

INFLUENCIA DE LOS HAPLOTIPOS DEL CCR5-CCR2

**EN LA TRASMISIÓN SEXUAL DE LA INFECCIÓN
POR HIV-1 EN PAREJAS DISCORDANTES QUE VIVEN EN LA
REPÚBLICA ARGENTINA.**

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA

MAESTRANDA: BIOQ. PATRICIA PARADISO

DIRECTORA: DRA. ANDREA MANGANO

DIRECTORA ADJUNTA: DRA. LUISA SEN

LUGAR DE DESARROLLO: LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y RETROVIRUS
HOSPITAL DE PEDIATRÍA DR. JUAN P. GARRAHAN

INDICE

RESUMEN	Pág. 3
SUMMARY	Pág. 5
INTRODUCCIÓN	Pág. 7
Infección	Pág. 7
Correceptores	Pág. 9
CCR5	Pág. 10
CCR2	Pág. 15
Tropismo viral	Pág. 16
Situación epidemiológica en la Argentina	Pág. 17
Parejas discordantes	Pág. 18
OBJETIVOS	Pág. 21
Objetivo principal	Pág. 21
Objetivos secundarios	Pág. 21
MATERIALES Y METODOS	Pág. 22
Diseño del estudio	Pág. 22
Población en estudio	Pág. 22
Confirmación de la condición infectológica	Pág. 23
Caracterización de los haplotipos de los correceptores CCR5 y CCR2	Pág. 23
Evaluación estadística de los resultados	Pág. 30
RESULTADOS	Pág. 31
Población en estudio	Pág. 31
Tamizaje de infección y coinfección en los participantes de este estudio	Pág. 31
Análisis de los resultados de las reacciones de PCR y RFLP	Pág. 33
Distribución de los haplotipos y haplogrupos en el grupo control	Pág. 35
Resultados de la tipificación de haplotipos CCR5-CCR2	Pág. 36
Resultados de la tipificación de genotipos de CCR5-CCR2	Pág. 36
Seroconversiones	Pág. 39
DISCUSION	Pág. 40
Inmunología de la infección	Pág. 40
Coinfección	Pág. 43
Tipificación de haplotipos	Pág. 44
Expresión de correceptores	Pág. 45
Inmunidad mediada por células	Pág. 46
Seroconversiones	Pág. 47
CONCLUSIONES	Pág. 49
GLOSARIO	Pág. 50
ANEXO	Pág. 53
BIBLIOGRAFIA	Pág. 63

RESUMEN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida ha sido descrito hace 30 años y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) identificado como su agente causal. La infección por HIV-1 involucra la interacción entre las glicoproteínas de la cubierta viral gp120/41 y las moléculas del grupo de diferenciación 4 (CD4) expresadas en la superficie de las células hospedadoras: linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. Este evento es seguido de la unión a un receptor celular de quimioquinas (CCR): CCR5 y /o CXCR4, que permite la fijación y el subsecuente ingreso del virus según su tropismo.

Para relacionar la presencia de mutaciones en los genes que codifican estos correceptores con la susceptibilidad o protección frente a la infección, se reclutaron parejas heterosexuales de población argentina en las que una persona es HIV positiva y la otra HIV negativa, aun manteniendo condiciones de sexo no protegido. Se las conoce como parejas “discordantes”, “serodiscordantes” o “con estado serológico mixto”. Se sometió a ambos miembros de estas parejas a tamizaje serológico para la detección de antígenos y anticuerpos presentes en infecciones por HIV, HBV (Virus de la Hepatitis B), HCV (Virus de la Hepatitis C) y HTLV (Virus Linfotrópico T del Humano) al ingresar y finalizar el protocolo.

Nuestro objetivo principal fue analizar la influencia de los haplotipos en los correceptores del HIV-1: CCR5-CCR2 en población de parejas discordantes que viven en Argentina y secundariamente detectar infección y coinfección por otros patógenos virales (HBV, HCV y HTLV) en ambas cohortes, comparar las frecuencias alélicas, haplotípicas y de combinaciones de haplotipos de los correceptores obtenidas en la cohorte de infectados (seropositivos), no infectados (expuestos seronegativos) y las del grupo control; y finalmente comparar los resultados obtenidos en estas parejas con los datos de estos marcadores para transmisión perinatal en nuestra población.

Desarrollamos un estudio observacional, descriptivo, de cohortes, a doble ciego; para el cual se reclutaron individuos expuestos seronegativos (ESN) e individuos seropositivos (SP) miembros de parejas heterosexuales discordantes, adultos, que pertenecen a población argentina y mantenían sexo no protegido. La caracterización de los haplotipos se realizó mediante PCR y PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa – Longitud del polimorfismo de los fragmentos de restricción).

Incluimos ambos integrantes de 63 parejas heterosexuales discordantes. Siete mujeres y un hombre seropositivo y una mujer seronegativa no concurrieron con su compañero, pero acreditaron su condición de discordante, por lo tanto fueron incluidos en este protocolo. Todos son adultos que viven en la República Argentina, firmaron el consentimiento informado

Influencia de los haplotipos del CCR5-CCR2 en la transmisión sexual del HIV1 en parejas discordantes

y recibieron información exhaustiva sobre los objetivos de esta investigación. El período de desarrollo de este estudio fue: mínimo de un año y máximo de cinco años ($\bar{x}=2,53$ años \pm $SD=1,22$). La cohorte de seropositivos (SP) está compuesta por 40 mujeres y 31 hombres y la de expuestos seronegativos (ESN) por 31 mujeres y 33 hombres. No hallamos diferencias significativas entre ambas cohortes con respecto al sexo. Como "grupo control" (GP) se incluyeron 99 donantes de sangre de población argentina que concurrieron al Banco de Sangre del Hospital J. P. Garrahan.

El análisis de las coinfecciones evidenció que las frecuencias fueron: significativamente mayores en SP (23,9%) con respecto a ESN (3,1%) ($p=0,0005$, $RR= 7,66$ IC 95% = 1,84-31,88) entre los miembros de ambas cohortes. No se encontraron diferencias significativas comparando los resultados de ESN con las prevalencias de estas patologías en población general argentina ni entre las frecuencias de coinfección de SP con las de la población general de pacientes HIV reactivos.

El único haplotipo que evidenció diferencia significativa entre ESN y GC fue HHG2 ($\Delta 32$) ($OR = 5,92$ IC 95%: 1,59-21,99, $p=0,0045$). Comparando SP vs. GC y SP vs. ESN no se evidencian diferencias significativas. El genotipo HHE/HHE se asocia en forma significativa con mayor riesgo de infección mientras que HHE/HHF2 con un efecto protector (HHE/HHE: $OR=5,09$ IC (95%) 1,05-24,63, $p=0,0428$; HHE/HHF2: $OR=0,13$ IC (95%) 0,03-0,50, $p=0,0039$. Estos resultados coinciden con los reportados para transmisión perinatal en población argentina.

En este estudio hemos demostrado mediante la genotipificación de los haplotipos CCR5-CCR2 y sus posibles combinaciones, que existe asociación significativa con un factor predisponente HHE/HHE y otro protector HHE/HHF2 frente a la infección por el virus HIV en parejas discordantes de población argentina. El valor de este análisis radica en el hecho que hasta el momento no hay publicaciones sobre este tema en nuestra población y que el reclutamiento de estas parejas de difícil acceso nos permite estudiar posibles factores que condicionan la susceptibilidad a la infección por HIV.

La infección es el resultado de la interconurrencia de características tanto del hospedador como del virus, por lo tanto no podemos dejar de mencionar que el análisis de la variabilidad de estos correceptores es sólo un aspecto dentro del universo de posibilidades condicionantes de la transmisión viral.

