

## FRECUENCIA DEL ALELO MUTADO DEL RECEPTOR CCR-5 EN INDIVIDUOS HIV-1 POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA PROVINCIA DEL CHACO

PATRICIA MOTTA<sup>1</sup>, LARISA CIBULSKY<sup>1</sup>, ERNESTO ILIOVICH<sup>2</sup>, ALICIA HABEGGER de SORRENTINO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética y

<sup>2</sup> Servicio de Infectología, Hospital Julio C. Perrando, Resistencia, Chaco

**Resumen** Los individuos con alto riesgo a la infección por el virus HIV-1, portadores de una variante polimórfica del gen del receptor para  $\beta$  quimioquinas CCR-5 son resistentes a la infección por HIV-1. La mutación de CCR-5 es una delección de 32 pares de bases dentro del gen resultando en una proteína truncada que no se expresa en la superficie. El genotipo homocigota está asociado a resistencia de la infección. Este alelo se encuentra más comúnmente en la población caucásica y no fue hallado en africanos o japoneses. El genotipo heterocigota disminuiría la entrada y replicación del HIV-1 a linfocitos T CD4 y macrófagos, asociándose de esta manera a una lenta progresión a SIDA. Con el objetivo de establecer la frecuencia del alelo mutado en individuos HIV-1(-) y HIV-1(+), en la población chaqueña, caucásica y con influencia hispana y guaraní, se estudiaron 118 individuos HIV-1(-) y 80 HIV-1(+). Una porción del gen CCR-5 fue amplificado por la técnica PCR, a partir de DNA genómico obtenido por el método de *Salting out*. Se observó en población HIV-1(-) un 2.5% del genotipo homocigota y 15.3% heterocigota, estos datos coinciden con los comunicados para otras poblaciones caucásicas. En la población HIV-1(+) no se halló el genotipo homocigota coincidiendo con otras publicaciones y la proporción de pacientes con la forma heterocigota fue de 2.5%, cifra menor a las reportadas por otros autores.

**Abstract** *Frequency of a mutated CCR-5 allele in HIV-1 positive and negative individuals in the Province of Chaco.* The importance of chemokine receptors in the pathophysiology of HIV infection became apparent when it was demonstrated that persons at high risk for HIV-1 infection remain uninfected when they carry a polymorphic variant of CCR5. In individuals who are homozygous for the 32 base-pair deletion in the CCR5 gene, a functional protein cannot be synthesized and such persons are not found in HIV-1 positive cohorts. Furthermore, in individuals heterozygous for that mutation, there is an association with slow disease progression. The mutant allele of CCR-5 is present at high frequency in the Caucasian population, but is absent in the Japanese and black populations. The aim of this study was to assess the frequency of the truncated allele of CCR-5 gene in the cohort of HIV infected and non-infected subjects in the Province of Chaco, Argentina (with guaraní and hispanic genetic background). A total of 118 unrelated seronegative healthy blood donors and 80 seropositive HIV-1 subjects were studied. A portion of CCR-5 gene from genomic DNA was amplified by PCR and analyzed on a 3% agarose gel. The frequency of the delta CCR-5 allele was 2.5% for homozygous and 15.3% for heterozygous seronegative subjects, similar to that reported in the Caucasian population; the homozygous CCR-5 allele was absent in HIV-1 positive patients and the frequency of heterozygous was 2.5%, significantly lower than reported in the Caucasian population.

**Key words:** HIV-1, AIDS, CCR5/ $\Delta$ CCR5

El receptor primario para HIV-1, CD4, permite la entrada del virus a células humanas pero no a células no humanas debido a la ausencia de cofactores expresados por células humanas y que son requeridos para la fusión del virus con la célula<sup>1,2</sup>. Estos cofactores son los receptores para quimioquinas alfa y beta: CXCR-4 y CCR-5. CXCR-4 es utilizado por las cepas HIV adaptadas a crecimiento en líneas T CD4 positivas que se ais-

lan en los pacientes con estado avanzado de progresión de la enfermedad, mientras que CCR-5 es el co-receptor utilizado por las cepas macrofagotrópicas de HIV-1 para infectar los cultivos de células mononucleares periféricas humanas y los macrófagos.

Algunos individuos que han estado expuestos al HIV-1 en varias oportunidades, pero que no se infectan, tienen un defecto en el gen que codifica para CCR-5. Este defecto consiste en una delección de 32 pares de bases<sup>3,4</sup>. La delección de 32 pares de bases dentro del gen, resulta en una proteína truncada que no se expresa en la superficie<sup>5,6,7</sup>.

