostrado ser la metodología más idónea. Sin embargo, desde que se desarrolló la técnica de PCR a tiempo real, a través de la cual se puede monitorizar todo el proceso de amplificación, es posible cuantificar de una manera global y más precisa el amplímero que se ha generado.

Además de la aplicación de la RT-PCR, para poder estudiar cada una de las isoformas por separado, es necesaria la aplicación de otra técnica que nos permita una discriminación entre loci, teniendo en cuenta la elevada homología de sus secuencias. En este estudio optamos por la utilización de la enzima MspI, una enzima de restricción que nos permite diferenciar cada uno de los loci a estudiar por la longitud de los fragmentos de restricción de los amplímeros (RT-AFLP). Sin embargo, además de la diferenciación de cada uno de estos fragmentos era necesaria su cuantificación, para lo cual empleamos el Estándar Interno que sirve como control de la digestión (y de la amplificación si hace falta), asegurando de alguna forma la eficacia de cada uno de los procesos.

El control del proceso de digestión se torna realmente imprescindible en el caso de MIP-1 $\beta$  donde, a pesar de que las homologías de los loci A y B son muy elevadas, la diferencia nucleotídica que presentan sus secuencias, se puede discriminar utilizando la enzima de restricción MspI. La secuencia diana de esta enzima (CCGG) sólo está presente en el cDNA del locus A, ya que el locus B presenta otra secuencia (CTGG). Esta diferencia provoca que se generen dos fragmentos a partir de la digestión del locus A, mientras que el locus B permanece sin ser digerido y conserva su tamaño original.

Definir el porcentaje de digestión es importante, ya que nos permite no sobrevalorar la cantidad de locus B y no subvalorar la cantidad de locus A, ya que al no producirse una digestión total, queda una proporción de

locus A sin digerir y si esto no se contabiliza, esta parte de A es cuantificada como locus B. De esta manera, al controlar el proceso global, podremos recuantificar finalmente cada uno de los loci y valorar de forma más exacta, la participación de ellos en el proceso de expresión de la proteína. La aplicación de esta metodología al estudio de la inducción de ambos loci de MIP-1 $\beta$  en las células U-937, nos ha permitido demostrar que ambos loci pueden regularse de manera distinta bajo determinados estímulos. Además, los estudios muestran que el locus B, en general contribuye de manera minoritaria a la síntesis del mRNA de MIP-1 $\beta$ , siendo el locus A, el principal responsable de la misma.

Aunque los resultados obtenidos a partir de la técnica de rt-PCR (PCR a tiempo real), confirman que la aproximación metodológica con el Estándar Interno parece proporcionar resultados globalmente equiparables y por lo tanto aceptables, con la rt-PCR no es necesario el uso del Estándar para controlar este proceso de amplificación, puesto que esta técnica permite un seguimiento continuo de la reacción de amplificación. Con la rt-PCR se realiza una cuantificación de forma global, a través de la utilización de amplímero de concentración conocida que permite definir valores de amplificación estandarizables.

De esta forma, a través de la combinación de la rt-PCR (que cuantifica las quimiocinas de forma global), y posteriormente la adición del estándar Interno (que controla el proceso de digestión), se puede determinar de una manera fiable la participación de cada uno de los loci en el proceso de síntesis global de cada quimiocina.

#### **6.4. Expresión diferencial de MIP-1 $\beta$ en PBMCs y linfocitos T CD8+.**

El importante papel que juega la producción de MIP-1 $\beta$  por parte de los PBMCs y sobre todo por los linfocitos T CD8+, en la fisiopatología de la infección por el VIH se ha comentado ampliamente, sin embargo cabe recordar de nuevo que en condiciones normales los niveles de MIP-1 $\beta$  que se pueden detectar en las diferentes células y tejidos son muy bajos o imperceptibles, y debido a que ésta es una quimiocina inducible, al igual que MIP-1 $\alpha$ , se precisa un estímulo que favorezca su expresión.

Estudios anteriores han demostrado que la infección por el VIH es capaz de inducir de manera importante, la producción de MIP-1 $\beta$ , tanto en PBMCs (Zagury *et al.*, 1998) como en linfocitos T CD8+ (Cocchi *et al.*, 1995), y que los niveles detectados en ambos casos se han asociado con diferentes estadios de la enfermedad (Ullum *et al.*, 1998; Cocchi *et al.*, 2000).

El papel de estas  $\beta$ -quimiocinas en la patogénesis del VIH ha sido demostrado hace unos años. El estudio realizado por Cocchi y colaboradores señala que los niveles de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  producidos a partir de linfocitos T CD8+ son significativamente menores en pacientes VIH+ con valores de linfocitos T CD4+ inferiores a las 200 céls / $\mu$ l, que los niveles detectados en pacientes asintomáticos (niveles de CD4+ superiores a las 200 céls/ $\mu$ l), mientras que, en cuanto a la producción de RANTES, no se encontró ninguna asociación (Cocchi *et al.*, 2000). Por lo tanto, la producción de estas quimiocinas a partir de las células T CD8+ se correlaciona con los niveles de linfocitos T CD4+, con los de CD8+ y en consecuencia, con el diagnóstico clínico del paciente. Por otro lado, también estos estudios reportaron que los niveles de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES, producidos por linfocitos T CD8+ activados, eran suficientes para suprimir la infección de células por la cepa M-trópica del VIH-1 *in vitro*, constituyendo de esta forma el principal componente anti-viral contra el VIH.

En nuestro estudio hemos intentado evaluar si existe alguna relación entre el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$  y la expresión de esta quimiocina a partir de linfocitos T CD8+ activados. Al evaluar los tiempos en que se induce la mayor cantidad de quimiocina, tanto en pacientes VIH+ como en individuos sanos de diferente genotipo, se pudo observar que en los individuos homocigotos bb la expresión de esta quimiocina se da de forma más retrasada en ambos grupos (a las 24 horas). También hemos observado, que en los pacientes VIH+ de genotipo heterocigoto, la inducción máxima de MIP-1 $\beta$  se consigue a las 24 horas, mientras que en los controles sanos se da a las 6 horas. El conjunto de estos datos nos hace suponer, que el cambio de base producido en la secuencia aceptora del segundo intrón, del locus B de MIP-1 $\beta$ , además de crear un lugar aceptor no-canónico, puede influir en los procesos de transcripción celular, provocando un retraso en la expresión proteica. Por el contrario, el

polimorfismo del locus B no pareciera influir de ninguna manera en la estimulación de MIP-1 $\beta$  por parte de los PBMCs activados de pacientes VIH+. Los picos de inducción máxima de la expresión de este locus se producen a los mismos tiempos, tanto en homocigotos BB, como en heterocigotos y homocigotos bb. Sólo en el individuo sano bb, la presencia de este alelo sí que pareciera influir en el retraso de la expresión de esta quimiocina. La aportación de los monocitos y del resto de linfocitos puede explicar esta diferencia con respecto a los linfocitos T CD8+.

