

FRECUENCIA DEL GENOTIPO CCR5 δ 32 EN MUJERES SERONEGATIVAS DE BAJO RIESGO PARA VIH, ATENDIDAS EN EL HOSPITAL NAVAL DE TALCAHUANO, CHILE.

Torres CA¹; Mora E¹; Venegas O²; Castillo JL³; Quevedo I⁴; Castillo M^{3,4}

(1) Estudiante Tecnología Médica, Mención Laboratorio Clínico, Departamento de Especialidades Médicas, Universidad de Concepción, Chile. (2) Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción, Chile. (3) Escuela de Tecnología Médica, Departamento de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción, Chile. (4) Laboratorio de Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción, Chile.

En estos últimos tiempos se han descubierto variadas formas de resistencia natural a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), siendo la principal de ellas la otorgada por la delección del gen codificante para el correceptor de químoquina CCR5, denominada *ccr5 δ 32*. Se determinó la frecuencia de esta delección en 54 mujeres de bajo riesgo para la adquisición de VIH, multíparas, seronegativas para VIH, atendidas en el Hospital Naval de la ciudad de Talcahuano, provincia de Concepción, Chile. El estudio se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para los distintos genotipos existentes en relación a la delección *ccr5 δ 32*. Los resultados obtenidos revelaron una frecuencia para el genotipo homocigoto normal (*CCR5/CCR5*) del 92,59%; para el genotipo heterocigoto (*CCR5/ccr5 δ 32*) del 7.41%; no encontrando hallazgos del genotipo homocigoto para la mutación (*ccr5 δ 32/ccr5 δ 32*). El estudio de la frecuencia alélica de la mutación arrojó un 3.7% en los eventos estudiados. Este es el primer estudio en el que determina la presencia de este mecanismo de progresión lenta en la población chilena. (REVLAB 2008; 2: 11-15).

In last years, has been described a lot of natural resistance's to HIV infection; the most important is produced by mutation of chemokine correceptor, CCR5 gene (*ccr5 δ 32*). The frequency of this mutation has been analyzed in 54 womens with down level of risk to acquisition to HIV infection, multigive birth, seronegative to HIV, and attended in the Naval's Hospital of Talcahuano, state of Concepción, Chile. This study used the protein chain reaction to analyzed different genotypes founded to the *ccr5 δ 32*. The result shown a frequency to homocygote wild type genotype (*CCR5/CCR5*) of the 95, 59%; to heterocygote genotype (*CCR5/ccr5 δ 32*) of the 7.41 %, to homocygote mutant genotype (*ccr5 δ 32/ccr5 δ 32*) has not found. The allelic frequency for the mutation was 3.7%. This is the first study has demonstrated the presence of this resistant mechanism in the Chilean population. (REVLAB 2008; 2: 11-15)

Palabras Clave: VIH, progresión lenta, *ccr5 δ 32*, frecuencia genotípica.
Key words: HIV, slow progression, *ccr5 δ 32*, genotypic frequency.

(*) Correspondencia a: Marcelo Castillo N., TM MsC(c). Laboratorio Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Fono/Fax: 56-41-2204807, Casilla 160-C E-mail: marcelocastillo@udec.cl

Introducción

Para llevar a cabo la unión a la célula huésped el virus de VIH debe cumplir con dos requisitos esenciales; presentar el antígeno CD4 en su superficie celular (CD4+) y la coexpresión, en el mismo sitio, de un correceptor específico perteneciente a la familia de los receptores de quimoquinas, efectuándose así, el reconocimiento y la posterior entrada celular del patógeno ⁽¹⁾.

La entrada del VIH a la célula blanco requiere la fusión de la membranas viral y celular,

proceso llevado a cabo por una glicoproteína propia de la envoltura del VIH, gp-160, compuesta por dos subunidades asociadas no covalentemente, gp-120 (externa) y gp-41 (transmembrana) ^(2,3). La primera de estas glicoproteínas reconoce y se une a la molécula CD4 presente en la superficie celular de linfocitos T helper, macrófagos y células dendríticas, constituyendo el primer paso en la fusión de membranas. Esto provoca una modificación de la configuración de gp-120, facilitándose la unión secundaria de ésta glicoproteína a un correceptor



de quimoquina⁽¹⁾. Dicha unión induce otro cambio conformacional, ahora de gp-41, quedando expuesta una región denominada péptido de fusión que se inserta en la membrana celular y permite la fusión de ambas membranas^(1,2), promoviéndose la entrada viral.

