

# **infectio**

---

## **REVISTA DE LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA**

**VOLUMEN 5  
NÚMERO 2  
JUNIO DE 2001**

**FRECUENCIA DE MUTACIONES EN  
EL CORRECEPTOR CCR5 DEL VIRUS  
DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)  
EN DIFERENTES GRUPOS EN MEDELLÍN, COLOMBIA.**



Maria T. Rugeles\*  
Francisco J. Díaz\*  
Jorge A. Vega\*  
Felipe Solano\*  
Jorge Nagles\*\*  
Gabriel Bedoya\*\*\*  
Victoria I. Bedoya\*  
Pablo J. Patiño\*\*\*\*,

## Resumen

**Introducción:** La exposición repetida al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) no siempre lleva a la infección. Múltiples factores de resistencia han sido propuestos, pero sólo una mutación, la delección de 32 pares de bases ( $\Delta 32$ ) en el gen que codifica por la molécula CCR5, confiere un alto grado de protección; esta molécula es el principal correceptor del virus,

**Objetivo:** Determinar la frecuencia de  $\Delta 32$  en Medellín, Colombia y buscar otros polimorfismos en el gen *ccr5* en individuos expuestos al VIH y seronegativos (ESNs).

**Materiales y Métodos:** La mutación  $\Delta 32$  se determinó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en 218 individuos: 29 seropositivos (SP), 39 ESN y 150 individuos de la población general (PG). Por medio de la técnica de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) se buscaron otras mutaciones en el gen *ccr5* en la población de ESNs.

**Resultados:** La frecuencia del alelo  $\Delta 32$  fue de 3.8% para ESN, 2.7% para PG y 1.7% para SP. Entre los ESNs se encontró el único genotipo homocigótico mutado, ( $\Delta 32/\Delta 32$ ). El genotipo heterocigótico, (*ccr5*/ $\Delta 32$ ), se encontró en el 5.3% de la PG y en el 2.6% de SP y de ESNs. Las diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos no fueron estadísticamente significativas. La comparación entre las frecuencias genotípicas esperadas y observadas mostró que estas frecuencias eran significativamente diferentes en el grupo de ESNs, lo que sugirió, en forma indirecta, un efecto protector del genotipo homocigótico mutado  $\Delta 32/\Delta 32$ . No se encontró ninguna otra mutación en el gen *ccr5*.

**Conclusión:** La baja frecuencia del genotipo homocigótico mutado  $\Delta 32/\Delta 32$  y la ausencia de otras mutaciones en *ccr5* en los ESNs sugieren la presencia de otros mecanismos de resistencia a la infección por VIH en nuestra población.

**Palabras claves:** CCR5, mutación  $\Delta 32$ , infección por VIH, expuesto seronegativo.

---

\* Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de

Medicina, Universidad de Antioquia

\*\* Instituto de los Seguros Sociales, Medellín,

\*\*\* Grupo de Genética Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

\*\*\*\* Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

Financiado por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República y por la Universidad de Antioquia.

Trabajo ganador del Segundo Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Oriente Antioqueño junio de 2000.

Correspondencia: Maria T. Rugeles, Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia. E-mail: [mtrugel@catios.udea.edu.co](mailto:mtrugel@catios.udea.edu.co)

## Introducción

La epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) se inició en la década de los 80. Con el transcurso del tiempo se ha visto que la patogénesis de esta infección es bastante variable y compleja; que depende tanto de factores virales como ambientales y del huésped. Evidencias clínicas sugieren la existencia de mecanismos de resistencia al progreso de la infección, en individuos progresores lentos o en no progresores (1, 2), y a la infección misma en personas que a pesar de haber tenido múltiples exposiciones al virus, generalmente por contacto sexual, no presentan ninguna evidencia clínica ni serológica de estar infectados, a quienes se les conoce entonces como expuestos seronegativos (3). Las bases biológicas de esta resistencia apenas se están empezando a entender.