Las diferencias de expresión de MIP-1 $\beta$ , que se observan a partir de estos grupos celulares en los diferentes genotipos, pudieran explicarse a través de dos suposiciones: en primer lugar, si la mutación que origina el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$  se acompaña de otra mutación en la zona de transcripción, ésta podría comprometer de algún modo el proceso de regulación de la expresión del mRNA de esta quimiocina; y en segundo lugar, si la mutación que se produce en alelo b, alterara el proceso de transcripción normal de la quimiocina codificada por el alelo B, bien sea de forma positiva o negativa, las condiciones normales de síntesis de ésta quimiocina se verían alteradas y pudiera darse el caso, que una hipotética retroalimentación sobre la regulación de la transcripción llegara a producir cambios en los niveles de mRNA. La primera suposición sin embargo, tendría que ser confirmada a través del estudio de la región 5' reguladora de este gen, que compruebe que existe algún cambio de estas secuencias y que pudieran alterar preferencialmente la inducción de la expresión en los linfocitos T CD8+. De cualquier manera, en base a cualquiera de estas dos situaciones podríamos explicar el retraso que se observa en la expresión de MIP-1 $\beta$ , por parte de los linfocitos T CD8+ de genotipo homocigoto bb, con respecto a los homocigotos BB. Por su parte los heterocigotos controles, a pesar de que también portan el alelo polimórfico, no evidencian un retraso en su expresión al estimular los linfocitos T CD8+. El hecho de que en los pacientes VIH+ sí que se produzca este retraso, podría explicar una mayor "demanda" en la producción del locus B (en comparación con los controles), puesto que ya se ha comentado, que en los VIH+ la inducción de MIP-1 $\beta$  es claramente superior. Por otro lado, destaca también que en algunos pacientes VIH+, se demuestra una inducción preferencial del locus B, que

llega a superar la cantidad de mRNA del locus A en un efecto no observado nunca en los controles sanos.

Por otro lado, las diferencias que se observan en cuanto a la expresión de MIP-1 $\beta$ , por parte de los linfocitos T CD8+ y los PBMCs, pudieran deberse a las diferencias que presentan ambos grupos celulares en sus secuencias genómicas. Estudios ya comentados en la introducción, a nivel genómico de la zona 5' reguladora de la quimiocina MIP-1 $\beta$  demuestran que existen tres copias de la secuencia 5'-GAGGAA-3', que representa el sitio de unión para el factor de transcripción PU.1 (Klemsz *et al.*, 1990). La expresión de este factor sólo se ha observado en monocitos y linfocitos B, pero no en linfocitos T (Ziegler *et al.*, 1991). Por lo tanto, la presencia de este factor en estos grupos celulares, pudiera jugar un papel importante en la expresión de MIP-1 $\beta$  por monocitos y linfocitos B activados. En base a este hecho, se pudiera explicar de alguna forma, las diferencias que se observan en cuanto a la expresión de MIP-1 $\beta$  a partir de PBMCs estimulados de individuos control y pacientes VIH+ de genotipo bb, en los que la hipotética mutación de las 15 pb pudiera haber alterado la regulación de esta "zona no T", o que la retroalimentación afectara también sólo a estas zonas.

#### **6.5. Influencia del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ en la expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD4+, T CD8+ y monocitos.**

El receptor de CC quimiocinas CCR5 representa uno de los elementos principales que intervienen en la fisiopatología de la infección por el VIH, desde que se identificó como uno de los principales correceptores de las cepas M-trópicas de este virus.

El CCR5, al permitir junto con la molécula de CD4 la entrada del virus a la célula, es capaz de promover una fuerte resistencia frente al mismo, cuando se altera su estructura original a causa de la delección de 32 pb a nivel del DNA genómico. La resultante de esta delección es una proteína no funcional que no se expresa en la superficie de la célula y por lo tanto otorga cierta resistencia frente al virus. La expresión de este receptor en monocitos, linfocitos T CD4+ y T CD8+ está ampliamente documentada.

También se ha descrito que la intervención de diferentes estímulos, tanto endógenos como exógenos, regulan de forma positiva o negativa la expresión de CCR5 en la superficie de estas células. Diferentes estudios han demostrado que la IL-2 es capaz de inducir la expresión de este receptor en la superficie de los PBMCs (Patterson *et al.*, 1999) y de los linfocitos (Bleul *et al.*, 1997). Por el contrario, se ha observado que sus ligandos (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES) pueden actuar ejerciendo el efecto inverso luego de haber activado la célula.

En nuestro estudio, quisimos correlacionar el polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$  con la expresión diferencial que experimenta este receptor, en los distintos tipos celulares (linfocitos T CD4+, CD8+ y monocitos) de pacientes VIH+, y evaluar de alguna forma, si la alteración de esta quimiocina determina o influye en los cambios que se producen a este nivel.

En cuanto a los linfocitos T CD4+, se observa que la expresión de este receptor, en condiciones normales (ausencia de infección viral), es mucho mayor en los individuos homocigotos BB que en los heterocigotos y a su vez el número de células T CD4+ que expresan CCR5 en estos últimos, es mayor que en los individuos homocigotos bb. A diferencia de los individuos control, en los pacientes VIH+, la distribución en la expresión de este receptor en linfocitos T CD4+ es totalmente inversa, en los distintos genotipos. En estos pacientes son los individuos homocigotos bb, los que presentan una mayor expresión del receptor, mientras que los homocigotos BB lo expresan en menor proporción.

Si bien es cierto que la dimerización de la quimiocina es importante para que ésta se una al receptor de forma eficiente y se produzca una disminución de la expresión, tras la activación promovida, pudiéramos suponer, que la alteración proteica que afecta a la quimiocina MIP-1 $\beta$ t, codificada por el locus b, afectaría la estabilidad natural de la proteína, alterando su dimerización y en consecuencia afectaría también la unión del ligando a su receptor. Si esto fuera cierto, ya que serían necesarias las pruebas funcionales con esta proteína para afirmar esta suposición, la quimiocina no actuaría eficazmente sobre su receptor, ni induciría las actividades biológicas normales sobre el mismo, incluyendo la *down* regulación de su expresión en la superficie de la célula. Por lo tanto, la

expresión del receptor se mantendría aumentada, y favorecería la posibilidad de interacción entre el virus y la célula.

En cuanto a los linfocitos T CD8+, se observa que la expresión del receptor CCR5 en individuos normales es homogénea y no presenta diferencias entre un genotipo y otro. Sin embargo, a diferencia de éstos, en los pacientes VIH+ además de producirse un aumento en la expresión de este receptor, se observan algunas diferencias entre los distintos genotipos. Mientras que el aumento de expresión que se produce en los pacientes homocigotos, tanto bb como BB es equivalente y no presenta diferencias, el aumento que se observa en los pacientes heterocigotos es mucho mayor. Esta diferencia de expresión entre los heterocigotos y ambos grupos de homocigotos pudieran ser provocadas por las interacciones que se establecen entre las dos formas de la quimiocina, codificadas a partir de los alelos b y B que presentan estos individuos. En este sentido, probablemente la presencia de la forma MIP-1βt podría alterar la estabilidad de la forma MIP-1β o tal vez interferir en las interacciones de MIP-1β con el receptor y restar o disminuir la activación que esta quimiocina es capaz de ejercer sobre este receptor de manera normal. Por lo tanto, si la activación del receptor modula su expresión en la superficie de la célula, al verse alterada probablemente por la escasa eficiencia de esta quimiocina, se mantendría aumentada su expresión y en consecuencia las probabilidades de que el virus interactúe con éste. En cualquier caso, esto no deja ser sólo una elucubración que intenta explicar este resultado tan intrigante.