El genotipo heterocigota (CCR5/ $\Delta$ CCR5) para la delección de 32 pares bases, disminuiría la entrada y

Recibido: 13-I-2000

Aceptado: 5-IV-2000

**Dirección postal:** Dra. Patricia Motta, Hospital Julio C. Perrando, 9 de Julio 1101, 3500 Resistencia, Chaco  
Fax: 54-03722-428933 e-mail: sorro@arnet.com.ar

replicación de HIV-1 en linfocitos T y macrófagos y se asociaría a una lenta progresión en la infección por HIV, retardando la progresión a SIDA<sup>8, 9, 10, 11, 12, 13</sup>.

El genotipo homocigota ( $\Delta ccr5/\Delta ccr5$ ) para la delección de 32 pares bases estaría asociado a resistencia a la infección<sup>9</sup>. Se describe en sujetos que continúan sin infectarse aun después de varias exposiciones a HIV-1. Este alelo fue encontrado más comúnmente en población caucásica con una frecuencia de 0,0808, pero no fue hallado en población africana o en individuos con ancestros asiáticos<sup>4</sup>.

Se realizó este trabajo con el objetivo de conocer la frecuencia poblacional del delta-CCR-5 en individuos HIV(-) y HIV(+) en la provincia del Chaco, ya que la población chaqueña resulta de la fusión de ancestros caucásicos e indígenas sudamericanos (guaraníes).

## Materiales y métodos

Se extrajeron muestras de sangre periférica de 118 individuos sin enfermedad infecciosa demostrable, HIV(-) y de 80 sujetos HIV(+) que concurren al Hospital J.C. Perrando de la ciudad de Resistencia de la provincia del Chaco.

El ADN genómico se obtuvo por la técnica de Salting Out (protocolo recomendado en el 12° Taller de Histocompatibilidad).

Una porción del gen CCR-5 fue amplificada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de DNA genómico y analizado en gel de agarosa al 3% visualizado con bromuro de etidio.

Se usaron los siguientes primers: CCR5c, 5'-CAAAA-AGAAGGTCTTCATTACACC-3' y CCR5d, 5'-CCTGTGCCT-CTTCTTCATTTCCG-3'.

El mix de reacción contenía 20 pmol de cada primer, 0.25 Mm de dNTPs y 0.5 U de Taq polimerasa en Buffer de reacción (Boehringer Mannheim) la amplificación de PCR consistió en 40 ciclos con 5 ciclos de 94 °C por 30s, 60 °C por 30s y 72 °C por 45s.

Se obtuvieron productos de amplificación de 189 pares de bases para el alelo normal (CCR-5), y de 157 pares de bases para el alelo mutado homocigota ( $\Delta ccr5/\Delta ccr5$ ), en forma heterocigota 189/157 pares de bases (CCR5/ $\Delta ccr5$ ).

## Resultados

De 118 individuos HIV(-) estudiados, se halló una frecuencia del alelo mutado en su forma homocigota en 2.5% (3/118), en su forma heterocigota en un 15.3% (18/118); la frecuencia del alelo normal fue de 82.2% (97/118) (Tabla 1).

De 80 individuos HIV (+) estudiados se encontró una frecuencia del alelo mutado en su forma heterocigota de 2.5% (2/80), siendo la frecuencia del alelo normal de 97.5% (78/80) (Tabla 1).

TABLA 1.— Porcentaje de cada genotipo CCR-5 en población chaqueña

	Población chaqueña HIV-1(-)	Población chaqueña HIV-1(+)
N° total de casos	118	80
Homocigota normal CCR5/CCR5	82.2% (97/118)	97.5% (78/80)
Heterocigota CCR5/ $\Delta ccr5$	15.3% (18/118)	2.5% (2/80)
Homocigota $\Delta ccr5/\Delta ccr5$	2.5% (3/118)	0% (0/80)

## Discusión

Un grupo de pacientes HIV-1 (+), que luego de 7 años de ser infectados permanecían asintomáticos, con recuento de células T CD4+ mayor a 600/mm<sup>3</sup>, fueron denominados no progresores a largo plazo (long term non progressors, LTNP)<sup>14</sup>. De esta observación y otras similares surgió la importancia de considerar que existían factores genéticos e inmunológicos involucrados en la modulación de la progresión de la enfermedad causada por la infección por HIV-1.

También se observó que algunas personas HIV negativas sanas, con numerosas exposiciones al virus HIV-1, tenían una resistencia innata a la infección. En estos individuos se demostró la existencia de variantes genéticas de los receptores de la  $\beta$  quimioquinas (CCR-5), las cuales están asociadas a la resistencia a la infección o lenta progresión de la enfermedad<sup>12, 15, 16</sup>.