Para ingresar a la célula blanco el VIH requiere, no sólo de la presencia de la molécula CD4, la cual actúa como receptor, sino de una molécula accesoria o correceptor, la cual actúa, en condiciones naturales, como receptor de quimioquinas (4, 5). Entre los receptores de quimioquinas, CCR5 y CXCR4 son los principales, pero no los únicos, correceptores para el VIH. Casi en forma simultánea con el hallazgo de los correceptores se identificó una mutación en el gen que codifica para la molécula CCR5, consistente en una eliminación de 32 pares de bases en el exón 4, la cual es conocida como  $\Delta 32$ . Se produce, entonces, una proteína truncada, lo cual impide su expresión en la membrana citoplasmática. De esta manera, los individuos que la portan en forma homocigótica son refractarios a la infección, por lo menos cuando la infección es producida por cepas M-trópicas, que son la forma de transmisión primaria del virus (3, 6). Estos individuos homocigóticos para  $\Delta 32$  no presentan ninguna alteración funcional conocida (6).

El alelo  $\Delta 32$  se presenta en población caucásica donde la frecuencia varía entre un 8% y un 10%. (6-8), y no se ha reportado en poblaciones asiáticas o africanas (7). En Latinoamérica las frecuencias han sido poco estudiadas; en Venezuela no se detectó este alelo en  $\Delta 32$

individuos estudiados, como tampoco en grupos amerindios (6, 7). Aunque en Colombia no se han realizado estudios poblacionales a este respecto, existe un reporte con una frecuencia del alelo  $\Delta 32$  del 3.5% en individuos residentes en Medellín (9).

En individuos ESNs, la frecuencia del genotipo  $\Delta 32/\Delta 32$  varía entre el 2.8% y el 3.6%, lo cual equivale a dos o tres veces la frecuencia encontrada en población caucásica no expuesta (10, 11). En contraste la frecuencia de  $\Delta 32$  en individuos infectados es mucho menor (11).

Aunque los estudios son contradictorios con relación al papel del genotipo heterocigótico (CCR5/ $\Delta 32$ ), la mayoría de ellos indica que la presencia de un alelo mutado confiere cierto grado de protección, que se expresa en un retardo en el desarrollo del SIDA (5, 11-13).

De los estudios, hasta ahora reportados, se puede concluir que si bien el genotipo  $\Delta 32/\Delta 32$  confiere un alto grado de resistencia a la infección por VIH, este no es el mecanismo más frecuente que explique el fenómeno de los ESNs. Esto ha llevado a proponer que otras mutaciones diferentes a  $\Delta 32$  en el gen *ccr5*, mutaciones en otros correceptores del VIH o mecanismos inmunológicos, puedan explicar la resistencia absoluta o relativa de algunos individuos.

Este estudio se llevó a cabo para determinar la frecuencia del alelo  $\Delta 32$  en diferentes grupos de individuos: ESN, SP y en PG. También se buscó la presencia de otras mutaciones en el gen *ccr5* para explorar la influencia de otros factores genéticos en el comportamiento de la infección, en nuestro medio.

## Materiales y Métodos

### 1. Población

Este estudio se llevó a cabo en tres grupos de individuos: ESN: personas con historia de contacto sexual repetido sin protección con individuos infectados con el VIH (estos individuos se definieron con un criterio previamente establecido por Hoffman (13)); SP: compañeros sexuales de los individuos ESNs, todos ellos positivos para anticuerpos anti-VIH, algunos con presencia de signos clínicos de SIDA; PG: adultos voluntarios, estudiantes o trabajadores de nuestra institución o de otras instituciones de salud de la ciudad. No se determinó el estado serológico frente al VIH en estos individuos. Todos los sujetos del estudio firmaron un consentimiento informado que cumple los lineamientos de la resolución de 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

## 2. Serología para el VIH

El estado serológico de los individuos ESNs se confirmó por una prueba de ELISA (Enzygnost HIV-1+2 Plus, Behring Diagnostics, Margurg, Germany).