A diferencia de los dos tipos celulares anteriores, en los que se observan algunas diferencias de expresión del receptor CCR5 entre los individuos controles y los pacientes VIH+, a nivel de los diferentes genotipos, en los monocitos no ocurre lo mismo. En individuos controles, la expresión del receptor CCR5 se distribuye de forma homogénea entre los diferentes genotipos, al igual que ocurre en los pacientes VIH+. Así mismo, tampoco se observan diferencias claras entre pacientes y controles, y los resultados indican que no pareciera existir alguna tendencia definida, en relación con el genotipo de MIP-1β.

## **6.6. Relación del polimorfismo del locus B de MIP-1 $\beta$ con los polimorfismos del receptor de quimiocinas CCR5 y de la quimiocina SDF-1, en la población de pacientes VIH+.**

Como ya hemos reiterado en múltiples ocasiones a lo largo de este trabajo, la historia natural de la infección por el virus del VIH, se puede ver alterada, de forma positiva (retrasando la aparición del SIDA), o bien de forma negativa (acelerando la aparición de la enfermedad), gracias a la intervención de diversos elementos (los receptores de quimiocinas CCR5 y el CXCR4, y las quimiocinas SDF-1, MIP- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  y RANTES) que intervienen e interactúan con el virus de forma directa o indirecta, regulando de alguna forma el proceso de infección.

La importancia de CCR5 en la fisiopatogenia de la infección por el VIH, se debe a la delección de 32 pb en la secuencia de este gen, que provoca la síntesis de una proteína más corta y defectuosa que no es capaz de expresarse en la membrana celular, y que le confiere cierta resistencia a las células frente a las cepas (M-trópicas del virus principalmente).

Por otro lado, el polimorfismo descrito para la quimiocina SDF-1, debido a un cambio de base a nivel del pre-mRNA, provoca un defecto en la traducción de esta quimiocina en su forma  $\beta$ . Esta alteración se ha visto asociada con una regulación positiva de la biosíntesis de la forma  $\alpha$  de esta quimiocina, mostrando una mejora en la progresión de la enfermedad en aquellos individuos que portan este alelo.

A partir de lo anteriormente expuesto, nuestro estudio ha evaluado, si existe alguna relación en cuanto al polimorfismo del receptor CCR5 y de la quimiocina SDF-1, respecto al que hemos descrito para el locus B de MIP-1 $\beta$ .

En cuanto a CCR5, los valores obtenidos demuestran que el mayor porcentaje de heterocigotos CCR5+/CCR5 $\Delta$ 32 se encuentran distribuidos dentro del grupo de los VIH+ Bb (56,2%). Esta diferencia provoca que la distribución del alelo CCR5 $\Delta$ 32 sea mucho mayor dentro de este grupo (8,8%) en relación a la que se obtuvo en los pacientes BB y bb (4,3% y 0% respectivamente).

Teniendo presente que el alelo b de MIP-1 $\beta$  codifica para una proteína más pequeña, inestable y "poco funcional", y que los individuos

heterocigotos para este polimorfismo son portadores de este alelo, y además, conociendo que CCR5 $\Delta$ 32 es un alelo que ofrece cierta protección a las células, frente a la infección del VIH por las cepas M-trópicas, pudiéramos suponer que, el aumento de la frecuencia alélica de CCR5 $\Delta$ 32, dentro de este grupo (VIH+Bb), compensaría de alguna forma la carencia funcional del alelo b, protegiendo a la célula y al individuo frente a la infección por el VIH.

En cuanto a SDF-1, hemos observado que la distribución del alelo SDF-1 3'A dentro de los grupos de pacientes VIH+ BB, bb y el grupo general (que incluye los tres genotipos) es menor a la distribución que se observa en los pacientes VIH+ de genotipo bb.

Sabiendo que la presencia del alelo SDF-1 3'A, en los pacientes VIH+ influye en una progresión favorable, ya que retrasa la aparición del SIDA, pudiéramos pensar que el porcentaje aumentado de este alelo en el grupo de los pacientes VIH+ de genotipo bb se debe a una compensación de la funcionalidad de la quimiocina MIP-1 $\beta$  por parte de SDF-1. Estos individuos, al presentar ambos alelos polimórficos, no serían capaces de producir una quimiocina normal y "funcional", quedando eventualmente "desprotegidos" frente a la infección por el virus. De esta manera, la regulación positiva que se produce a nivel de la biosíntesis de la forma  $\alpha$  de la quimiocina SDF-1 (provocada por el defecto del gen SDF-1 3'A), compensaría de alguna forma (a nivel general), los defectos de MIP-1 $\beta$ .

Sin embargo, el hecho de no contar con un mayor número de muestras evaluadas para ambos polimorfismos, nos impide sacar conclusiones más precisas, y dado que ésto no deja de ser sólo una aproximación hipotética, que intenta explicar lo que hemos observado, estos datos sólo sirven para ampliar las áreas a analizar.

Finalmente, a partir de todos estos resultados, podemos establecer que MIP-1 $\beta$  ejerce un efecto diferencial sobre sus células diana, debido a las distintas iso- y alo-formas que presenta. De este modo, las diferencias en los niveles de expresión, que se observan tanto en PBMCs como en linfocitos T CD8+, de individuos control y pacientes VIH+, posiblemente se deben a una alteración en la regulación génica normal de esta quimiocina, relacionada de algún modo con la acción de estas variantes.

Estamos pués frente a resultados que apuntan hacia nuevos campos de estudio, en los que la variabilidad de acción de lo codificado se multiplica ante la presencia de la redundancia genética, variaciones en los mecanismos de regulación y polimorfismos interindividuales, siendo las quimiocinas como la CCL4 uno de los ejemplos más sujerentes; en el que además, la función final se interrelaciona y modula dentro de una amplia red de elementos redundantes.

## **7. CONCLUSIONES:**

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

### **7.1. CONCLUSIONES METODOLÓGICAS:**

7.1.1. Respecto a la técnica de tipificación alélica del polimorfismo del locus B de la quimiocina MIP-1 $\beta$ :

7.1.1.1. La técnica de PCR-SSP proporciona resultados de rápida valoración aunque relativamente poco confiables por su baja precisión.

7.1.1.2. La técnica de PCR-SSO con hibridación proporciona resultados precisos y fiables que permiten una tipificación exacta del polimorfismo.

7.1.1.3. La secuenciación nucleotídica es la metodología más segura y precisa.

7.1.2. Respecto a la rt-PCR para la cuantificación diferencial de los loci A y B en el mRNA transcrito de MIP-1 $\beta$ :

7.1.2.1. La técnica de rt-PCR permite cuantificar con rapidez y precisión la cantidad de mensajero de MIP-1 $\beta$  y de MIP-1 $\alpha$ .

7.1.2.2. El uso del estándar interno permite determinar cuantitativamente la expresión de los loci A y B de las quimiocinas MIP-1  $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , definiendo la contribución relativa de cada locus al total de la quimiocina individual.