SUMMARY

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) was described over thirty years ago and human immunodeficiency virus (HIV) considered as its causative agent. Infection involves interaction between viral cover glycoproteins gp120/41 and molecules that belong to the Cluster of Differentiation group 4 (CD4) expressed over target cells' surface: T lymphocytes, macrophages and dendritic cells. This event is closely followed by the binding to a cellular chemokine receptor (CCR): CCR5 and/or CXCR4, to allow according tropism, fixation and viral incoming to the cell.

For establishing the relationship between the presence of co-receptor genes' mutations with susceptibility or protection against infection, we recruited heterosexual couples whose members should be infected and non- infected, maintaining unprotected sexual intercourse within argentine population. They are known as discordant, serodiscordant or with mixed serological condition. Both members of these couples were serologically screened for detecting antigens and antibodies against HIV, HVB (Hepatitis B Virus), HCV (Hepatitis C Virus) and HTLV (Human T Lymphotropic Virus) at the beginning and ending of this protocol.

Our main aim was to settle down the consequence of differences in CCR5-CCR2 haplotypes co-receptors' over HIV infection in discordant Argentinean heterosexual couples and as secondary aims to detect other viral infections (HBV, HCV y HTLV) in the whole group; to compare allelic, haplotypic and haplotypic combinations frequencies of these co-receptors between infected and uninfected members of the couples and with Argentinean population control group and to compare these results with those obtained for the same genetic markers in perinatal transmission.

We developed an observational, descriptive, cohort, double blind study. Seronegative exposed (SNE) and seropositive (SP) individuals from heterosexual Argentinean couples were recruited. Haplotype characterization was done through PCR (Polymerase Chain Reaction) and RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Both members of 63 heterosexual discordant couples were included. Some partners decided not to concur to the interviews but seven SP women, one SP man and one SNE woman confirmed their discordant partner's condition and were included. All of them are adults, living in the República Argentina, signed informed consent and received wide information about this investigation aims. The protocol's development period was: minimum lapse one year, maximum lapse five years ($\bar{x}=2.53$ years \pm SD=1.22). SPs are 40 women and 31 men and SNEs are 31 women and 33 men, no statistical differences between both cohorts

were described according sex. 99 blood donors from argentine population from the "Banco de Sangre del Hospital J. P. Garrahan" were established as control group (CG).

Co-infection analysis revealed that SP's frequencies were significantly higher (23.9%) when compared with SNE (3.1%) ($p=0.0005$, $RR=7.66$ IC 95% = 1.84-31.88). Comparing SNE with Argentinean population frequencies or SP with HIV reactive patients no significant differences were detected.

HHG2 ($\Delta 32$) was the only one haplotype that showed statistical importance comparing SNE and CG ($OR = 5.92$ IC 95%: 1.59-21.99, $p=0.0045$). SP vs. CG and SP vs. SNE were not significantly different.

HHE/HHE genotype was associated with greater infection risks and HHE/HHF2 showed protector effect (HHE/HHE: $OR=5.09$ IC (95%) 1.05-24.63, $p=0.0428$; HHE/HHF2: $OR=0.13$ IC (95%) 0.03-0.50, $p=0.0039$). These results agree with those reported for perinatal transmission in our population.

In this study we could demonstrate through genotyping CCR5-CCR2 haplotypes of HIV co receptors and their possible combinations in serodiscordant couples belonging to Argentinean population, that there is significant association with a predisposing factor: HHE/HHE and a protector one: HHE/HHF2. This analysis' value resides over the fact that there are no publications on this subject made in our population until these days and that recruitment of these couples of difficult access, allowed us to recognize factors that may condition susceptibility to infection.

Infection is the consequence of intercurrent factors involving host and virus; we cannot fail to mention that genetic variability of these co receptors is only one single event within conditioning possibilities of viral transmission.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) ha sido descrito hace 30 años y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) identificado como su agente causal por Françoise Barré Sinoussi y Luc Montagnie (*Barre-Sinoussi y col. 1983*), cuando aislaron el retrovirus y lo identificaron como perteneciente a la familia de los *lentivirus*. Este hallazgo les valió el Premio Nobel en 2008 (1-2).

En la búsqueda de la comprensión de los mecanismos inmunopatogénicos de este agente infeccioso, los investigadores han podido dilucidar muchos interrogantes en cuanto a su epidemiología, virología, funcionamiento del sistema inmunológico y desarrollo de agentes terapéuticos (*Lehner y col. 2011*). Un hecho destacable es el crecimiento exponencial que se evidenció en la inmunología como rama de la medicina de la mano de la investigación vinculada al HIV. Actualmente es imposible pensar en inmunología si no es en estrecha relación con la comprensión molecular de la biología como herramienta para caracterizar en un proceso infeccioso al patógeno, su hospedador y la interacción entre ambos.

Infección

Está ampliamente establecido que la infección por HIV-1 típicamente involucra la interacción entre las glicoproteínas (gp) de la cubierta viral gp120/41 y las moléculas del grupo de diferenciación 4 (CD4) expresadas en la superficie de las células hospedadoras: linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. Este primer evento genera un cambio conformacional de la gp120 que expone el sitio de unión a un receptor celular de quimioquinas (CCR). Las quimioquinas son proteínas que

Influencia de los haplotipos del CCR5-CCR2 en la transmisión sexual del HIV1 en parejas discordantes

reclutan células del sistema inmune al sitio en el cual se sintetizan. El contacto del correceptor con la gp120 genera un segundo cambio conformacional exponiendo la gp41, también denominada “péptido de fusión”, para producir la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedadora (Fig.1). Liberada la nucleocápside y una vez dentro del citoplasma se retro-transcribe el genoma viral, el cual terminará copiado como ADN de doble cadena circularizado o integrado al genoma de la célula infectada como provirus. La activación celular inducirá la síntesis de dos ARN diferentes: un mARN que dará origen a las proteínas Gag y Pol y otro mARN generará el genoma de los viriones hijos (*Moore y col. 2004*).

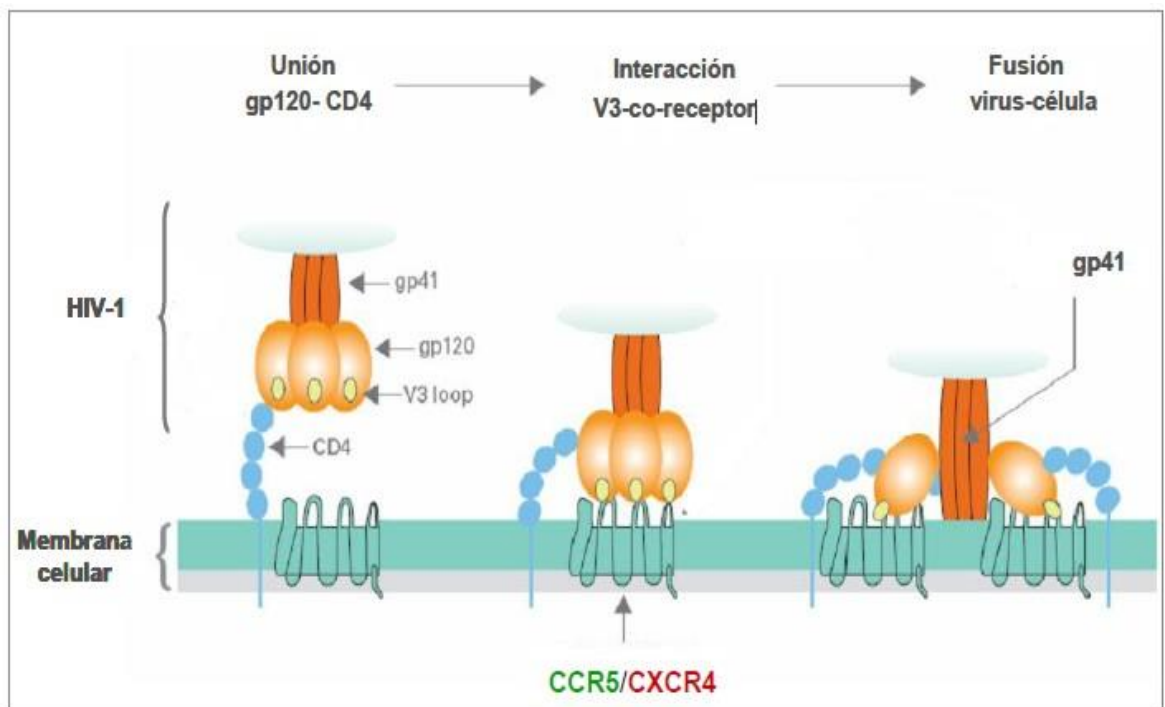


Fig. 1. Entrada viral. (Adaptado de Moore y col. 2004)