## 3. Determinación del genotipo

La determinación del genotipo se llevó a cabo como lo describió previamente Michael et al. (14). Brevemente, se recolectó una muestra de sangre periférica con EDTA. Los mononucleares de sangre periférica se separaron por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO). El DNA genómico se separó utilizando la técnica de fenol-cloroformo (15). Un fragmento específico del exón 4 del gen *ccr5* se amplificó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes oligonucleótidos sintéticos: CCR5<sub>1</sub> (5'-ACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCT-3') y CCR5<sub>2</sub> (5'-CATGATGGTGAAGATAAGCCTCACA-3'). La reacción contenía 5 pmol de cada oligonucleótido, 0.3 unidades de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer, Norwalk, CT), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 200 μM de cada dNTP en un volumen final de 25 μl. La reacción se sometió a 30 ciclos de amplificación con tres temperaturas: 96°C x 15 seg, 58°C x 60 seg, y 72°C x 60 seg. El producto de amplificación se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, se coloreó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta. Para el genotipo normal (*ccr5/ccr5*) el producto obtenido fue de 225 pb, mientras que un producto de 193 pb indicaba un genotipo homocigótico para la mutación ( $\Delta 32/\Delta 32$ ). La presencia de ambas bandas indicó un genotipo heterocigótico (*ccr5/\Delta 32*) (Fig. 1).

## 4. Identificación de otras mutaciones en la región codificadora del gen *ccr5*

Se analizó toda la región codificadora del gen *ccr5* por medio de la técnica de SSCP. Se amplificó toda la región utilizando los oligonucleótidos F2 y R2, previamente reportados por Carrington et al. (16). Los productos de PCR fueron sometidos a digestión con la endonucleasa HinfI (Perkin Elmer). Los fragmentos de restricción se desnaturalizaron por calor y se sometieron a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturalizantes. Posteriormente el gel se coloreó con nitrato de plata (17, 18).

## 5. Secuencia

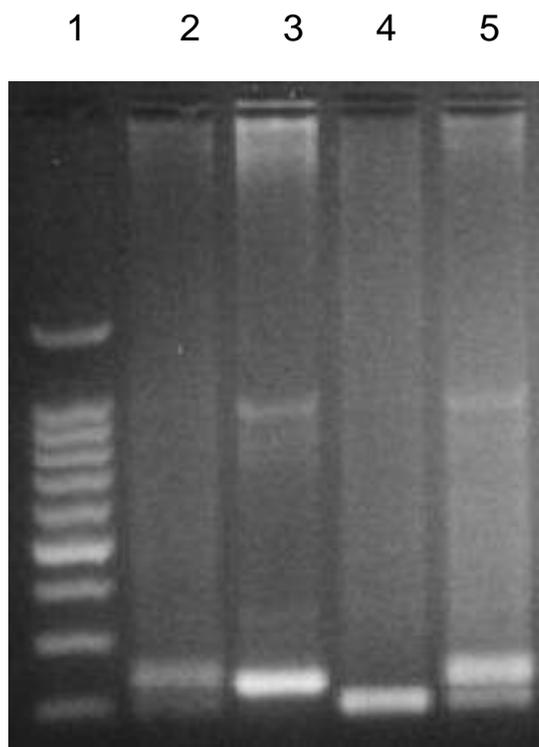
Todos los productos que presentaron la delección  $\Delta 32$  fueron secuenciados. La reacción de secuencia de los productos de PCR se hizo utilizando el estuche comercial "ABI Big Dye Terminator Cycle

Sequencing Ready Reaction DNA (Perkin Elmer). Los productos de secuencia se resolvieron en un secuenciador automático (ABI 210, Perkin Elmer)