### **7.2. CONCLUSIONES BIOLÓGICO- FUNCIONALES:**

7.2.1. Respecto a la valoración del polimorfismo del locus B de la quimiocina MIP-1 $\beta$ :

- 7.2.1.1. La frecuencia genómica en la población normal es la siguiente: El 70% de los individuos son homocigotos BB, el 27% heterocigotos (Bb) y el 3% homocigotos para el alelo polimórfico (bb).
  - 7.2.1.2. La frecuencia alélica en la población normal es la siguiente: 83% de alelos B y 16,5% del alelo b.
  - 7.2.1.3. Los pacientes VIH+ son los que presentan más discrepancias con respecto a la población normal, en cuanto a frecuencia alélica y frecuencia genómica (frecuencia alélica  $p=0.0065$ ), mostrando interesantes relaciones con el polimorfismo de CCR5 y en menor grado con el de SDF-1.
- 7.2.2. Respecto a la regulación de la expresión de mRNA de MIP-1 $\beta$ :
- 7.2.2.1. Si bien los loci A y B, se regulan de manera diferente en las células U-937, las cinéticas de expresión de mRNA son equivalentes en PBMCs y linfocitos T CD8+ de pacientes VIH+ y en controles.
  - 7.2.2.2. En general el locus B contribuye de manera minoritaria a la síntesis de mRNA de MIP-1 $\beta$ , siendo más importante su expresión en los linfocitos T CD8+ que en los monocitos; en cambio los PBMCs de algunos pacientes VIH+, presentan una inducción preferencial del locus B, efecto no observado en los controles.
  - 7.2.2.3. En cuanto a la cinética de inducción del mRNA destaca el retraso que muestran los linfocitos T CD8+ de los heterocigotos Bb y los homocigotos bb.
  - 7.2.2.4. Los niveles de expresión del receptor CCR5 en linfocitos T CD4+ de pacientes VIH+ son diferentes a los que presentan los controles, mientras que en los T CD8+ y monocitos son similares; aunque los linfocitos T CD8+ de los pacientes VIH+ heterocigotos muestran un mayor nivel de CCR5.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adema, G. J., F. Hartgers, et al. (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." Nature **387**(6634): 713-7.
- Ahuja SK., M. P. (1993). "Molecular piracy of mammalian interleukin-8 receptor type B by Herpesvirus saimiri." J. Biol. Chem **268**: 20691-94.
- Alcami, J., T. Lain de Lera, et al. (1995). "Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes." Embo J **14**(7): 1552-60.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-8.
- Amara, A., S. L. Gall, et al. (1997). "HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha- dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication." J Exp Med **186**(1): 139-46.
- Arvanitakis, L., E. Geras-Raaka, et al. (1997). "Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein- coupled receptor linked to cell proliferation." Nature **385**(6614): 347-50.
- Ashhab, Y. (1998). "B-Chemokines in thyroid autoimmunity." Tesis doctoral. UAB.
- Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1996). "NF-kappa B: ten years after." Cell **87**(1): 13-20.
- Baixeras, E., S. Roman-Roman, et al. (1990). "Cloning and expression of a lymphocyte activation gene (LAG-1)." Mol Immunol **27**(11): 1091-102.
- Balaji, K. N., N. Schaschke, et al. (2002). "Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self- destruction after degranulation." J Exp Med **196**(4): 493-503
- Baldwin, J. M. (1993). "The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors." Embo J **12**(4): 1693-703.

- Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." Nature **226**(252): 1209-11.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-71.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." Nature **385**(6617): 640-4.
- Bazzoni, F., M. A. Cassatella, et al. (1991). "Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8." J Exp Med **173**(3): 771-4.
- Beato, M. (1989). "Gene regulation by steroid hormones." Cell **56**(3): 335-44.
- Begg, G. S., D. S. Pepper, et al. (1978). "Complete covalent structure of human beta-thromboglobulin." Biochemistry **17**(9): 1739-44.
- Berkhout, T. A., H. M. Sarau, et al. (1997). "Cloning, in vitro expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of the monocyte chemotactic protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B." J Biol Chem **272**(26): 16404-13.
- Berkowitz, R. D., K. P. Beckerman, et al. (1998). "CXCR4 and CCR5 expression delineates targets for HIV-1 disruption of T cell differentiation." J Immunol **161**(7): 3702-10.
- Bermejo, M., J. Martin-Serrano, et al. (1998). "Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains." Eur J Immunol **28**(10): 3192-204.
- Bernstein, M. S., S. E. Tong-Starksen, et al. (1991). "Activation of human monocyte--derived macrophages with lipopolysaccharide decreases human immunodeficiency virus replication in vitro at the level of gene expression." J Clin Invest **88**(2): 540-5.
- Berson, J. F., D. Long, et al. (1996). "A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T- cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains." J Virol **70**(9): 6288-95.
- Biti, R., R. Ffrench, et al. (1997). "HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele." Nat Med **3**(3): 252-3.

- Blanpain, C., B. Lee, et al. (1999). "Extracellular cysteines of CCR5 are required for chemokine binding, but dispensable for HIV-1 coreceptor activity." J Biol Chem **274**(27): 18902-8.
- Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature **382**(6594): 829-33.
- Bleul, C. C., L. Wu, et al. (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1925-30.
- Blum, S., R. E. Forsdyke, et al. (1990). "Three human homologs of a murine gene encoding an inhibitor of stem cell proliferation." DNA Cell Biol **9**(8): 589-602.
- Bluman, E. M., K. J. Bartynski, et al. (1996). "Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines." J Clin Invest **97**(12): 2722-7.
- Bonecchi, R., G. Bianchi, et al. (1998). "Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s." J Exp Med **187**(1): 129-34.
- Borrow, P., H. Lewicki, et al. (1994). "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol **68**(9): 6103-10.
- Boyden, S. E. (1962). "The chemotactic effects of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes." J Exp Med **115**: 453-66.
- Brelot, A., N. Heveker, et al. (1997). "Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity." J Virol **71**(6): 4744-51.
- Brinchmann, J. E., G. Gaudernack, et al. (1990). "CD8+ T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4+ T cells. Evidence for a soluble inhibitor." J Immunol **144**(8): 2961-6.
- Brown, K. D., S. M. Zurawski, et al. (1989). "A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents,

- growth factors, and indicators of various activation processes." J Immunol **142**(2): 679-87.
- Broxmeyer, H. E., Sherry, B., Cooper, S., Lu, L., Maze, R., Beckmann, M.P., Cerami, A., and Ralph, P. (1995). "Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor." J Immunol **150**: 3448-3458.
- Buchbinder, S. P., M. H. Katz, et al. (1994). "Long-term HIV-1 infection without immunologic progression." Aids **8**(8): 1123-8.
- Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, et al. (1993). "A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells." Nature **365**(6447): 666-9.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1992). "Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6580-4.
- Burd, P. R., H. W. Rogers, et al. (1989). "Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines." J Exp Med **170**(1): 245-57.
- Campbell, J. J., J. Pan, et al. (1999). "Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation." J Immunol **163**(5): 2353-7.
- Carroll, R. G., J. L. Riley, et al. (1997). "Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells." Science **276**(5310): 273-6.
- Cella, M., A. Engering, et al. (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." Nature **388**(6644): 782-7.
- Cella, M., M. Salio, et al. (1999). "Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA." J Exp Med **189**(5): 821-9.
- Chang, H. C. and E. L. Reinherz (1989). "Isolation and characterization of a cDNA encoding a putative cytokine which is induced by stimulation via the CD2 structure on human T lymphocytes." Eur J Immunol **19**(6): 1045-51.