Correceptores

Los receptores celulares de quimioquinas son proteínas que poseen una estructura de siete dominios transmembrana y se asocian en el interior de la célula con la Proteína G, oficiando como transductores de señales hacia el núcleo celular. En la infección por HIV los más importantes son el CCR5 y el CXCR4, ambos permiten la fijación y el subsecuente ingreso del virus según su tropismo (Dragic y col. 1996). Existen otros receptores celulares de quimioquinas con roles menores en esta infección entre los que se encuentran CCR2 y CCR3.

CCR5 y CCR2 se encuentran codificados en el brazo corto del cromosoma 3 del humano (3p21) (Fig.2). Los ligandos naturales de estos correceptores de HIV-1 son las α -(CXC) quimioquinas para el CXCR4 y las β -(CC) quimioquinas para el CCR5.

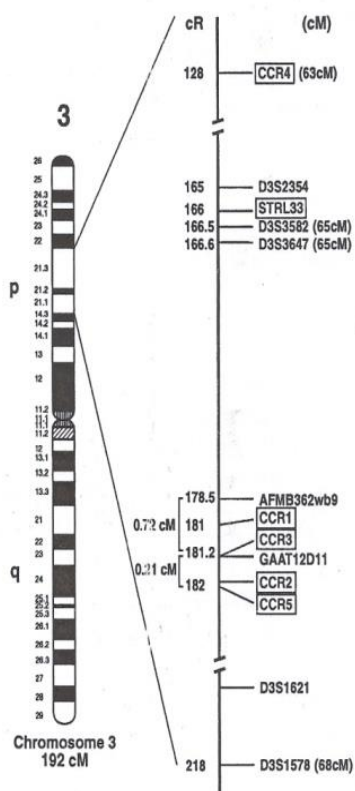


Fig. 2: Mapa de la región 3p21 del cromosoma que contiene el complejo génico CCR.

La posición de los genes de receptores de quimioquinas en el brazo corto del cromosoma 3 se muestra en relación a marcadores microsatélites vecinos.

La posición de los genes y marcadores se muestra en el mapa físico producido mediante análisis de radiación híbrida y las distancias se consignan en centirays. Entre paréntesis se expresan en centimorgans basadas en estudios de segregación familiar.

Los genes CCR1, CCR2, CCR3 y CCR5 se encuentran comprendidos en una región de 300 kb.

(Tomada de Stephens y col. 1998)

CCR5

CCR5 está predominantemente expresada en los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y de la microglía. Es probable que CCR5 cumpla algún rol en la respuesta inflamatoria a la infección, aunque su intervención en la función inmune normal, no está aun totalmente clara. Recientemente se ha detectado su expresión en líneas celulares promielocíticas, sugiriendo que podría también intervenir en la proliferación y diferenciación del linaje granulocítico. Actualmente se lo designa como CD195 (3).

Sus ligandos naturales son las β (CC) quimioquinas: CCL3/CCL3L1 (MIP-1 α - proteína inflamatoria de macrófagos-1 α , en inglés *Macrophage Inflammatory Protein 1 α*), CCL4/CCL4L1 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) quimioquina regulada y secretada en la activación de las células T normales y proteína quimioattractante de monocitos (MCP 2) (*Struif y col. 2009*).

A mediados de 1996 varios grupos de trabajo describieron una mutación en la región codificante de esta proteína que da origen a una delección de 32 pares de bases (pb) (*Liu y col. 1996, Samson y col. 1996, Huang y col.1996, Carrington y col. 1999*). La proteína troncada resultante se sintetiza pero no puede expresarse a nivel de la membrana celular (Fig. 3). La variante alélica fue denominada CCR5 Δ 32. Este hallazgo cobró importancia dado que individuos homocigotas para esta mutación poseen una “casi completa” resistencia a la infección viral y carecen de respuesta inmune mediada por CCR5, sin embargo no padecen alteraciones inmunológicas, probablemente debido a la redundancia de funciones de este tipo

de receptores (*Premack y Schall 1996*) y los heterocigotas si bien se infectan, retrasan notoriamente la progresión de la enfermedad (*Zimmerman y col. 1997*).

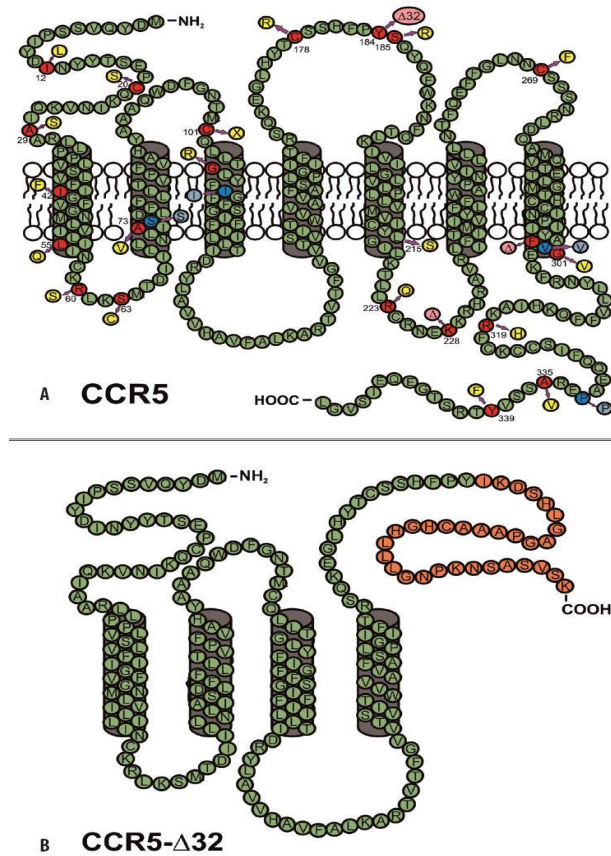


Fig. 3: Esquema de la estructura aminoacídica de CCR5

CCR5 = forma salvaje, CCR5 Δ 32 = forma mutante (Tomado de Zwolinska y col., 2013)

El alelo generado por esta mutación presenta una mayor frecuencia en población caucásica con un gradiente decreciente de norte a sur y está prácticamente ausente en asiáticos, africanos, habitantes de medio oriente e indios americanos (*adaptado de Stephens y col. 1998*) (Tabla 1).

Tabla 1: Frecuencia alélica de la mutación $\Delta 32$ de CCR5 en diferentes grupos étnicos.

Grupo étnico	Frecuencia alélica del CCR5- $\Delta 32$ (%)
Suecos, rusos, polacos, eslovacos	13 – 14
Australianos, británicos, irlandeses	11 - 12
Alemanes, checos, hispánicos, askenazis, austríacos, franceses	9 – 10
Italianos, turcos, albaneses, finlandeses, eslovenos	5 – 8
Griegos, búlgaros, mejicanos	2 – 4
Árabes, indígenas, coreanos, chinos, libaneses, africanos	0

Puede especularse que la mutación se produjo como un evento aislado en población caucásica del norte de Europa y posteriormente a la separación de los continentes. Se estima que apareció hace 700 años y que incrementó su frecuencia debido a una fuerte presión selectiva. Los agentes patógenos candidatos son: *Yersinia pestis*, *Shigella*, *Salmonella* y *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo no existen pruebas concluyentes para esta afirmación (Stephens y col. 1998).