Con respecto a la prevalencia del alelo mutado del gen CCR-5, en su forma homocigota, que es la que confiere resistencia a la infección, se observó que se halla más frecuentemente en la población caucásica que en la africana o en individuos con ancestros asiáticos<sup>4</sup>.

En un estudio realizado en 261 sujetos sanos en San Francisco, USA, el alelo homocigota se identificó en 7 (2.7%) y en 51 (19.5%) el alelo heterocigota. De 172 seropositivos no progresores, 33 (19.2%) eran CCR5/ $\Delta ccr5$  y de 234 seropositivos progresores, 25 (10.7%) eran heterocigotas CCR5/ $\Delta ccr5$ <sup>9</sup>. Al analizar 637 muestras de un centro de donantes de sangre de New York con un 95% de población caucásica, se encontró una frecuencia de 85.2% para el alelo normal; de 13.3% para el CCR5/ $\Delta ccr5$  y de 1.4% para  $\Delta ccr5/\Delta ccr5$ . En la población caucásica estudiada en un multicentro de AIDS para hombres homosexuales de Chicago, en 446 HIV(-) un

78.0% tenían el alelo normal, 18.4% CCR5/ $\Delta$ CCR5 y 3.6%  $\Delta$ CCR5/ $\Delta$ CCR5; en 461 HIV (+) el 79.8% tenían alelo normal, 20.2% CCR5/ $\Delta$ CCR5 y 0%  $\Delta$ CCR5/ $\Delta$ CCR5. De los 191 asiáticos evaluados se halló en el 100% el alelo normal; lo mismos resultados se obtuvieron en las 137 personas de raza negra<sup>4</sup>. En el Hospital Central de Asturias, Oviedo, España, se analizó un grupo de drogadictos endovenosos y un grupo control para determinar el rol de las mutaciones del receptor CCR-5. En los 250 sujetos sanos de control se determinó que el 18% (45/250) portaba CCR5/ $\Delta$ CCR5 y 1% eran homocigotas  $\Delta$ CCR5/ $\Delta$ CCR5. Luego de un estudio realizado sobre 150 drogadictos endovenosos HIV-1 (+), 50 eran de progresión lenta. Este grupo de individuos que permanecía de 2 a 10 años después de la infección sin síntomas se separó de los 100 sujetos de progresión rápida que presentaban algún evento indicativo de progresión a Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (AIDS) durante 2 años luego de la infección. En este grupo de HIV-1 (+) se determinó un 8% (12/150) del alelo del CCR-5 en su forma heterocigota y no se encontró la forma homocigota<sup>11</sup>. En Padua, Italia, se analizaron 371 donantes de sangre sanos seronegativos no relacionados, determinando que la frecuencia del alelo  $\Delta$ CCR5/ $\Delta$ CCR5 fue de 0.047; en 54 drogadictos seronegativos la frecuencia fue de 0.065; en 98 hemofílicos seronegativos 0.051 y en 81 hemofílicos seropositivos 0.049<sup>17</sup>. En Bruselas, Bélgica, se demostró que el alelo mutado de CCR-5 estaba presente en alta frecuencia en la población caucásica (frecuencia alélica 0.092), pero estaba ausente en población negra occidental, Japonesa y en África central. En sujetos infectados con HIV-1 no se encontró mutación homocigota y la frecuencia de heterocigosis fue 35% más baja que en población general<sup>18</sup>. En Quebec, Canadá, se analizaron individuos HIV (-) que habían estado expuestos al virus, y que permanecían sin infectarse y algunos presentaban CTLs específicos contra HIV, el análisis del CCR-5 reveló que ninguno de ellos tenía el alelo mutado en su forma homocigota asociado con su resistencia a la infección<sup>19</sup>.

En el Hospital Julio C. Perrando de la ciudad de Resistencia, provincia del Chaco, se analizó una población control de 118 sujetos sin enfermedad infecciosa demostrable en la cual se obtuvo 82.2% del alelo normal CCR-5; 15.3% del alelo mutado heterocigota, 2.5% del alelo mutado homocigota, datos similares a otras poblaciones caucásicas reportadas. Con respecto a los 80 sujetos HIV-1(+) estudiados se pudo determinar en 97.5% la presencia del alelo normal CCR-5 y en un 2.5% la de alelo mutado heterocigota. Esta cifra es menor que las reportadas por otras poblaciones caucásicas. La ausencia de alelo homocigota en esta población coincide con lo informado por otros autores. Las diferencias observadas con respecto a la bibliografía, puedan deberse a la gran variabilidad étnica entre poblaciones. En la pobla-

ción chaqueña estudiada de origen caucásico, existe una importante influencia indoamericana guaraní. Si bien no es posible establecer la progresión de la enfermedad en relación con la frecuencia del alelo, la baja presencia de la forma heterocigota de CCR5, así como la ausencia de la forma homocigota en los individuos infectados, apoyaría la hipótesis de que estos son factores de protección para la infección.