## 6. Análisis Estadísticos

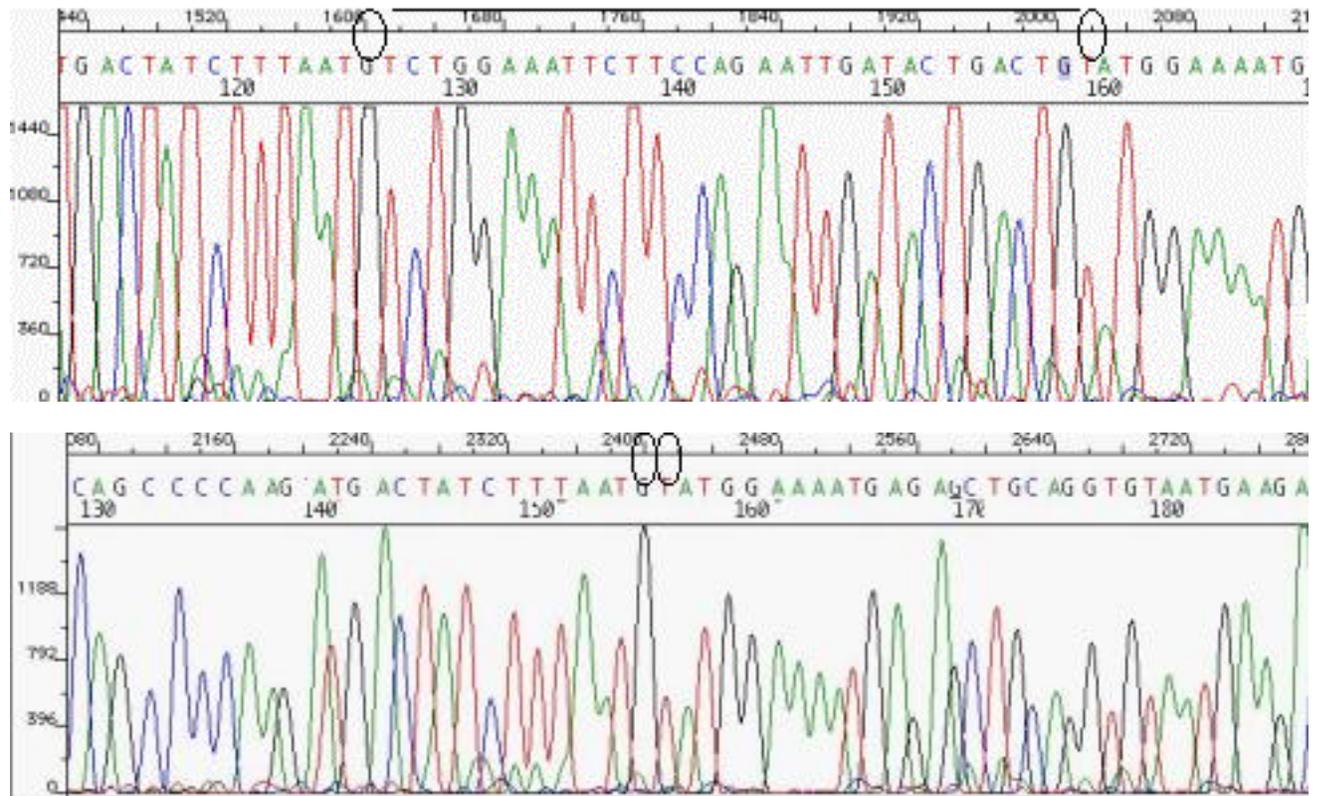
La comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en los grupos estudiados se realizaron por medio de la prueba de chi cuadrado ((2) para la homogeneidad de las proporciones utilizando el modulo "Statcalc" del programa Epiinfo 6.0. Las diferencias entre las frecuencias observadas y las esperadas del equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluaron por medio de la prueba de chi cuadrado ( $X^2$ ) para "bondad del ajuste" y fueron calculadas manualmente por medio de la siguiente formula:  $X^2 = \sum (O-E)^2/E$  donde O y E son los números observado y esperado respectivamente.

FIGURA 1.



Determinación del genotipo en el gen *ccr5* para los individuos expuestos seronegativos. En el carril 1 se encuentra un marcador de tamaño de DNA de 50 pb, en los carriles 2 y 3 se presentan individuos con genotipo *ccr5/ccr5* (normal), en el carril 4 un individuo homocigoto para la delección de 32 pb ( 32/ 32) y en el 5 un individuo heterocigoto para esta mutación ( 32/*ccr5*).

## FIGURA 2.



Se presenta la secuencia obtenida a partir de la región del gen *ccr5* que contiene la delección de 32 pares de bases. En el histograma superior se observa la secuencia de un individuo con genotipo normal (*ccr5/ccr5*), mientras en el histograma inferior se encuentra la secuencia homocigótico para la delección ( $\Delta 32/\Delta 32$ ). Estas secuencias se obtuvieron por medio del método de incorporación de dideoxinucleótidos utilizando un secuenciador automático.