El gen CCR5 es altamente polimórfico y también se han detectado variaciones alélicas en la región promotora, las cuales dan lugar a diferencias en la actividad transcripcional, el nivel de expresión de la proteína de membrana, la infectividad por el HIV ex vivo y la susceptibilidad a la infección (Catano y col. 2011) (Tabla 2).

Se define la homocigosis como la presencia de dos haplotipos del mismo haplogrupo y la heterocigosis indica dos haplotipos de diferente haplogrupo.

Tabla 2: Representación esquemática de los haplotipos del receptor de quimioquinas CCR5

HH	CCR2 G190A V64I	Región regulatoria CCR5-cis							CCR5 ORF
		A29G	G208T	G303A	T627C	C630T	A676G	C927T	
		58755	58934	59029	59353	59356	59402	59653	
		-2733	-2554	-2559	-2135	-2132	-2086	-1835	
HHA	64V	A	G	G	T	C	A	C	salvaje
HHB	64V	A	T	G	T	C	A	C	salvaje
HHC	64V	A	T	G	T	C	G	C	salvaje
HHD	64V	A	T	G	T	T	A	C	salvaje
HHE	64V	A	G	A	C	C	A	C	salvaje
HHF*1	64V	A	G	A	C	C	A	T	salvaje
HHF*2	64I	A	G	A	C	C	A	T	salvaje
HHG*1	64V	G	G	A	C	C	A	C	salvaje
HHG*2	64V	G	G	A	C	C	A	C	Δ 32

Se muestran las características genóticas de los haplotipos dentro de cada haplogrupo en las posiciones polimórficas CCR2-V64I (G190A); CCR5 A-2733G, G-2554T, G-2559A, T-2135C, C-2132T, A-2086G y C-1835T; y el marco abierto de lectura de los genotipos salvaje y Δ 32. HHA es el haplotipo ancestral (Mummidi y col. 2000) y los cambios relativos a esa secuencia se destacan coloreados. El sistema de numeración se refiere a los números de acceso mediante Genbank: 1) **AF031236** y **AF031237**, 2) **U95626** y 3) corresponde a un nuevo sistema de numeración basado en el primer nucleótido del sitio de inicio de la transcripción designado como +1 y el nucleótido inmediatamente corriente arriba designado como -1. (HH = haplogrupos humanos)

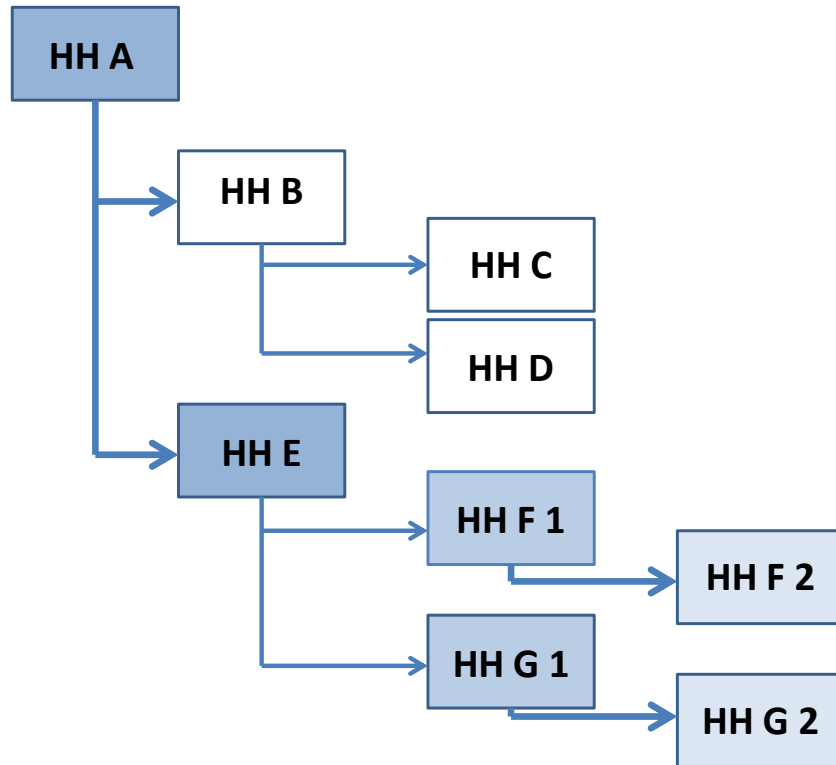


Fig. 4 Haplogrupos humanos (HH) del CCR5 (Modificado de Mummidi y col. 2000).

La Fig. 4 muestra la estrategia evolutiva utilizada para la clasificación de los HH del CCR5 y los polimorfismos que contienen. Los HH fueron generados en base a los patrones de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos de los marcos abiertos de lectura (ORF) de CCR2 (V64I) y CCR5 ($\Delta 32$) y los polimorfismos en la región promotora de CCR5. Los nueve haplotipos mayoritarios descritos se designan HHA a HHE, HHF*1, HHF*2, HHG*1 y HHG*2. Donde HHF*2 y HHG*2 indican aquellos que contienen a CCR2-64I y CCR5- $\Delta 32$, respectivamente. HHA lleva este nombre debido a la similitud entre la secuencia de este haplotipo con la del CCR5 del chimpancé.

CCR2

El receptor de C-C quimioquinas tipo 2: CCR2, actualmente denominado CD192, es una proteína que en humanos se encuentra codificada en el gen CCR2 (4), el cual puede presentar mediante empalmes alternativos dos isoformas (α y β) de un receptor para la proteína quimioattractante de monocitos tipo 1 (CCL2). La variante α (5) de la proteína está constituida por 374 aa y la variante β (6) por 360 aa. La proteína quimioattractante de monocitos (CCL2), ligando de este receptor (CCR2), es responsable de mediar la quimiotaxis de monocitos y se encuentra directamente involucrada en la infiltración monocitaria que se produce en enfermedades inflamatorias y tumorales. Estos receptores intervienen en la movilización del calcio e inhiben la adenilato ciclasa.

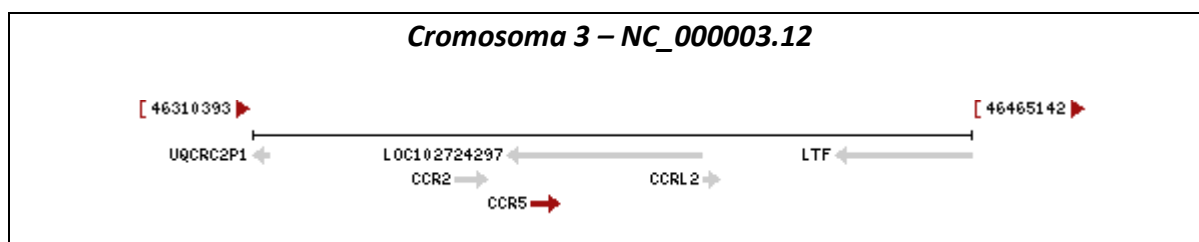


Fig. 5: Ubicación de los genes CCR5 y CCR2 en el cromosoma 3 del humano (7).

De acuerdo al esquema de la Fig. 5 podemos observar una marcada proximidad a nivel genómico entre los genes CCR2 y CCR5. Estudios realizados sobre segregación familiar han demostrado desequilibrio de ligamiento mediante la detección de SNPs (polimorfismo de un solo nucleótido -*Single Nucleotide Polymorphism*) (Clark y col. 2004). Este hecho permite hablar de haplotipos CCR2-CCR5, dado que suelen heredarse en bloque a partir del cromosoma parental del que provienen. La corta distancia entre estos genes representa un impedimento estérico para el intercambio entre cromátides

hermanas en el momento de la meiosis. Es particularmente importante destacar que en presencia de desequilibrio de ligamiento se debe ser cauto con las conclusiones. Puede asignarse una característica a un alelo dado en base a evidencias de estudios poblacionales (aún con un fuerte respaldo estadístico) y en realidad lo que ocurre es que una característica dada se encuentra fuertemente asociada a la “verdadera” causa del evento detectado.