Los receptores de quimoquinas CCR5 y CXCR4 juegan un rol clave en la entrada del VIH-1 en células que además de exhibir estos receptores en su superficie, coexpresan al marcador CD4 en el mismo lugar⁽²⁻⁶⁾, constituyendo así los mayores correceptores para la infección de este virus⁽⁷⁻⁹⁾.

De acuerdo al tipo de correceptor utilizado (CCR5 o CXCR4) para la invasión viral, el virus puede ser clasificado en VIH-1 con tropismo macrofágico (Tropismo M), cuando utiliza el CCR5, denominándose al virus *VIH R5* constituyendo la forma predominante de transmisión, encontrada frecuentemente durante los estadios asintomáticos de la infección; y VIH-1 con tropismo linfocito T (Tropismo T), cuando utiliza el CXCR4, denominándose al virus *VIH X4* y que emerge después de la asociación temporal de la enfermedad con la disminución de células T CD4 y la progresión hacia SIDA⁽¹⁰⁾.

Evidencias clínicas sugieren mecanismos de resistencia al progreso de la infección en individuos llamados, progresores lentos o en no progresores.⁽²⁾ Se ha descrito la asociación de esta resistencia, con una delección de un segmento génico del gen codificante para una proteína receptora tipo quimoquina (CCR5), expresada en la superficie celular, la que se denomina *ccr5Δ32*, que da paso a una proteína CCR5 troncada (delección de 32 aminoácidos), no expuesta en la superficie celular^(2,10). La infección por VIH-1 en personas homocigotas para *ccr5Δ32* es extremadamente rara y cuando ocurre, es causada por cepas virales que pueden utilizar a CXCR4 para su entrada a la célula^(2,11).

Esta delección comprende dos formas genotípicas; homocigota *ccr5Δ32/ccr5Δ32*, altamente protectora frente a la infección del VIH-1 y heterocigota CCR5/*ccr5Δ32*, que proporciona una relativa protección, retardando el progreso de la infección VIH, el desarrollo de SIDA y muerte^(11, 12, 15, 17).

En estos últimos años diversos estudios se han enfocado en determinar la incidencia de este gen en diversas poblaciones humanas a lo ancho del globo a fin de establecer el mecanismo de resistencia contra el VIH predominante en estas sociedades, enriqueciendo el conocimiento epidemiológico de las zonas estudiadas en cuanto a factores determinantes en el desarrollo de infección VIH-SIDA, y aportando información

sobre los mecanismos de patogénesis que posee el virus en dichas poblaciones⁽¹⁵⁻²⁰⁾.

En América latina se han venido desarrollando algunos estudios epidemiológicos para investigar la incidencia de esta delección en poblaciones generales, seropositivas y expuestas no seropositivas al VIH, este es el caso de investigaciones en Colombia⁽²¹⁾, Brasil⁽²²⁾ y Argentina⁽²³⁾. Cabe resaltar que en Chile aún no se han reportado datos sobre la prevalencia de este marcador de resistencia.

El norte indiscutible de la realización de estos estudios es el establecimiento de las frecuencias genotípicas de este tipo de variaciones génicas, que pudiesen ser blanco de nuevas terapias anti VIH en desarrollo, dirigidas a interferir la interacción del virus con los correceptores de quimoquinas para inducir una progresión lenta hacia la etapa de SIDA.

Materiales y métodos

Pacientes. Se estudiaron 54 mujeres de bajo riesgo y seronegativas para la infección, que se atienden por diversas patologías en el Hospital Naval de Talcahuano. La clasificación en esta categoría es porque la mayoría de ellas son multíparas y no presentan anticuerpos anti-VIH. Todas las mujeres del estudio firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción.

Extracción de ADN. Se extrajo una muestra de sangre periférica con EDTA, las cuales fueron mantenidas refrigeradas hasta la extracción de ADN, el cual, se desarrolló usando el protocolo descrito por *Lahari et al*⁽²⁴⁾.

Amplificación. El fragmento específico del gen codificante para la proteína CCR5 se amplificó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores o primers: Forward; 5'-ACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCT-3', reverse; 5'-CATGATGGTGAAGATAAGCCTCAC-3', los cuales fueron descritos previamente⁽²⁵⁾. La muestras con los primer fueron sometidas a 35 ciclos de amplificación: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 58°C y a 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de amplificación se sometió a una electroforesis convencional en gel de agarosa al 3%, con un voltaje de migración de 80 mVolts. Luego, se reveló el resultado de las bandas con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta en un sistema de foto-documentación UV. El resultado del protocolo de amplificación, resultará en un amplicón de 225 pb correspondiente al producto amplificado de un

sujeto genotípicamente normal. La aparición de un amplicón de 193 pb representará al producto amplificado de un sujeto homocigoto para la mutación. En consecuencia, la presencia de ambas representará a un individuo heterocigoto.