## Resultados

### 1. Población y Perfil Demográfico

Se estudiaron 218 individuos distribuidos en tres grupos. Su distribución y el perfil demográfico se muestran en la tabla 1. Todos los grupos tuvieron un promedio de edad similar. La PG y los ESNs tuvieron una distribución similar de género pero diferente a la de los SP donde predominó el sexo masculino. La mayoría de las parejas eran heterosexuales. Todos los individuos seropositivos habían adquirido la infección por vía sexual.

### 2. Frecuencia de la Mutación $\Delta 32$ :

Las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas se muestran en la tabla 2. La frecuencia del alelo mutado  $\Delta 32$  fue de 3.8% para ESNs, 2.7% para PG y 1.7% para SP. La frecuencia genotípica más alta se

encontró para el genotipo silvestre (ccr5/ccr5). El genotipo heterocigótico (ccr5/  $\Delta$ 32) se encontró en 8 individuos de la población general, en uno de los SP y en unos de los ESNs. Sólo se encontró un genotipo homocigótico mutado ( $\Delta$ 32/  $\Delta$ 32) entre los individuos ESNs (Fig. 1). Las diferencias entre las frecuencias encontradas en los tres grupos no fueron estadísticamente significativas.

Con base en las frecuencias alélicas encontradas en cada grupo es posible predecir las frecuencias genotípicas esperadas, considerando que ellas siguen el equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto significa que las frecuencias tienen una distribución binomial de acuerdo a la siguiente ecuación:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , donde p y q son las frecuencias de los alelos ccr5 y  $\Delta$ 32, respectivamente y  $p^2$ , 2pq y  $q^2$  son las frecuencias de ccr5/ccr5, ccr5/  $\Delta$ 32 y  $\Delta$ 32/  $\Delta$ 32, respectivamente. La comparación entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas se muestran en la tabla 3. En SP y en PG las frecuencias observadas son similares a las esperadas, mientras que en el grupo de ESNs la frecuencia observada difiere significativamente de lo esperado alejándose del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0.0005$ ).

### 3. Análisis de SSCP

De la región codificadora se obtuvo un producto de 1114 pb el cual se digirió con la enzima de restricción HinfI. Se obtuvieron fragmentos de 355, 215, 202, 159, 144 y 4 pb, los cuales fueron analizados por SSCP. Sólo aquellos individuos en los que ya se les había detectado la mutación  $\Delta$ 32 mostraron un patrón claramente diferente en el análisis de SSCP (datos no mostrados).

### 4. Secuencia

La presencia de la mutación  $\Delta$ 32 se confirmó por secuenciación directa del producto de PCR (Fig 2).

**TABLA 1**

**Perfil Demográfico**

	PG	SP	ESNs
No. de individuos	150	29	39
Hombres No. (%)	54 (36)	26 (90)	14 (36)
Mujeres No. (%)	96 (64)	3 (10)	25 (64)
Edad-promedio (range)	32 (19-68)	35 (23-46)	31 (19-49)
Heterosexual No. (%)	N.D.	24 (83)	29 (74)
Homosexual No. (%)	N.D.	5 (17)	10 (26)

N.D.: no determinado; PG: muestra de la población general; SP: seropositivos; ESNs: expuestos seronegativos.

## TABLA 2

### Frecuencias alélicas y genotípicas

Población	PG		SP		ESNs	
	No. (frecuencia)	95% IC	No. (frecuencia)	95% IC	No. (frecuencia)	95% IC
Ccr5	292 (0.973)	0.955-0.991	57 (0.983)	0.950-1.000	75 (0.962)	0.919-1.000
32	8 (0.027)	0.009-0.045	1 (0.017)	0.000-0.050	(0.038)	0.000-0.081
<b>Genotipos</b>						
ccr5/ccr5	142 (0.947)		28 (0.966)		37 (0.948)	
ccr5/ 32	8 (0.053)		1 (0.034)		1 (0.026)	
32/ 32	0 (0.000)		0 (0.000)		1 (0.026)	