- Cheng-Mayer, C., D. Seto, et al. (1988). "Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host." Science **240**(4848): 80-2.
- Choe, H., M. Farzan, et al. (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." Cell **85**(7): 1135-48.
- Clavel, F., D. Guetard, et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." Science **233**(4761): 343-6.
- Clore, G. M. and A. M. Gronenborn (1995). "Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines." Faseb J **9**(1): 57-62.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, et al. (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-5.
- Coffin, J., A. Haase, et al. (1986). "Human immunodeficiency viruses." Science **232**(4751): 697.
- Combadiere, C., S. K. Ahuja, et al. (1996). "Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES." J Leukoc Biol **60**(1): 147-52.
- Conner, R. I., and Ho, D.D (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression." J Virol(68): 4400-4408.
- Conner, R. I., Mohri, H., Cao, Y., and Ho, D.D (1993). "Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+T lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals." J. Virol **67**: 1772-1777.
- Cook, D. N., M. A. Beck, et al. (1995). "Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection." Science **269**(5230): 1583-5.
- Covell, D. G., G. W. Smythers, et al. (1994). "Analysis of hydrophobicity in the alpha and beta chemokine families and its relevance to dimerization." Protein Sci **3**(11): 2064-72.

- Dairaghi, D. J., K. Franz-Bacon, et al. (1998). "Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  induces migration and activation of human thymocytes." Blood **91**(8): 2905-13.
- Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.
- D'Ambrosio, D., A. Iellem, et al. (1998). "Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells." J Immunol **161**(10): 5111-5.
- De Meester, I., S. Korom, et al. (1999). "CD26, let it cut or cut it down." Immunol Today **20**(8): 367-75.
- Dean, M., M. Carrington, et al. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study." Science **273**(5283): 1856-62.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.
- Deuel, T. F., P. S. Keim, et al. (1977). "Amino acid sequence of human platelet factor 4." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(6): 2256-8.
- Deuel, T. F., R. M. Senior, et al. (1981). "Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(7): 4584-7.
- Deutsch, E., and Kain, W. (1961). "In Blood Platelets,." (ed. S.A. Johanson) Little Brown, Boston: 337.
- Deutsch, E., Johanson, SA., and Seegers, W.H. (1955). Circ Res **3**: 110-115.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, et al. (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." J Exp Med **188**(2): 373-86.
- Doms, R. W. and S. C. Peiper (1997). "Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry." Virology **235**(2): 179-90.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-73.

- Driscoll, K. E., D. G. Hassenbein, et al. (1995). "TNF alpha and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure." Toxicol Lett **82-83**: 483-9.
- Dunon, D., L. Piali, et al. (1996). "To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm." Curr Opin Cell Biol **8**(5): 714-23.
- Embretson, J., M. Zupancic, et al. (1993). "Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS." Nature **362**(6418): 359-62.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
- Finzi, D., M. Hermankova, et al. (1997). "Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy." Science **278**(5341): 1295-300.
- Flesch, I. E., J. Barsig, et al. (1998). "Differential chemokine response of murine macrophages stimulated with cytokines and infected with *Listeria monocytogenes*." Int Immunol **10**(6): 757-65.
- Forster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**(1): 23-33.
- Franchin, G., G. Zybarth, et al. (2000). "Lipopolysaccharide inhibits HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages through direct and sustained down-regulation of CC chemokine receptor 5." J Immunol **164**(5): 2592-601.
- Freed, E. O., D. J. Myers, et al. (1991). "Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain." J Virol **65**(1): 190-4.
- Gallin, J. I., Goldstein, I. M., and Snyderman, R. (1992). "Inflammation: Basic principles and clinical correlates." Raven Press, New York.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, et al. (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS." Science **224**(4648): 500-3.
- Gao, F., L. Yue, et al. (1994). "Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology." J Virol **68**(11): 7433-47.

- Gaynor, R. (1992). "Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression." Aids **6**(4): 347-63.
- Gendleman, H. E., Orenstein, L., Baca, B. (1986). "The macrophages in the persistence of HIV infection." AIDS **3**: 475-495.
- Gerber, B. O., M. P. Zanni, et al. (1997). "Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils." Curr Biol **7**(11): 836-43.
- Godiska, R., D. Chantry, et al. (1997). "Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells." J Exp Med **185**(9): 1595-604.
- Goldstein, I. M. "Complement: biologically active products." Inflammation(second edition, New York, Raven): 55-74.
- Gong, W., O. M. Howard, et al. (1998). "Monocyte chemotactic protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry/replication." J Biol Chem **273**(8): 4289-92.
- Goodenow, M., T. Huet, et al. (1989). "HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions." J Acquir Immune Defic Syndr **2**(4): 344-52.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, et al. (1981). "Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency." N Engl J Med **305**(24): 1425-31.
- Graham, G. J., J. MacKenzie, et al. (1994). "Aggregation of the chemokine MIP-1 alpha is a dynamic and reversible phenomenon. Biochemical and biological analyses." J Biol Chem **269**(7): 4974-8.
- Granelli-Piperno, A., B. Moser, et al. (1996). "Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors." J Exp Med **184**(6): 2433-8.
- Greene, W. C. (1991). "The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection." N Engl J Med **324**(5): 308-17.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-23.

- Gunn, M. D., S. Kyuwa, et al. (1999). "Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization." J Exp Med **189**(3): 451-60.
- Gunn, M. D., K. Tangemann, et al. (1998). "A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 258-63.
- Guo, H., Y. X. Jin, et al. (1998). "Regulation of beta-chemokine mRNA expression in adult rat astrocytes by lipopolysaccharide, proinflammatory and immunoregulatory cytokines." Scand J Immunol **48**(5): 502-8.
- Gupta, S. K., P. G. Lysko, et al. (1998). "Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines." J Biol Chem **273**(7): 4282-7.
- Hammond, A. L., J. Lewis, et al. (2001). "Antigenic variation within the CD4 binding site of human immunodeficiency virus type 1 gp120: effects on chemokine receptor utilization." J Virol **75**(12): 5593-603.
- Haribabu, B., R. M. Richardson, et al. (1997). "Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization." J Biol Chem **272**(45): 28726-31.
- Hariharan, D., S. D. Douglas, et al. (1999). "Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes." Blood **93**(4): 1137-44.
- Herold, K. C., J. Lu, et al. (1997). "Regulation of C-C chemokine production by murine T cells by CD28/B7 costimulation." J Immunol **159**(9): 4150-3.
- Hewson, T. J., J. J. Logie, et al. (2001). "A CCR5-dependent novel mechanism for type 1 HIV gp120 induced loss of macrophage cell surface CD4." J Immunol **166**(8): 4835-42.
- Hieshima, K., T. Imai, et al. (1997). "A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes." J Immunol **159**(3): 1140-9.