Análisis estadístico. El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas en la población estudiada se realizó por pruebas de frecuencias en población, y estimación de parámetros en proporciones por prueba de distribución normal, con intervalos de confianza para extrapolar los resultados al universo correspondiente con un nivel de significación del 95%.

Resultados

Para conocer el genotipo de los individuos en estudio, con relación a los genes involucrados en la codificación para la proteína quimoquina CCR5 y su mutación descrita anteriormente, se somete el material genético muestreado a la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obteniéndose bandas de 255 pb para el alelo normal (CCR5) y de 193 pb para el alelo mutado (*ccr5Δ32*). La presencia de una de estas bandas por evento estudiado, denotará la homocigocidad para el alelo implicado, resultando en los genotipos homocigoto normal (CCR5 / CCR5) y homocigoto mutado (*ccr5Δ32* / *ccr5Δ32*), respectivamente. Este último genotipo no fue encontrado. La presencia de ambas bandas señalará que el evento estudiado posee un genotipo heterocigoto (CCR5 / *ccr5Δ32*). (Véase Figura 1)



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 3%. 1) Muestra a un individuo homocigoto para el alelo normal (CCR5 / CCR5). 2) Corresponde a un caso de secuencia heterocigoto (CCR5 / *ccr5Δ32*). 3) Control negativo

Se estudiaron los genotipos de 54 mujeres de bajo riesgo seronegativas para virus VIH. La frecuencia genotípica más alta se encontró para el genotipo homocigoto normal (CCR5 / CCR5), la que se presentó en 50 de los 54 casos estudiados (92,59%). En cuanto a la frecuencia para el genotipo heterocigoto (CCR5 / *ccr5Δ32*) se determinó sólo en 4 casos del total (7,41%). Durante este trabajo no hubo hallazgos de mujeres que presentaran el genotipo homocigoto para la delección de 32 nucleótidos (*ccr5Δ32* / *ccr5Δ32*). (Véase **Tabla 1**)

En relación a la frecuencia en que se encuentran los alelos en estudio (CCR5 y *ccr5Δ32*), podemos denotar que el gen normal (alelo CCR5) apareció 104 veces y el gen mutado (alelo *ccr5Δ32*) se advirtió sólo en 4 oportunidades de las 54 muestras. A continuación se calcularon los porcentajes de cada frecuencia observada, y el intervalo de confianza para cada una de ellas con un nivel de significación del 95% por pruebas de distribución normal. El alelo normal se presentó en un 96,3% de los casos con una estimación en el intervalo de confianza entre 92,73% y 99,86%. Para el alelo mutado, el porcentaje fue de un 3,7% con un intervalo de confianza entre 0,14% y 7,27%. (Véase **Tabla 2**)

Genotipo	Frecuencia Genotípica	
	Observada (Nº)	Porcentaje (%)
CCR5 / CCR5	50	92,59
CCR5 / <i>ccr5Δ32</i>	4	7,41
<i>ccr5Δ32</i> / <i>ccr5Δ32</i>	0	0
TOTAL	54	100

Tabla 1. Análisis de las frecuencias genotípicas. En la tabla se muestran los genotipos encontrados en el estudio, donde homocigoto normal (CCR5 / CCR5), se encontró en 50 muestras correspondientes al 92,59 % de las pacientes estudiadas. El genotipo heterocigoto (CCR5/*ccr5Δ32*), solo se encontró en 4 muestras, correspondientes al 7,41% de las pacientes estudiadas.

Discusión

De las frecuencias genotípicas obtenidas, se puede comentar que la incidencia denotada por los porcentajes expresados, prevalece claramente al genotipo CCR5 / CCR5 con un 92,59% de la población estudiada, poniendo en claro que es éste el mayoritario, en contraste con el porcentaje minoritario de un 7,41% expresado por el genotipo CCR5 / *ccr5Δ32* en la población en estudio. A pesar de que el genotipo homocigoto para la

mutación (*ccr5Δ32* / *ccr5Δ32*) puede aparecer sin problemas, éste no figuró entre los casos en estudio.