Tropismo viral

Las cepas de HIV-1 pueden clasificarse *in vitro* por su capacidad o no de formar sincicios sobre la línea celular MT-2. Las cepas que utilizan al CCR5 son macrófago-trópicas, no formadoras de sincicios (NSI) (*Tersmette y col. 1988, Tersmette y col. 1989, Shuitemaker y col. 1991, Mosier y Sieburg 1994*) y se denominan R5, mientras que las cepas que utilizan al CXCR4 son T-trópicas, formadoras de sincicios (SI) y se denominan X4 (*Fenjo y col. 1998*).

En los primeros estadios de la infección predominan las cepas virales R5/NSI que son consideradas las cepas transmisoras y pueden ser aisladas durante el resto de los estadios de la enfermedad. Las variantes X4/SI predominan en estadios más avanzados de la infección y se asocian a una progresión clínica más acelerada con mayor pérdida de linfocitos TCD4⁺. Este cambio de tropismo se produce en el 40% de los infectados. Además existen cepas con tropismo dual R5/X4 o pueden también presentarse en forma mixta (R5 + X4). La secuencia del predominio de subtipos R5, cepas mixtas o duales y finalmente X4 suele correlacionarse con el tiempo de desarrollo de la enfermedad (*Michael y col. 1997; Berger y col. 1999; Levy y col. 2011; Moore y col. 2004*) (Fig. 6).

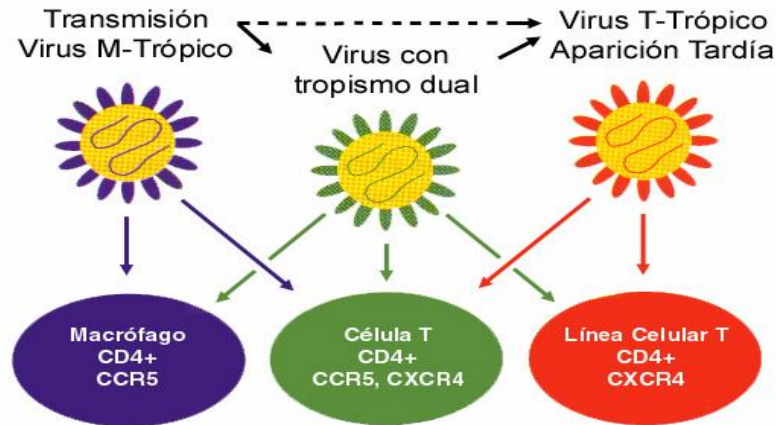


Fig. 6: Tropismo y uso de correceptores de las distintas variantes del HIV-1.
Modificado de Horulk R. 1999

Situación epidemiológica en Argentina

El Boletín Epidemiológico 2013 –principal instrumento de análisis de la situación del HIV en el país– detalla que en Argentina viven alrededor de 110.000 personas con HIV; que 4 de cada 1.000 jóvenes y adultos están infectados con el virus y que el 40% de ellos desconoce su condición (*Boletín 2013*). En nuestro país se estima que se producen 5.000 nuevas infecciones por año, de las cuales el 95% se origina por relaciones sexuales sin protección. Anualmente se contabilizan alrededor de 1.400 muertes por SIDA. En el caso de los varones, la mitad corresponde a relaciones heterosexuales. Del total de infectados, un tercio son mujeres. Las infecciones se presentan en personas de diferentes edades. El 19% de los nuevos diagnósticos ocurre en menores de 24 años y el 20% en mayores de 45 años.

Parejas Discordantes

Para que se transmita la infección por vía sexual, se requiere que el virus disrumpa la barrera de la mucosa para acceder a las células del sistema inmune que son sus objetivos de infección, sin embargo los eventos inmediatos que siguen a la exposición de las mucosas no están totalmente dilucidados. Las quasiespecies que se replican en un hospedador infectado se contraen a través de un cuello de botella y con frecuencia la infección resulta de un evento individual. En las mucosas, las células T que expresan CD4 también expresan CCR5 en altos niveles, esto las hace altamente susceptibles a la infección y por lo tanto son blancos ideales para una replicación productiva en el sitio de transmisión (*Cicala y col. 2011*).

A las parejas en las que una persona es HIV positiva y la otra es HIV negativa se las conoce como “discordantes”, “serodiscordantes” o “con estado serológico mixto”. Cuando se pretende analizar alguna condición genética en ambos miembros de estas parejas, detectarlas y fidelizarlas es la mayor limitación dado que ésta no constituye una población demasiado accesible.

En el año 2007 se conformó un grupo de trabajo integrado por el Hospital Carlos G. Durand del GCABA como principal fuente de reclutamiento (Dra. Carmen Terrones, Dra. Patricia Paradiso) y el Hospital de Pediatría SAMIC Prof. Dr. Juan Pedro Garrahan (Dra. Andrea Mangano, Dra. Luisa Sen) como lugar de desarrollo del estudio genético. El objetivo era detectar mediante técnicas de biología molecular la presencia del alelo $\Delta 32$ del CCR5 y el alelo V64I del CCR2 en ambos miembros de estas parejas (*Michael y col. 1997*). Dado el limitado número de parejas que se logró incorporar, en el año 2010 se

decidió ampliar la convocatoria y se planteó un estudio multicéntrico convocando a Centros Infectológicos de Referencia:

- ✓ Hospital de Infecciosas Francisco Muñiz del GCABA: Dra. Liliana Redini, Dr. Horacio Mingrone, Dra. Beatriz Cernigoi.
- ✓ CEADI S.R.L. (Centro de Estudios y Atención de Inmunocomprometidos): Dr. Oscar García Messina, Dr. Adrian Rodríguez.
- ✓ Fundación IDEAA (Infectología de Atención Ambulatoria): Dr. Horacio Mingrone.
- ✓ FUNCEI (Fundación Centro de Estudios Infectológicos): Dra. Edith Carbone.

La población en estudio está constituida por parejas serodiscordantes cuyo miembro infectado es tanto el hombre como la mujer. Para ingresar a este protocolo ambos miembros de la pareja aceptaron responder a las preguntas de una entrevista individual y confidencial, someterse a una extracción de sangre periférica por punción venosa con el objetivo de obtener ADN para la realización de estudios genéticos y firmaron un consentimiento informado aprobado por los respectivos Comités de Ética de los centros participantes. El miembro no infectado de la pareja además se comprometió a someterse a un tamizaje serológico, el cual consiste en la detección de antígenos y anticuerpos presentes en infecciones por HIV, HBV (Virus de Hepatitis B), HCV (Virus de Hepatitis C) y HTLV (Virus Linfotrópico T del Humano) al ingreso y la finalización del protocolo. En el caso del miembro infectado se realiza tamizaje para HBV, HCV y HTLV al mismo tiempo que su pareja.

En esta cohorte de parejas discordantes, los eventos de potencial transmisión se producen con frecuencia y el hecho que mantengan sexo no protegido es fácilmente comprobable dado que muchas de ellas consultan por embarazo, reforzando los datos

que aportan durante las entrevistas preliminares y las sucesivas que se realizan durante el transcurso de este seguimiento.

En el Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital Juan P. Garrahan se analizó la contribución para la exposición perinatal de los diferentes haplotipos que combinan distintos alelos en los correceptores CCR5-CCR2. Los resultados obtenidos en concordancia con otras publicaciones remarcan la importancia de la caracterización de haplogrupos para establecer la condición de susceptibilidad y/o protección frente a la transmisión perinatal del virus (*Mangano y col. 2001; Rocco y col. 2003*).