- Hill, C. M. and D. R. Littman (1996). "Natural resistance to HIV?" Nature **382**(6593): 668-9.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, et al. (1989). "An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2." Nature **339**(6223): 389-92.
- Horuk, R. (1994). "Molecular properties of the chemokine receptor family." Trends Pharmacol Sci **15**(5): 159-65.
- Huang, Y., W. A. Paxton, et al. (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **2**(11): 1240-3.
- Huet, T., R. Cheynier, et al. (1990). "Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1." Nature **345**(6273): 356-9.
- Hwang, S. B. (1990). "Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms." J. Lipid Med **2**: 123-58.
- Imai, T., K. Hieshima, et al. (1997). "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion." Cell **91**(4): 521-30.
- Imai, T., M. Nagira, et al. (1999). "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine." Int Immunol **11**(1): 81-8.
- Imai, T., T. Yoshida, et al. (1996). "Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector." J Biol Chem **271**(35): 21514-21.
- Ioannidis, J. P., T. R. O'Brien, et al. (1998). "Genetic effects on HIV disease progression." Nat Med **4**(5): 536.
- Irving, S. G., P. F. Zipfel, et al. (1990). "Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q." Nucleic Acids Res **18**(11): 3261-70.
- Isegawa, Y., Z. Ping, et al. (1998). "Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor." J Virol **72**(7): 6104-12.
- Ishii, N., M. Tada, et al. (1998). "Human astrocytoma cells are capable of producing macrophage inflammatory protein-1beta." J Neurooncol **37**(1): 17-23.

- Ivanoff, L. A., J. W. Dubay, et al. (1992). "V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity." Virology **187**(2): 423-32.
- Jorde, L., Carey, J., Raymond, L., (1996). "Genética médica". Mosby. 1 Edición.
- Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, et al. (1994). "Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation." J Exp Med **179**(3): 881-7.
- Jourdan, P., C. Abbal, et al. (1998). "IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells." J Immunol **160**(9): 4153-7.
- Karin, M., A. Haslinger, et al. (1984). "Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene." Nature **308**(5959): 513-9.
- Karsten, V., S. Gordon, et al. (1996). "HIV-1 envelope glycoprotein gp120 down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor-alpha." Immunology **88**(1): 55-60.
- Kasama, T., R. M. Strieter, et al. (1995). "Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis." J Clin Invest **95**(6): 2868-76.
- Kelner GS, K. J., Bacon KB, Kleyensteuber S., Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Shall TJ, et al (1994). "Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine." Science **266**(5189): 1395-1399.
- Kelner, G. S. and A. Zlotnik (1995). "Cytokine production profile of early thymocytes and the characterization of a new class of chemokine." J Leukoc Biol **57**(5): 778-81.
- Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." Nature **312**(5996): 767-8.
- Klemsz, M. J., S. R. McKercher, et al. (1990). "The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene." Cell **61**(1): 113-24.

- Koopman, W., and Krangel, M.S. (1997). "Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein -1 alpha." J. Biol. Chem. **272**: 10103-10109.
- Kornbluth, R. S., K. Kee, et al. (1998). "CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1- suppressive beta-chemokines." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5205-10.
- Kornbluth, R. S., P. S. Oh, et al. (1989). "Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro." J Exp Med **169**(3): 1137-51.
- Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." J Virol **68**(7): 4650-5.
- Krakauer, T. (1999). "Induction of CC chemokines in human peripheral blood mononuclear cells by staphylococcal exotoxins and its prevention by pentoxifylline." J Leukoc Biol **66**(1): 158-64.
- Krzysiek, R., E. A. Lefevre, et al. (1999). "Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokine production in human B cells." J Immunol **162**(8): 4455-63.
- Kurihara, T., G. Warr, et al. (1997). "Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor." J Exp Med **186**(10): 1757-62.
- Laurence, J. S., C. Blanpain, et al. (2000). "CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding." Biochemistry **39**(12): 3401-9.
- Laurence, J. S., A. C. LiWang, et al. (1998). "Effect of N-terminal truncation and solution conditions on chemokine dimer stability: nuclear magnetic resonance structural analysis of macrophage inflammatory protein 1 beta mutants." Biochemistry **37**(26): 9346-54.
- Lee, B., M. Sharron, et al. (1999). "Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5215-20.

- Legler, D. F., M. Loetscher, et al. (1998). "B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5." J Exp Med **187**(4): 655-60.
- Leonard, E. J. and T. Yoshimura (1990). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)." Immunol Today **11**(3): 97-101.
- Levy, J. A. (1993). "Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection." Microbiol Rev **57**(1): 183-289.
- Lew, W., J. J. Oppenheim, et al. (1988). "Analysis of the suppression of IL-1 alpha and IL-1 beta production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone." J Immunol **140**(6): 1895-902.
- Lipes, M. A., M. Napolitano, et al. (1988). "Identification, cloning, and characterization of an immune activation gene." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9704-8.
- Litwin, V., K. A. Nagashima, et al. (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 membrane fusion mediated by a laboratory-adapted strain and a primary isolate analyzed by resonance energy transfer." J Virol **70**(9): 6437-41.
- Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell **86**(3): 367-77.
- Liu, R., X. Zhao, et al. (1998). "Functional analysis of the proximal CCR5 promoter." AIDS Res Hum Retroviruses **14**(17): 1509-19.
- Loetscher, P., M. Uguccioni, et al. (1998). "CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes." Nature **391**(6665): 344-5.
- Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." N Engl J Med **338**(7): 436-45.
- Luster, A. D. and J. V. Ravetch (1987). "Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)." J Exp Med **166**(4): 1084-97.
- Luster, A. D. and M. E. Rothenberg (1997). "Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation." J Leukoc Biol **62**(5): 620-33.

- Ma, Q., D. Jones, et al. (1999). "The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment." Immunity **10**(4): 463-71.
- Mack, M., B. Luckow, et al. (1998). "Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity." J Exp Med **187**(8): 1215-24.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, et al. (1986). "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." Cell **47**(3): 333-48.
- Maho, A., A. Bensimon, et al. (1999). "Mapping of the CCXCR1, CX3CR1, CCBP2 and CCR9 genes to the CCR cluster within the 3p21.3 region of the human genome." Cytogenet Cell Genet **87**(3-4): 265-8.
- Makao, M., H. Nomiya, and K Shimida (1990). "Structures of the human genes encoding for cytokine LD78 and their expression." Mol. Cell. Biol **10**: 3646.
- Mansky, L. M. and H. M. Temin (1995). "Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase." J Virol **69**(8): 5087-94.
- Martínez, C. (2001). "Factores inmunitarios protectivos del huésped contra la infección por el VIH-1 y la progresión a SIDA: Quimiocinas y sus receptores". Tesis Doctoral. UB.
- Martinson, J. J., N. H. Chapman, et al. (1997). "Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion." Nat Genet **16**(1): 100-3.
- McDougal, J. S., M. S. Kennedy, et al. (1986). "Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule." Science **231**(4736): 382-5.
- McDyer, J. F., M. Dybul, et al. (1999). "Differential effects of CD40 ligand/trimer stimulation on the ability of dendritic cells to replicate and transmit HIV infection: evidence for CC-chemokine-dependent and -independent mechanisms." J Immunol **162**(6): 3711-7.
- McManus, C. M., C. F. Brosnan, et al. (1998). "Cytokine induction of MIP-1 alpha and MIP-1 beta in human fetal microglia." J Immunol **160**(3): 1449-55.