Sobre el realizado a las frecuencias alélicas, podemos señalar la gran incidencia que posee el alelo CCR5, tanto en su registro absoluto como relativo, con 104 eventos representando al 96,3% de la totalidad de casos estudiados, ubicándolo como ampliamente predominante en la población. Por su lado el alelo mutante, presenta un 3,7% de frecuencia en la población en estudio, denotando su estado de baja incidencia y minoritariedad en la población. Este último hecho queda enmarcado en la prueba de estimación de parámetros, en donde se analizan las frecuencias alélicas a través de un intervalo de confianza, que ayuda a extrapolar los datos muestrales adquiridos y calculados, hacia el universo correspondiente a la población en estudio. (Tabla 2)

Alelos	Frecuencia Alélica		
	Observados (N°)	Porcentaje (%)	Intervalo de confianza (NS = 95%)
CCR5	104	96,3	92,73% - 99,86%
<i>ccr5Δ32</i>	4	3,7	0,14% - 7,27%
TOTAL	108	100	

Tabla 2. Análisis de las Frecuencias alélicas. La presencia del gen normal (alelo dominante), se encontró en 1as 54 muestras analizadas, de los cuales 50 de ellos se comportaban como homocigoto dominante (2 alelos normales por paciente) y cuatro como heterocigoto (4 alelos normales y 4 alelos mutados). Estos datos entregan una frecuencia de aparición de los alelos (frecuencia alélica): CCR5 un 96,3% y *ccr5Δ32* un 3,7%.

El comentario más indicado para los resultados expuestos en la estimación de intervalos de confianza, en cuanto a la baja frecuencia del alelo *ccr5Δ32*, sería que con una seguridad del 95% se puede estimar que la aparición de éste gen se encuentra comprendida entre el 0,14% y 7,27% de las mujeres de bajo riesgo seronegativas, lo cual debe ser confirmado con un número mayor de pacientes.

Conclusión

De nuestro estudio, el primero de este tipo realizado en Chile, podemos decir, que el alelo mutante fue posible de encontrar en la población; no demostrándose su presencia en la forma de genotipo homocigoto mutante, aunque, no lo descarta. Esto se puede dar por la incidencia

demasiado baja de este alelo, tanto en la población estudiada como en la estimación de su universo, lo que conlleva a deducir que es más probable encontrarlo conjugado con el alelo normal, formando el genotipo heterocigoto, que relacionado con el mismo en ambas cromátidas hermanas, formando el homocigoto para el alelo mutante. Lo anterior se apoya en los resultados expuestos en la **Tabla 1**, demostrando que si bien el alelo se presenta de manera heterocigota en los estudios, esta combinación sólo se encuentra en un 7,41% de la población estudiada. Por lo anterior, al extrapolar la presencia de esta mutación al resto de la población, se puede concluir que sería un mecanismo de resistencia a la infección VIH de baja importancia en nuestra población, relacionado con la velocidad de progresión a SIDA; por lo que es imprescindible una adecuada política de prevención de la infección.

Es importante mencionar que una forma efectiva de corregir esta aparente ausencia del homocigoto mutado, es el aumento de los eventos muestrales analizados, lo que no sólo conllevará a enmendar esta incertidumbre, sino que también trae como consecuencia una mayor precisión de los datos calculados, con una mayor estrechez de los intervalos de confianza para extrapolar los estudios hacia el universo correspondiente.

Referencias

- ABBAS A, LICHTMAN A. Inmunología Celular y Molecular. Editorial Elsevier, quinta edición. 2002. Sección 4, capítulo 11, páginas 254 – 256.
- LEDERMAN M, NICHOLSON A, CHO M, MOSIER D. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. JAMA. 2006; 296:815–826.
- QUINTANA F, GEBER D, KENT S, COHEN I, SHAI Y. HIV-1 fusion peptide targets the TCR and inhibits antigen-specific T cell activation. The Journal of Clinical Investigation. 2005; 115(8):2149-58.
- VASSILIADOU N, TUCKER L, ANDERSON D. Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expression on peripheral blood mononuclear cells correlates with reduced HIV-1 infectability in vitro. The Journal of Immunology. 1999; 162: 7510-7518.
- TUTTLE D, HARRISON J, ANDERS C, SLEASMAN J, GOODENOW M. Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. Journal of Virology. 1998; 72(6):4962-9.
- CREERY D, WEISS W, GRAZIANI-BOWERING G, KUMAR R, AZIZ Z, ANGEL J, et al. Differential Regulation of CXCR4 and CCR5 Expression by Interleukin (IL)-4 and IL-13 Is Associated with Inhibition of Chemotaxis and Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Replication But Not HIV Entry into Human Monocytes. Viral Immunology. 2006; 19(3):409-23.
- TAYLOR J, KIMBRELL K, SCOGGINS R, DALANEY R, WU L, CAMERINI D. Expression and function of chemokine receptors on human thymocytes: implications for infection by human immunodeficiency virus type 1. Journal of Virology. 2001; 75(18):8752-60.