95 IC%: Intervalo de confianza del 95%; PG: muestra de la población general, SP: seropositivos; ESNs: expuestos seronegativos

## TABLA 3

### Diferencias entre frecuencias esperadas y observadas para cada genotipo

Genotipo	PG		SP		ESNs	
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	Observado	Esperado
Ccr5/Ccr5	142	142.107	28	28.009	37	36.058
Ccr5/ 32	8	7.788	1	0.983	1	2.885
32/ 32	0	0.106	0	0.008	1	0.058
X <sup>2</sup>	0.113		0.010		16.647	
Valor p	n.s.		n.s.		p < 0.0005	

n.s.: no significativo; PG: muestra de la población general, SP: seropositivos; ESNs: expuestos seronegativos

## Discusión

La composición étnica de los colombianos es producto de una mezcla entre indígenas, europeos y africanos. Puesto que el componente caucasoide es el principal determinante de la frecuencia del alelo 32, esto podría explicar su baja prevalencia en este estudio. Además, ya que la población general incluyó personas que no solo habían nacido en Medellín, es posible que un número significativo de individuos incluidos en este grupo hubiera nacido en ciudades diferentes en las cuales no se conoce el ancestro genético.

Aunque en este estudio se encontró una mayor prevalencia del alelo 32 y del genotipo homocigótico mutado entre los ESNs, las diferencias en las frecuencias no fueron significativas (Tabla 2).

Probablemente el tamaño de la muestra tan pequeño no permitió encontrar una asociación significativa entre genotipo e infección.

En ausencia de selección positiva o negativa, o de la presencia de otros factores, la distribución de los genotipos en cada grupo debe ser similar a los valores esperados según la distribución de Hardy-Weinberg. La población general mostró una distribución genotípica en equilibrio. Teniendo en cuenta que la presencia del VIH es un factor de selección, este hecho puede explicarse de dos formas: la frecuencia del genotipo protector  $\Delta 32/\Delta 32$  es muy baja para percibirse, o el grado de exposición de nuestra población al VIH es todavía muy bajo para que aún ejerza una presión selectiva. Conociendo la frecuencia de  $\Delta 32$  y asumiendo que no hubo sesgo de selección en la muestra de población general, la frecuencia del genotipo  $\Delta 32/\Delta 32$  se puede estimar en 0.00071 (intervalo de confianza del 95% = 0.00008-0.00202). Esto significa que aproximadamente una entre 1406 personas debería tener este genotipo mutado que confiere protección contra el VIH. La distribución de los genotipos en SPs también siguió el equilibrio de Hardy-Weinberg. En vista de que todas las personas en este grupo han estado expuestas sexualmente al VIH se esperaría una mayor proporción del genotipo silvestre *ccr5/ccr5*. La baja frecuencia del alelo  $\Delta 32$  y del tamaño de la muestra dificulta el análisis y la interpretación de los hallazgos.

En el grupo ESNs la frecuencia observada fue 17 veces más alta que la frecuencia esperada (Tabla 3), esta diferencia fue altamente significativa ( $p < 0.0005$ ). Inmigraciones europeas recientes, altas tasas de mutación o alto índice de endogamia pudieran explicar la falta de equilibrio en las frecuencias genotípicas de los ESNs; sin embargo, ninguno de estos factores es frecuente en la población estudiada. Por lo tanto, la selección positiva ejercida por el genotipo  $\Delta 32/\Delta 32$  entre los ESNs es la mejor explicación para entender este hallazgo. La gran diferencia entre lo esperado y lo observado se debe a la presencia de un solo individuo con el genotipo  $\Delta 32/\Delta 32$ . De nuevo la baja frecuencia de  $\Delta 32$  hace que el número esperado de individuos homocigóticos para este alelo sea mucho menor que uno, lo cual le resta confiabilidad a la prueba de significancia estadística. Por lo anterior la protección conferida por el genotipo  $\Delta 32/\Delta 32$  no se puede derivar de estos datos, pero la misma ha sido documentada en otros estudios (10, 11-14).