- McNicholl, J. M., D. K. Smith, et al. (1997). "Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele." Emerg Infect Dis **3**(3): 261-71.
- Metchnikoff, E. (1901). "L' Immunite dans les malades infecctieuses." Masson, Paris.
- Michael, N. L., G. Chang, et al. (1997). "The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **3**(3): 338-40.
- Mikloska, Z., V. A. Danis, et al. (1998). "In vivo production of cytokines and beta (C-C) chemokines in human recurrent herpes simplex lesions--do herpes simplex virus-infected keratinocytes contribute to their production?" J Infect Dis **177**(4): 827-38.
- Miller, M. D., S. Hata, et al. (1989). "A novel polypeptide secreted by activated human T lymphocytes." J Immunol **143**(9): 2907-16.
- Miller, M. D. and M. S. Krangel (1992). "Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines." Crit Rev Immunol **12**(1-2): 17-46.
- Miller, M. D., S. D. Wilson, et al. (1990). "Sequence and chromosomal location of the I-309 gene. Relationship to genes encoding a family of inflammatory cytokines." J Immunol **145**(8): 2737-44.
- Moriuchi, H., M. Moriuchi, et al. (1997). "Cloning and analysis of the promoter region of CCR5, a coreceptor for HIV-1 entry." J Immunol **159**(11): 5441-9.
- Moriuchi, M., H. Moriuchi, et al. (1999). "GATA-1 transcription factor transactivates the promoter for CCR5, a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 entry." Blood **93**(4): 1433-5.
- Moriuchi, M., H. Moriuchi, et al. (1998). "Exposure to bacterial products renders macrophages highly susceptible to T-tropic HIV-1." J Clin Invest **102**(8): 1540-50.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Mummidi, S., S. S. Ahuja, et al. (1997). "The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms

- within the regulatory regions and noncoding exons." J Biol Chem **272**(49): 30662-71.
- Murphy, P. M., Ozcelik T., Keney, R.T., Tiffany H.L., McDermott D., Francke U. (1992). "A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family." J Biol Chem **267**: 7637-43.
- Nagira, M., T. Imai, et al. (1997). "Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid- tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13." J Biol Chem **272**(31): 19518-24.
- Nakao, M., H. Nomiya, et al. (1990). "Structures of human genes coding for cytokine LD78 and their expression." Mol Cell Biol **10**(7): 3646-58.
- Napolitano, M., A. Zingoni, et al. (1996). "Molecular cloning of TER1, a chemokine receptor-like gene expressed by lymphoid tissues." J Immunol **157**(7): 2759-63.
- Napolitano M., M. W., Cevario S., Gnarra J., Seuanes H., Leohard W., (1991). "The gene encoding the Act-2 cytokine." J. Biol. Chem **266**: 17531-17536.
- Nibbs, R. J., J. Yang, et al. (1999). "LD78beta, a non-allelic variant of human MIP-1alpha (LD78alpha), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity." J Biol Chem **274**(25): 17478-83.
- Oberlin, E., A. Amara, et al. (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." Nature **382**(6594): 833-5.
- O'Brien, T. R., C. Winkler, et al. (1997). "HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32." Lancet **349**(9060): 1219.
- O'Brien, S. J. (1998). "AIDS: a role for host genes." Hosp Pract (Off Ed) **33**(7): 53-6, 59-60, 66-7 passim.
- Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, et al. (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." Annu Rev Immunol **9**: 617-48.
- Oravec, T., M. Pall, et al. (1997). "Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation,

- normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage." J Exp Med **186**(11): 1865-72.
- Pan Y, I. C., Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D. (1997). "Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation." Nature **387**(6633): 611-617.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1993). "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." Nature **362**(6418): 355-8.
- Patel, S. R., S. Evans, et al. (1993). "Characterization of the quaternary structure and conformational properties of the human stem cell inhibitor protein LD78 in solution." Biochemistry **32**(20): 5466-71.
- Patterson, B. K., M. Czerniewski, et al. (1999). "Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes." Clin Immunol **91**(3): 254-62.
- Paul, W. E. and R. A. Seder (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." Cell **76**(2): 241-51.
- Paxton, W. A., S. R. Martin, et al. (1996). "Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure." Nat Med **2**(4): 412-7.
- Peitsch, M. C. (1996). "ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling." Biochem Soc Trans **24**(1): 274-9.
- Penton-Rol, G., N. Polentarutti, et al. (1998). "Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma." J Immunol **160**(8): 3869-73.
- Piatak, M., Jr., M. S. Saag, et al. (1993). "High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR." Science **259**(5102): 1749-54.
- Picard, L., G. Simmons, et al. (1997). "Multiple extracellular domains of CCR-5 contribute to human immunodeficiency virus type 1 entry and fusion." J Virol **71**(7): 5003-11.

- Ponath, P. D., S. Qin, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils." J Exp Med **183**(6): 2437-48.
- Popovic, M., M. G. Sarngadharan, et al. (1984). "Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS." Science **224**(4648): 497-500.
- Power, C. A., A. Meyer, et al. (1995). "Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line." J Biol Chem **270**(33): 19495-500.
- Raport, C. J., J. Gosling, et al. (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." J Biol Chem **271**(29): 17161-6.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1983). "Inmunología." Salvat 3 Edición.
- Roos, M. T., J. M. Lange, et al. (1992). "Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." J Infect Dis **165**(3): 427-32.
- Roos, R. S., M. Loetscher, et al. (1997). "Identification of CCR8, the receptor for the human CC chemokine I-309." J Biol Chem **272**(28): 17251-4.
- Rucker, J., A. L. Edinger, et al. (1997). "Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus- encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses." J Virol **71**(12): 8999-9007.
- Ruffing, N., N. Sullivan, et al. (1998). "CCR5 has an expanded ligand-binding repertoire and is the primary receptor used by MCP-2 on activated T cells." Cell Immunol **189**(2): 160-8.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F., A. Lanzavecchia, et al. (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2- mediated responses." Immunol Today **19**(12): 568-74.

- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1998). "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." J Exp Med **187**(6): 875-83.
- Sallusto, F., B. Palermo, et al. (1999). "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function." Eur J Immunol **29**(5): 1617-25.
- Sallusto, F., P. Schaerli, et al. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." Eur J Immunol **28**(9): 2760-9.
- Samson, M., O. Labbe, et al. (1996). "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." Biochemistry **35**(11): 3362-7.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-5.
- Samson, M., P. Soularue, et al. (1996). "The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3." Genomics **36**(3): 522-6.
- Samson, M., P. Stordeur, et al. (1996). "Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel human gene, ChemR1, expressed in T lymphocytes and polymorphonuclear cells and encoding a putative chemokine receptor." Eur J Immunol **26**(12): 3021-8.
- Sattentau, Q. J. and J. P. Moore (1991). "Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding." J Exp Med **174**(2): 407-15.
- Schall, T. J. (1991). "Biology of RANTES/SIS cytokine family." Cytokine **3**: 165-183.
- Schall, T. J. (1994). "In "The Cytokine Handbook" (ed A. Thomason), The Chemokines." Academic Press, New York: 419-460.
- Schall, T. J., K. Bacon, et al. (1990). "Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES." Nature **347**(6294): 669-71.
- Schmidtmayerova, H., H. S. Nottet, et al. (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta

peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 700-4.