23. RUGELES M, SOLANO F, DIAZ F, BEDOYA V, PATIÑO P. Molecular characterization of the CCR5 gene in seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus (HIV). *Journal of Clinical Virology*. 2002; 23:161 – 169.
24. LEVINE B, SODORA D. HIV and CXCR4 in a kiss of autophagic death. *The journal of clinical investigation*. 2006. Vol. 116, number 8: 2078-80.
25. QUILLET C, OBERLIN E, BRAUN J, ROUSSET D, GONZALES-CANALI G, METAIS P, et al. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separated inherited mutation of CCR5 gene. *The Lancet*. 1998; 351(9095):14-8.
26. FU-SHENG W, WEI-GUO H, YUNZHEN C, MING-XU L, LEI J, LIANG-PING H, et al. Population survey of CCR5 32, CCR5 m303, CCR2 b 64I and SDF-1 3 A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups. *JAIDS*. 2003; 32:124 – 130.
27. ARENZANA-SEISDEDOS F, PARMENTIER M. Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors ligands. *Seminars in Immunology*. 2006; 18(6):387-403.
28. AGRAWAL L, LU X, QINGWEN J, VANHORN-ALI Z, NICOLESCU I, MCDERMOTT D, et al. Role for CCR5Delta32 protein in resistance to R5, R5X4 and X4 human immunodeficiency virus type 1 in primary CD4+ cells. *Journal of Virology*. 2004; 78(5):2277-87.
29. MARMOR M., SHEPPARD H, DONELL D, BOZEMAN S, CELUM C, BUCHBINDER S, et al. Homozygous and Heterozygous CCR5-Delta 32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2001; 27(5):472-81.
30. LI C, YAN Y, SHIEH B, LEE C, LIN R, CHEN Y. Frequency of the CCR5 delta 32 mutant allele in HIV-1-positive patients, female sex workers, and a normal population in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association*. 1997; 96(12):979-84.
31. WINKLER C, AN P AND O'BRIEN SJ. Patterns of ethnic diversity among the genes that influence AIDS. *Human Molecular Genetics*. 13:1. 2004.
32. JLIZI A, EDOUARD J, FADHLAOUI-ZID K, FRIGI S, DEBRÉ P, SLIM A, THEODOROU I, AMMAR AB AND CARPENTIER W. Identification of the CCR5-Δ32 HIV resistance allele and new mutations of the CCR5 gene in different Tunisian populations. *Human Immunology* (2007) 68, 993–1000
33. ZAWICKI P AND WITAS HW. HIV-1 protecting CCR5-Δ32 allele in medieval Poland. *Infection, Genetics and Evolution* 8 (2008) 146–151
34. FREITAS T, BREHM A, FERNANDES AT. Frequency of the CCR5-delta32 mutation in the Atlantic island populations of Madeira, the Azores, Cabo Verde, and São Tomé e Príncipe. *Hum Biol*. 2006 Dec; 78(6):697-703.
35. KAUR G, SINGH P, RAPTHAP CC, KUMAR N, VAJPAYEE M, SHARMA SK, WANCHU A, MEHRA NK. Polymorphism in the CCR5 gene promoter and HIV-1 infection in North Indians. *Hum Immunol*. 2007 May; 68(5):454-61.
36. DÍAZ FJ, VEGA JA, PATIÑO PJ, BEDOYA G, NAGLES J, VILLEGAS C, ET AL. Frequency of CCR5 delta-32 mutation in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-exposed seronegative individuals and in General Population of Medellín, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(2): 237-42.
37. PASSOS GA JR, PICANCO VP. Frequency of the delta CCR5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immunol Lett* 1998; 61(2-3): 205-7
38. MOTTA P, CIBULSKY L, ILIOVICH E, HABEGGER A. Frecuencia del alelo mutado del receptor CCR-5 en individuos HIV-1 positivos y negativos en la provincia del Chaco. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2000; 60:431-434.
39. LAHIRI DK, NURNBERGER JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(19):5444.
40. RUGELES MT, SOLANO F, DÍAZ FJ, BEDOYA VI AND PATIÑO PJ. Molecular characterization of the CCR 5 gene in seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus (HIV). *Journal of Clinical Virology* 23: 161–169, 2002.