Las condiciones inmunológicas que se ponen en juego en la transmisión perinatal difieren sustancialmente de aquellas que condicionan la transmisión sexual, sin embargo los eventos iniciales de la infección están fundamentalmente asociados a los receptores y correceptores expresados en la membrana de las células susceptibles (*Cicala y col. 2011*).

Creemos que la caracterización genética de los alelos de estas proteínas correceptoras en esta cohorte de individuos expuestos sexualmente puede aportar datos de interés en cuanto a la susceptibilidad o protección frente al contacto viral (*Shieh y col. 2000; Kaslow y col. 2005; Catano y col. 2011; Taborda-Vanegas y col. 2011*).

En base a los conceptos anteriormente expuestos nos planteamos analizar la influencia de los haplotipos en los correceptores del HIV-1 CCR5-CCR2 en población de parejas discordantes que pertenecen a población argentina y considerando los datos obtenidos definir combinaciones haplotípicas predisponentes y eventualmente protectoras.

OBJETIVOS

Objetivo principal

- ✓ Analizar la influencia de los haplotipos en los correceptores del HIV-1 CCR5-CCR2 en población de parejas discordantes que viven en Argentina.

Objetivos secundarios

- ✓ Detectar infección y coinfección por otros patógenos virales (HBV, HCV y HTLV) en ambas cohortes.
- ✓ Comparar las frecuencias alélicas, haplotípicas y de combinaciones de haplotipos de los correceptores obtenidas en la cohorte de infectados (seropositivos) con las obtenidas en los no infectados (expuestos seronegativos) y con las de población argentina.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos en estas parejas con los datos de estos marcadores para transmisión perinatal en población argentina.

MATERIALES Y METODOS

Diseño del estudio

Estudio observacional, descriptivo, de cohortes, a doble ciego. Las muestras fueron codificadas de acuerdo a: centro, profesional que reclutó a los participantes, número de participante correspondiente a ese profesional, sexo e iniciales de nombre y apellido. Ejemplo: CEFU01FPL. Las determinaciones serológicas y genéticas se desarrollaron en diferentes laboratorios bajo esta codificación.

Población en estudio

Se reclutaron individuos expuestos seronegativos (ESN) e individuos seropositivos (SP) miembros de parejas heterosexuales discordantes, adultos, que pertenecen a población argentina.

Criterios de inclusión: 1) Pertenecer a una Pareja Discordante frente al HIV, 2) Firmar el Consentimiento Informado (Aprobado por los Centros donde se realizó la inclusión de pacientes – Anexo 1), luego de haber recibido información exhaustiva con lenguaje claro sobre los objetivos de la investigación y el asesoramiento explícito del uso del preservativo en toda relación sexual, 3) Responder en forma anónima y en privado la Encuesta (diseñada para este Protocolo), 4) Permitir la extracción de sangre (10ml) para tamizaje serológico de HIV, HBV, HCV, HTLV.

El grupo control para la comparación de frecuencias alélicas (GC) está compuesto por adultos, que cumplimentaron las condiciones, fueron aceptados mediante entrevista médica y posterior tamizaje serológico para la donación de sangre, de acuerdo a los requerimientos de la Ley 22990.

Confirmación de la condición infectológica de los participantes

Se realizaron pruebas de detección de marcadores serológicos a todos los participantes al ingresar y finalizar el protocolo.

Se empleó la metodología de quimioluminiscencia flexible (CMIA-ARCHITECT-ABBOTT) para infecciones por **Virus de la Inmunodeficiencia Humana**: anticuerpos a- HIV y proteína p24, **Hepatitis B**: antígeno de superficie (HBsAg) y anticuerpos anti-core totales (IgM+IgG), **Hepatitis C**: anticuerpos a-HCV (IgG) y **Virus Linfotrófico T del Humano**: anticuerpos a-HTLV I y II (IgG). En los casos necesarios, se realizaron pruebas confirmatorias: Western Blot para HIV y HTLV, a-HBsAg para resultados a-HBcAg reactivos y RIBA para HCV.

Caracterización de haplotipos de los correceptores CCR5 -CCR2.

Se extrajo ADN genómico partiendo de 5 ml de sangre entera anticoagulada con EDTA tripotásico al 10% (obtenida por punción venosa), mediante columnas de extracción comerciales, según el protocolo descrito por el fabricante y fue evaluado para su cuantificación mediante espectrofotometría (230-260 nm).

La caracterización de los haplotipos se realizó mediante PCR y PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa – Longitud del polimorfismo de los fragmentos de restricción), de acuerdo a *Mummidi y col. 2000*.

Se amplificaron 7 regiones del promotor del gen que codifica la proteína CCR5, una región del marco de lectura del CCR2 y otra del CCR5 para detectar la mutación de 32 pares de bases ($\Delta 32$). Salvo en el caso de la delección, el resto de los productos de PCR fueron digeridos mediante enzimas de restricción.

Las secuencias de los cebadores empleados en las reacciones de amplificación se consignan en la Tabla 3.

Las reacciones de PCR se desarrollaron en un termociclador Perkin – Elmer GENEAMP 2400. Los componentes de la mezcla de reacción para cada muestra o control se especifican en las Tablas 4 y 5.

Las condiciones de ciclado se muestran en la Tabla 6. En la Tabla 7 se especifican los sitios de corte de las enzimas de restricción empleadas.

La Tabla 8 consigna las condiciones de digestión con cada enzima de restricción, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (New England Biolabs, Fermentas) y la longitud de los fragmentos que se espera obtener en presencia de la secuencia de reconocimiento en el ADN incógnita.

Tabla 3: Secuencia de los cebadores empleados en las reacciones de PCR.
En **negrita** se indican los nucleótidos que se introducen para modificar los sitios de restricción.

POLIMORFISMO	PRIMER	SECUENCIA 5' > 3'
CCR5 Δ32	Forward	GTCTTCATTACACCTGCAGCTCT
	Reverse	CACAGCCCTGTGCCTCTT
CCR2 V64I	Forward	TTGTGGGAAACATG A TGG
	Reverse	GAGCCCAACAATGGGAGAGTA
CCR5 2733	Forward	GAGCCAAGGTCACGGAAGCCC
	Reverse	GGACCCAGGATCTTAGTG
CCR5 2554	Forward	TTGCCTTCTTAGAGATCACAAAGCTCCCACACAGATGCTCACCACCAATATTATTGTTCC
	Reverse	TCTGTAAACGG A GA
CCR5 2135	Forward	CAGAGAACAAAAACAAAATAATCCAGTGCGAAAAGCCCGTAAATAAAG
	Reverse	GATAATTGTATGAGCACTTGGTG
CCR5 2132	Forward	GGTTAATGTGAAGTCCAGGATCCAACAGTTCTTCTTTTAAAGTTGAGCTTAAATAAAG
	Reverse	CTAGAGAATAGATCTCTGGT T T
CCR5 2086	Forward	GGTATAATGTGAAGTCCAGGATCCCATTAAGTGTATTGAAGGCGAAAAGAATCAGAGA
	Reverse	ACAGTT G ATC
CCR5 1835	Forward	GTTGGTTTAAGTTGGCTTATCTTAAAGATTATATTTAAGATAATTGTATGAGC
	Reverse	ACTTGGTGT T TGCCA G AT

Tabla 4: Componentes de la Mezcla de Reacción para detección de SNPs en la región promotora del gen CCR5