Senior, R. M., G. L. Griffin, et al. (1983). "Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts." J Cell Biol **96**(2): 382-5.

Sherry, B., P. Tekamp-Olson, et al. (1988). "Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta." J Exp Med **168**(6): 2251-9.

Sica, A., A. Sacconi, et al. (1997). "Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes." J Exp Med **185**(5): 969-74.

Siegal, F. P., C. Lopez, et al. (1981). "Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions." N Engl J Med **305**(24): 1439-44.

Simmons, G., J. D. Reeves, et al. (1998). "CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages." J Virol **72**(10): 8453-7.

Smith, M. W., M. Dean, et al. (1997). "Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study." Science **277**(5328): 959-65.

Snyderman, R., Uting, R.J. (1992). "Chemoattractant stimulus-response coupling. In Inflammation: Basic principles and clinical correlates." New York: Raven(second edition): 421-39.

Sozzani, S., P. Allavena, et al. (1998). "Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties." J Immunol **161**(3): 1083-6.

Sozzani, S., F. Sallusto, et al. (1995). "Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines." J Immunol **155**(7): 3292-5.

- Spijkerman, I. J., M. Koot, et al. (1995). "Lower prevalence and incidence of HIV-1 syncytium-inducing phenotype among injecting drug users compared with homosexual men." Aids **9**(9): 1085-92.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm." Cell **76**: 301-314.
- Struyf, S., I. De Meester, et al. (1998). "Natural truncation of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC chemokine inhibitor." Eur J Immunol **28**(4): 1262-71.
- Struyf, S., P. Menten, et al. (2001). "Diverging binding capacities of natural LD78beta isoforms of macrophage inflammatory protein-1alpha to the CC chemokine receptors 1, 3 and 5 affect their anti-HIV-1 activity and chemotactic potencies for neutrophils and eosinophils." Eur J Immunol **31**(7): 2170-8.
- Tanaka, Y., D. H. Adams, et al. (1993). "T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta." Nature **361**(6407): 79-82.
- Tarasova, N. I., R. H. Stauber, et al. (1998). "Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4." J Biol Chem **273**(26): 15883-6.
- Tedla, N., H. W. Wang, et al. (1998). "Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)- 1 alpha and MIP-1 beta." J Immunol **161**(10): 5663-72.
- Tersmette, M., R. E. de Goede, et al. (1988). "Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex." J Virol **62**(6): 2026-32.
- Theodorou, I., L. Meyer, et al. (1997). "HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group." Lancet **349**(9060): 1219-20.
- Uguccioni, M., C. R. Mackay, et al. (1997). "High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in

- activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines." J Clin Invest **100**(5): 1137-43.
- Ullum, H., A. Cozzi Lepri, et al. (1998). "Production of beta-chemokines in human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence that high levels of macrophage inflammatory protein- 1beta are associated with a decreased risk of HIV disease progression." J Infect Dis **177**(2): 331-6.
- van't Wout, A. B., N. A. Kootstra, et al. (1994). "Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission." J Clin Invest **94**(5): 2060-7.
- Verani, A., G. Scarlatti, et al. (1997). "C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells." J Exp Med **185**(5): 805-16.
- Vicari, A. P., D. J. Figueroa, et al. (1997). "TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development." Immunity **7**(2): 291-301.
- Virelizier, J. L. (1998). "Alternative, cytokine-mediated host defense mechanisms against HIV infection: the concept of self-limitation of HIV replication." Aids **12**(Suppl A): S141-6.
- Wagner, L., O. O. Yang, et al. (1998). "Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans." Nature **391**(6670): 908-11.
- Wahl, S. M., J. B. Allen, et al. (1989). "HIV-1 and its envelope glycoprotein down-regulate chemotactic ligand receptors and chemotactic function of peripheral blood monocytes." J Immunol **142**(10): 3553-9.
- Walker, C. M. and J. A. Levy (1989). "A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication." Immunology **66**(4): 628-30.
- Walker, C. M., D. J. Moody, et al. (1986). "CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication." Science **234**(4783): 1563-6.
- Ward, S. G. and J. Westwick (1998). "Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology." Biochem J **333**(Pt 3): 457-70.

- Weiss, R. A. (1996). "HIV receptors and the pathogenesis of AIDS." Science **272**(5270): 1885-6.
- Willey, R. L., T. S. Theodore, et al. (1994). "Amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop that change viral tropism also alter physical and functional properties of the virion envelope." J Virol **68**(7): 4409-19.
- Winkler, C., W. Modi, et al. (1998). "Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC)." Science **279**(5349): 389-93.
- Wu, L., W. A. Paxton, et al. (1997). "CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro." J Exp Med **185**(9): 1681-91.
- Xia, Y., M. E. Pauza, et al. (1997). "RelB regulation of chemokine expression modulates local inflammation." Am J Pathol **151**(2): 375-87.
- Yamamoto, K. R. (1985). "Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks." Annu Rev Genet **19**: 209-52.
- Yamamura, Y., T. Hattori, et al. (1989). "Synthesis of a novel cytokine and its gene (LD78) expressions in hematopoietic fresh tumor cells and cell lines." J Clin Invest **84**(6): 1707-12.
- Yang, O. O. (1998). "CD8 T cells in HIV infection: mechanisms of immunity." Hosp Pract (Off Ed) **33**(11): 105-8, 111-2, 115-7 passim
- Yoshida, R., T. Imai, et al. (1997). "Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7." J Biol Chem **272**(21): 13803-9.
- Yoshida, T., T. Imai, et al. (1998). "Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1." J Biol Chem **273**(26): 16551-4.
- Zaballos, A., R. Varona, et al. (1996). "Molecular cloning and RNA expression of two new human chemokine receptor-like genes." Biochem Biophys Res Commun **227**(3): 846-53.
- Zagury, D., A. Lachgar, et al. (1998). "Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3851-6.

- Zaitseva, M., A. Blauvelt, et al. (1997). "Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection." Nat Med **3**(12): 1369-75.
- Zhu, T., H. Mo, et al. (1993). "Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection." Science **261**(5125): 1179-81.
- Ziegler, S. F., T. W. Tough, et al. (1991). "Induction of macrophage inflammatory protein-1 beta gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7." J Immunol **147**(7): 2234-9.
- Zimmerman, P. A., A. Buckler-White, et al. (1997). "Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk." Mol Med **3**(1): 23-36.
- Zipfel, P. F., J. Balke, et al. (1989). "Mitogenic activation of human T cells induces two closely related genes which share structural similarities with a new family of secreted factors." J Immunol **142**(5): 1582-90.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.
- Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**: 121-127.
- Zou, W., A. Foussat, et al. (1999). "Acute upregulation of CCR-5 expression by CD4+ T lymphocytes in HIV- infected patients treated with interleukin-2. ANRS 048 IL-2 Study Group." Aids **13**(4): 455-63.
- Zybarth, G., N. Reiling, et al. (1999). "Activation-induced resistance of human macrophages to HIV-1 infection in vitro." J Immunol **162**(1): 400-6.