La ausencia de la expresión de la molécula CCR5 en la membrana de las células del sistema inmune como consecuencia de la mutación  $\Delta 32$  en forma homocigótica, explica la resistencia a la infección sólo en bajo porcentaje (2.6%) del grupo ESNs en este estudio. Este resultado está de acuerdo con otros estudios donde se han hecho hallazgos similares (19). Esto significa que deben existir otros mecanismos responsables

de este efecto protector en la población de ESNs. Recientemente se demostró que el VIH-1 puede utilizar otros receptores de quimioquinas como las moléculas CCR2 y CCR3 para entrar a la célula blanco (20). Por lo tanto, mutaciones en estas moléculas o en sus ligandos pueden explicar la refractariedad a la infección de algunos individuos ESNs. Sin embargo, la mutación CCR2-64I en el CCR2 no se asoció con un fenotipo de resistencia sino con un retardo en el progreso a SIDA (21).

El hecho de que hasta el momento la mutación  $\Delta 32$  sea el único factor genético reportado que confiere un alto grado de resistencia a la infección por el VIH sustenta, aún más, la evidencia a favor de que la molécula CCR5 es el principal correceptor utilizado por las formas de transmisión primarias del virus o cepas M-trópicas (22). Esto hace más relevante la búsqueda de nuevas mutaciones en el gen que codifica por la molécula CCR5. En este estudio se hizo el tamizaje de nuevos polimorfismos o mutaciones en toda la región codificadora de este gen, la cual corresponde al exón 4. En los análisis de SSCP se evidenciaron alteraciones claras en los patrones electroforéticos de los productos de PCR de aquellos individuos que portaban la mutación  $\Delta 32$ .

La ausencia de otras mutaciones diferentes a  $\Delta 32$  en la región codificadora de la molécula CCR5 no descarta que puedan existir otras mutaciones en secuencias reguladoras de la expresión génica o inclusive en exones que no codifican para la proteína pero que puedan tener un efecto negativo en la expresión de CCR5 en la membrana celular. De hecho ya se han reportado diferentes mutaciones en regiones no codificadoras, incluyendo regiones reguladoras en el gen *ccr5* (23).

Con base en nuestros resultados podemos afirmar que, aunque las alteraciones de las moléculas correceptoras para el VIH tienen un papel importante en los mecanismos de susceptibilidad y resistencia a la infección por este virus, deben existir otros factores endógenos (genéticos, inmunológicos) o exógenos (cepa viral, niveles de estrés físico y emocional, estado nutricional, medio ambiente) que modifican la respuesta de cada individuo frente al virus e introducen variaciones importantes a la patogénesis del SIDA. Por lo tanto, para poder ofrecer opciones profilácticas o terapéuticas dentro de un contexto de la medicina actual, debemos tener un mejor conocimiento de los mecanismos genéticos e inmunológicos involucrados en la respuesta del ser humano al VIH.

# Abstract

**Introduction:** Repeated exposure to human immunodeficiency virus (HIV) does not always result in seroconversion. So far, only one genetic factor, a deletion of 32 base pair in the gene that codes for the CCR5 molecule, the main coreceptor for HIV penetrating the cell, confers a high degree of protection.

**Objective:** To determine the frequency of  $\Delta 32$  mutation in *ccr5* gene in Medellín, Colombia and search for other polymorphisms in the *ccr5* gene in exposed-seronegative individuals.

**Materials and Methods:** Two hundred and eighteen individuals distributed in three groups were analyzed for  $\Delta 32$  mutation in *ccr5* gene by polymerase chain reaction (PCR): 29 HIV seropositive (SP), 39 exposed seronegative (ESN) and 150 individuals as a general population sample (GPS). Other polymorphisms in the *ccr5* gene in the group of ESNs were searched for by SSCP analysis.