**Agradecimientos:** Agradecemos el asesoramiento de la Dra. Karina Marinic en la revisión del manuscrito y aportes bibliográficos y la colaboración técnica de Irma Sabadini y José Luis Figueredo.

## Bibliografía

1. Feng Yu, Broder C, Kennedy P, Berger E. HIV-1 Entry Cofactor: functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science* 1996; 272: 872-6.
2. Alkhatib G, Combadiere C, Broder C, et al. CCR5: A RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science* 1996; 272: 1955-8.
3. Liu R. Homozygous defects in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86: 367-77.
4. Huang Y, Paxton W, Wolinsky S, et al. The role of mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Med* 1996; 2: 1240-3.
5. Furci L, Scarlatti G, Burastero S, et al. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med* 1997; 186: 455-60.
6. Trkola A, Dragic T, Arthos J, et al. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its coreceptor CCR-5. *Nature* 1996; 384 (6605): 814-7.
7. Balfe P, Churcher Y, Penny M, et al. Association between a defective CCR-5 gene and progression to disease in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14: 1229-34.
8. Meyer L, Magierowska M, Humbert J, et al. Early protective effect of CCR-5 delta 32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. *AIDS* 1997; 11: F73-8.
9. Michael N, Chang G, Louie L, et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Med* 1997; 3: 338-40.
10. Bratt G, Leandersson A, Albert J, Sandstrom E, Wahren B. MT-2 tropism and CCR-5 genotype strongly influence disease progression in HIV-1 infected individuals. *AIDS* 1998; 12: 729-36.
11. Alvarez V, López-Larrea C, Coto E. Mutational analysis of the CCR-5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users. *Hum Genet* 1998; 102: 483-6.
12. Broder C, Dimitrov D. HIV and the 7-transmembrane domain receptors. *Pathobiology* 1996; 64: 171-9.
13. Katzenstein T, Eugen-Olsen J, Hofman B, et al. HIV-infected individuals with the CCR delta 32/CCR5 genotype have lower HIV RNA levels and higher CD4 cell counts in the early years of the infection than do patients with the wild type. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16: 10-4.
14. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in sub-

- jects with long-term non progressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 209-16.
15. Xiao L, Rudolph DL, Owen SM, Spira TJ. Adaptation to promiscuous usage of CC and CXCR-5 chemokine coreceptors in vivo correlates with HIV-1 disease progression. *AIDS* 1998; 12: F137-43.
  16. Luster A Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-45.
  17. Zaarhi R, Indraccolo S, Minuzzo S, et al. Frequency of a mutated CCR-5 allele (delta 32) among Italian healthy donors and individuals at risk of parenteral HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 337-44.
  18. Samsom M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996, 383: 722-5.
  19. Bernard N, Yannakis C, Lee J, Tsoukas CM. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV-exposed seronegative persons. *J Infect Dis* 1999; 179: 538-47.

-----

*Le lecteur aurait d'ailleurs tort de croire que les recherches d'un laboratoire aboutissent toujours à des publications, plus ou moins importantes, plus ou moins fameuses. En fait, 90% des expériences n'aboutissent pas, un imprévu technique se produit ou bien l'idée de départ se révèle mauvaise. La vie quotidienne du chercheur est ainsi faite de déceptions, avec de temps en temps des réussites qui lui permettent de conserver son enthousiasme. Il faut avoir la mentalité du joueur ou du pêcheur. En ce qui me concerne, seuls les gros poissons m'intéressent... mais ils sont plutôt rares. Mes armoires sont ainsi pleines de cahiers d'expériences, de débuts de manuscrits qui ne seront jamais publiés, à moins que je ne les envoie au Journal des résultats irréproductibles créé par un collègue israélien facétieux.*

El lector por otra parte no debería creer que las investigaciones de un laboratorio terminan siempre en publicaciones, más o menos importantes, más o menos famosas. De hecho, el 90% de los experimentos no se terminan, sea por un imprevisto técnico o bien porque la idea inicial resulta errónea. Así la vida cotidiana del investigador está hecha de decepciones, con algunas veces resultados que le permiten conservar su entusiasmo. Hay que tener la mentalidad del jugador o del pescador. En lo que me concierne, sólo los peces grandes me interesan... pero son más bien raros. Mis armarios están repletos de cuadernos de experimentos, de principios de manuscritos que no serán nunca publicados a menos que los mande a la *Revista de los resultados irreproductibles* creada por un colega israelí fastidioso.

Luc Montagnier

*Des virus et des hommes.* Paris: Editions Odile Jacob, 1994, p 42