Polimorfismo	A29G		G208T		T627C		C630T		A676G		C927T	
	2733		2554		2135		2132		2086		1835	
MIX para PCR	μl	cc final	μl	cc final	μl	cc final	μl	cc final	μl	cc final	μl	cc final
Buffer	2,5	10%	2,5	10%	2,5	10%	2,5	10%	2,5	10%	5	20%
dNTPs 10 mM	1	0,4 mM	1	0,4 mM	1	0,4 mM	1	0,4 mM	1	0,4 mM	1	0,4 mM
Cl₂Mg 50 mM	1,25	2,5 mM	1,5	3 mM	1	2 mM	1,5	3 mM	0,75	1,5 mM	0,25	0,5 mM
Forward 10 μM	0,25	0,1 μM	0,11	0,1 μM	0,25	0,1 μM	0,25	0,1 μM	0,25	0,1 μM	0,25	0,1 μM
Reverse 10 μM	0,25	0,1 μM	0,11	0,1 μM	0,25	0,1 μM	0,25	0,1 μM	0,25	0,1 μM	0,25	0,1 μM
DMSO	2	0,08%	-----									
Taq 5U/μl	0,2	0,04	0,2	0,04	0,2	0,04	0,2	0,04	0,2	0,04	0,2	0,04
H₂O	7,55		9,575		9,8		9,3		10,05		8,05	
Mix total	15		15		15		15		15		15	
ADN (10μg/μl)	10		10		10		10		10		10	
Volumen final	25		25		25		25		25		25	

Tabla 5: Componentes de la Mezcla de Reacción para detección de mutaciones en el marco de lectura de los genes CCR2 y CCR5

Polimorfismo	CCR5 Δ32		CCR2 64I	
	μl	cc final	μl	cc final
MIX para PCR				
Buffer	5	20%	5	20%
dNTPs 10 mM	1	0,4 mM	1	0,4 mM
Forward (10 μM)	1	0,1 μM	1	0,1 μM
Reverse(10 μM)	1	0,1 μM	1	0,1 μM
Taq 5U/μl	0,3	0,06	0,3	0,06
H2O	11,7		11,7	
Mix total	20		20	
ADN (10mg/ml)	5		5	
Volumen final	25		25	

Tabla 6: Condiciones de ciclado para la genotipificación de los haplotipos de los genes CCR2 y CCR5

Polimorfismo	A29G 2733	G208T 2554	T627C 2135	C630T 2132	A676G 2086	C927T 1835	CCR5 Δ32	CCR2 V64I
Pre- incubación	95°C 90 seg	95°C 90 seg	95°C 90 seg	94°C 240 seg	95°C 90 seg	95°C 90 seg	94°C 90 seg	94°C 90 seg
Melting	94°C: 30 seg	94°C: 30 seg	94°C: 30 seg	94°C 30 seg	94°C 30 seg	94°C 30 seg		
Annealing	57°C 30 seg	50°C 30 seg	55°C 30 seg	57°C 30 seg	60°C 60 seg	55°C 30 seg		
Extensión	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg		
	5 ciclos	5 ciclos	5 ciclos	5 ciclos	5 ciclos	5 ciclos		
Melting	94°C 10 seg	94°C 10 seg	94°C 10 seg	94°C 10 seg	94°C 10 seg	94°C 10 seg	94°C 30 seg	94°C 30 seg
Annealing	57°C 30 seg	50°C 30 seg	55°C 30 seg	57°C 30 seg	60°C 60 seg	55°C 30 seg	60°C 30 seg	56°C 30 seg
Extensión	72°C: 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 30 seg
	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos
Extensión Final	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min

Tabla 7: Sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, en rojo se visualizan los extremos generados por el corte enzimático reconociendo secuencias palindromicas.

Nombre de la enzima	Microorganismo del que proviene	Secuencia de reconocimiento
Bam H I	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	5' GGATCC 3' CCTAGG
Bsma I	<i>Geobacillus sterothermophilus</i>	5' GAT NNNN ATC 3' CTA NNNN TAG
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' AAGCTT 3' TTCGAA
Dra I	<i>Deinococcus radiophilus</i>	5' TTTAAA 3' AAATTT
Alw I	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	5' GGATC (N4) 3' CCTAG (N5)
Eco R V	<i>Escherichia coli</i>	5' GAT ATC 3' CTATAG
Bsa B I	<i>Geobacillus sterothermophilus</i>	5' GTCTC (N6) 3' CAGAG (N6)

Tabla 8: Condiciones de digestión de los productos de PCR para la detección de genotipos
BSA = albúmina bovina, ON = over night –durante toda la noche

POLIMORFISMO	29	208	627	630	676	927	CCR2
	2733	2554	2135	2132	2086	1835	64I
DIGESTIÓN							
	Bam HI	Bsma I	Hind III	Dra I	Alw I	Eco RV	Bsa BI
Enzima U/ml	0,5 µl	1 µl	0,5 µl	0,5 µl	3,75 µl	0,5 µl	0,5 µl
Buffer 10x	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
BSA (10 mg/ml)	0,5 µl	-----				0,5 µl	-----
H2O	19 µl	19 µl	19,5 µl	19,5 µl	16,25 µl	19 µl	19,5 µl
Volumen mezcla	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Producto de PCR	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Volumen final	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Temperatura ON	37°C	55°C	37°C	37°C	37°C	37°C	60°C
TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS EN pb							
Fragmento sin digerir	337	495	382	379	412	635	128
Salvaje	337	455	382	379	385	451	128
Mutante	228	495	334	287	349	397	118

La Fig. 7 es un ejemplo de los resultados obtenidos para la detección de la mutación A29G. La longitud de los fragmentos obtenidos se dedujo mediante comparación en cada corrida electroforética con un marcador de tamaño molecular estándar (LMW DNA Ladder – Biolabs) sometido a las mismas condiciones: gel de agarosa (TAE- 4% Agarosa Ultrapure), Intensidad: 10 mV por cm de gel, revelado por tinción con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta.

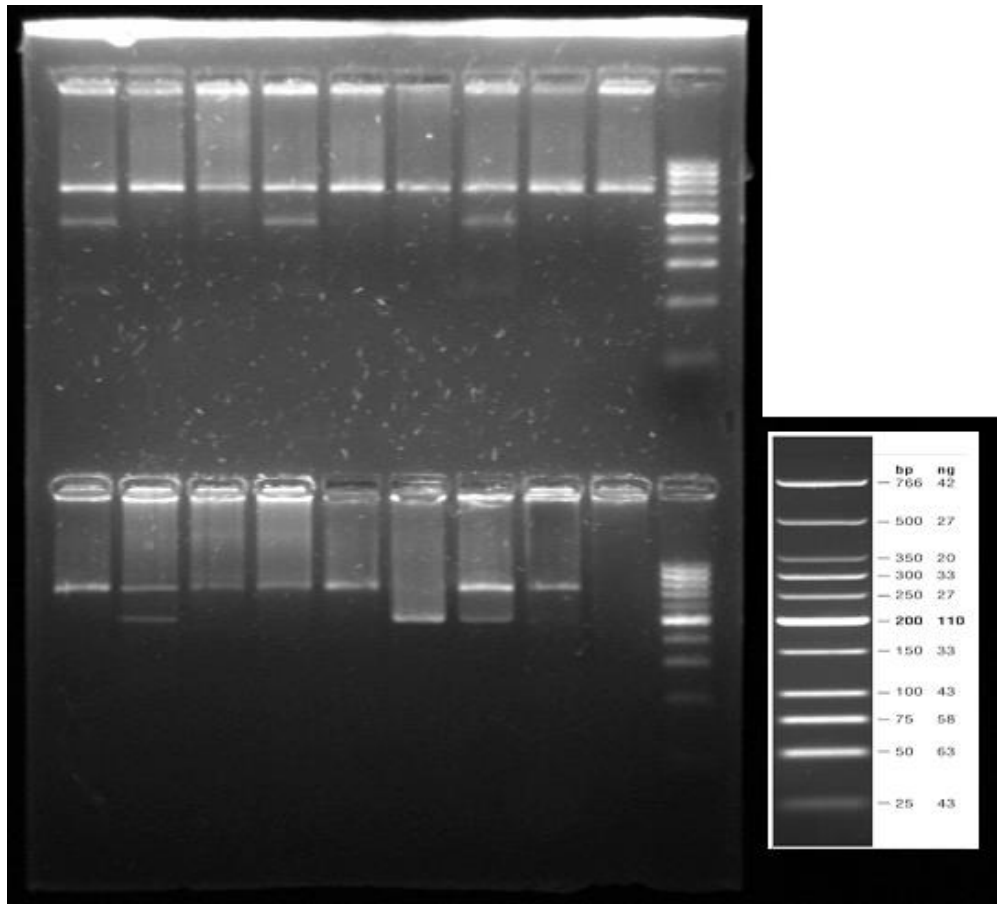


Fig. 7: Gel de agarosa con resultados de la digestión para la detección de la mutación A29G, fenotipo salvaje: 337 pb, fenotipo mutante: 228 pb. Calles 1, 4, 7 y 12: muestras heterocigotas, Calles 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14 y 15: muestras homocigotas para el alelo salvaje, Calle 16: control homocigota mutado, Calle 17: control heterocigota, Calle 18 control homocigota salvaje, Calle 19: control de contaminación de la reacción y Calles 10 y 20: marcador de tamaño molecular