**Results:** The frequency of the  $\Delta 32$  mutant allele was 3.8% for ESN, 2.7% for GPS and 1.7% for SP. Only one homozygous mutant genotype ( $\Delta 32/\Delta 32$ ) was found among the ESN (2.6%). The heterozygous genotype (*ccr5*/ $\Delta 32$ ) was found in eight GPS (5.3%), in one SP (3.4%) and in one ESN (2.6%). The differences in the allelic and genotypic frequencies among the three groups were not statistically significant. A comparison between the expected and the observed genotypic frequencies showed that these frequencies were significantly different for the ESN group, which indirectly suggests a protective effect of the mutant genotype ( $\Delta 32/\Delta 32$ ). No other polymorphisms were found in the *ccr5* gene.

**Conclusions:** Since this mutant genotype explained the resistance of infection in only one of our ESN persons, we believe that in this population there must be other mechanisms of protection playing an important role in this infection.

**Key Words:** CCR5,  $\Delta 32$  mutation, HIV infection, Exposed seronegative

## Referencias

1. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subjects with long- term nonprogressive human immunodeficiency virus infection *New Engl J Med*. 1995; 332:209-217.
2. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *New Engl J Med*. 1995, 332:201-208.
3. Paxton W, Martin S, Tse D, et al. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high risk exposures. *Nat Med*. 1996; 2:412-417.
4. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996; 272.:872-877.
5. Deng H, Liu R, Ellmeier Wea. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661-666.
6. Liu R, Paxton W, Choe Sea. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86:367-377.
7. Martinson J, Chapman NH, Rees DC, Liu Y-T, Clegg MB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature Genetics*. 1997; 16:100-103..
8. Magierowska M, Lepage V, Boubnova L, Carcassi C, de Juan D, Djoulah S. Distribution of the CCR5 gene 32 base pair deletion and SDF1-3'A variant in healthy individuals from different populations. *Immunogenetics*. 1998;48:417-419.
9. Marquet S, Sánchez F, Arias M, et al. Variants of the human NRAMP1 gene and altered immunodeficiency virus infection susceptibility. *J. infect. Disease*. 1999;180:1521-5.
10. Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR-5 structural gene. *Science*. 1996; 273:1856-1862.
11. Huang Y, Paxton W, Wolinsky SM, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med*. 1996; 11:1240-1243
12. Sampson M, Libert F, Doranz Bea. Resistance to HIV-1 infection in a caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382:722-725.
13. Hoffman TI, Macgregor RR, Burger H, Mick R, Doms RW, Collman RG. CCR5 genotypes in sexually active couples discordant for human immunodeficiency virus type 1 infection status. *J Infect Dis*. 1997:1093-1096
14. Michael NI, Chang G, Louie LG, et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defect in HIV-1 transmission and disease progression *Nat Med* 1997, 3:338-340.
15. Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. . *Molecular Cloning. A laboratory manual*,. Vol. 2. New York: Cold Spring Harbor; 1989:9.14-9.23

16. Carrington M, Kissner T, Gerard B, Ivanov S, O'Brien S, Dean M. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61:1261-1267.
17. Ainsworth P, Burh L, Coulter-Mackie M. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified nonradioisotopic method as applied to a tay-sach B-1 variant. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19:405-6.
18. Oto M, Miyake S, Yuasa Y. Optimization of nonradioisotopic single strana conformational polymorphism analysis with a conventional minislab gel electrophoresis apparatus. *Annal Biochem.* 1993; 213:19-22.
19. Bernard N, Yannakis C, Lee J, Taoukas C. Human immunodeficiency virus (HIV) specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV- exposed seronegative persons. *J. Infect. Dis.* 1999;179:538-547.
20. Berger EA. Chemokine receptor as HIV-1 correceptors: role in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17:657-700
21. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Hutley GA, Lomb DA, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Haemophilia growth and developmentStudy (HGDS). Multicenter AIDS cohort Study. (MHCS), San Francisco city Cohort ALIVE study. *Science.* 1997; 277:959-65
22. Cheng-Mayer C, Liu R, Landau NR, Stamatos L. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 and utilization of the CC-CKR5 coreceptor. *J Virology.* 1997; 71:1657-1661.
23. Mummidi. S, Ahuja. SS, Daniel. BLM, Ahuja. SK. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. *J Biol Chem* 1997; 272:30662-71.