Evaluación estadística de los resultados obtenidos

Para evaluar la influencia de los distintos haplotipos y sus combinaciones en la transmisión sexual de la infección por HIV-1 se calcularon las frecuencias: haplotípicas y de combinaciones haplotípicas en ambas cohortes en estudio.

En base a los datos de frecuencia poblacional de estos marcadores genéticos, se compararon las frecuencias en el grupo control (GC) y ambas cohortes: seropositivos (SP) y expuestos seronegativos (ESN).

Se empleó el Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg para verificar la distribución de haplotipos y combinación de haplotipos de GC, SP y ESN con 1 grado de libertad.

Las frecuencias halladas se compararon mediante tablas de contingencia de 2 x 2 evaluadas por el test de Fisher o Chi² según corresponda de acuerdo al número de casos y con niveles de significancia de $p < 0.05$.

En el grupo de parejas discordantes se evaluó la influencia de los haplotipos y sus combinaciones en cuanto a la susceptibilidad a contraer la infección por vía sexual mediante el Odds Ratio para cada haplotipo y combinaciones de haplotipos (SP vs. ESN, SP vs. GC y ESN vs. GC).

RESULTADOS

Población en estudio

Se incluyeron ambos integrantes de 63 parejas heterosexuales discordantes. Siete mujeres y un hombre seropositivo y una mujer seronegativa no concurren con su compañero pero acreditaron la condición de discordante presentando el resultado correspondiente. La cohorte de seropositivos (SP) está compuesta por 40 mujeres y 31 hombres y la de expuestos seronegativos (ESN) por 31 mujeres y 33 hombres. No hallamos diferencias significativas entre las cohortes de ESN y SP con respecto al sexo.

Todos son adultos, viven en la República Argentina y cumplieron con los criterios de inclusión. Durante las entrevistas se les ofreció consejo médico para evitar la transmisión viral, sin embargo el 10% de las mujeres (ESN o SP) consultó por seguimiento de embarazo. El período de desarrollo de este estudio fue como mínimo de un año y máximo de cinco años ($\bar{X}=2,53$ años \pm SD=1,22).

Como “grupo control” (GP) se incluyeron 99 donantes de sangre que concurren al Banco de Sangre del Hospital J. P. Garrahan, adultos, pertenecientes a población argentina y calificados biológicamente. Los datos obtenidos a partir del análisis de este mismo grupo de referencia fueron empleados por *Rocco y col. (2003)* para la comparación de frecuencias haplotípicas de CCR5-CCR2 en niños hijos de madres seropositivas.

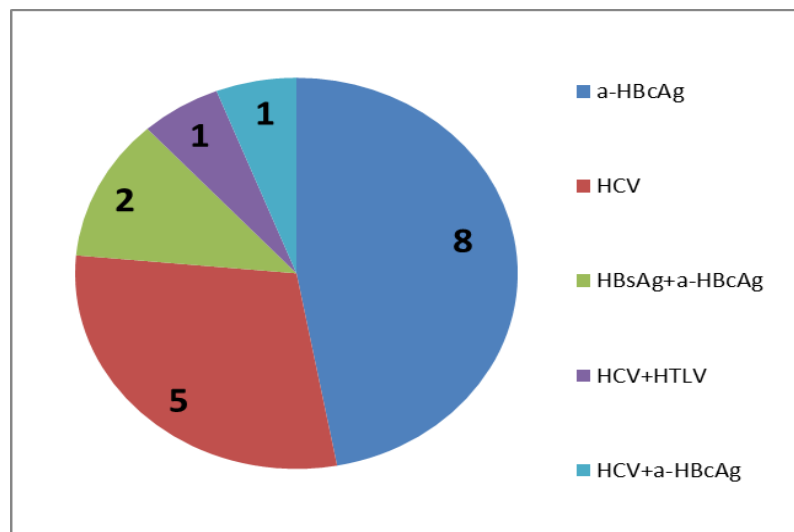
Tamizaje de infección y coinfección en los participantes del estudio

Se analizaron muestras de suero de todos los participantes en este estudio de cohortes. En el ingreso y al finalizar el protocolo se tamizaron marcadores serológicos

para infección por HIV, HBV, HCV y HTLV, para verificar la existencia o no de seroconversión en ESN. En casos reactivos se procedió a confirmar la infección detectada. Los resultados obtenidos para SP se muestran en el Gráfico 1.

En ESN se detectaron dos casos de coinfección, uno presentó a-HBcAg y otro a-HCV. En ambos casos el otro miembro de la pareja (SP) evidenció los mismos resultados.

Gráfico 1: Casos de coinfección en miembros HIV reactivos.



Las frecuencias de coinfección fueron: significativamente mayores en SP (23,9%) con respecto a ESN (3,1%) ($p=0.0005$, $RR= 7,66$ IC 95% = 1,84-31,88) entre los miembros de ambas cohortes.

Comparando los resultados de ESN con las prevalencias de estas patologías en población general argentina, no existen diferencias significativas (*Paradiso y col. 1997, Vargas y col. 2008, Paradiso y col. 2010*). Comparando los resultados de SP con las frecuencias de coinfección de la población general de pacientes HIV reactivos, no se encontraron diferencias significativas (*Coviello y col. 2009*).

Análisis de los resultados de las reacciones de PCR y PCR-RFLP

Para realizar la genotificación de los haplotipos CCR5-CCR2 de los integrantes de este estudio, se empleó la metodología PCR/ PCR-RFLP. La Tabla 9 muestra los resultados teóricos que deben obtenerse para caracterizar los haplotipos como: HHA, HHB, HHC, HHD, HHE, HHF1, HHF2, HHG1 y HHG2 y todas sus combinaciones posibles. La condición de ausencia de la mutación en referencia a la secuencia del haplotipo ancestral (homocigota salvaje) se consigna con "0", la heterocigosis (salvaje/mutante) con "1" y la homocigosis mutante con "2".

Tabla 9: Clasificación de los Haplotipos Humanos de CCR5 según el modelo propuesto por Mummidi y col. (2000) Homocigota wt=0; Heterocigota=1; Homocigota mutante=2

CCR2 G190A	-2733 A29G	-2554 G208T	-2135 T627C	-2132 C630T	-2086 A676G	-1835 C927T	CCR5 Δ 32	Hap.1	Hap. 2	HH
0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	AA
0	0	1	0	0	0	0	0	A	B	AB
0	0	1	0	0	1	0	0	A	C	AC
0	0	1	0	1	0	0	0	A	D	AD
0	0	0	1	0	0	0	0	A	E	AE
0	0	0	1	0	0	1	0	A	F1	AF1
1	0	0	1	0	0	1	0	A	F2	AF2
0	1	0	1	0	0	0	0	A	G1	AG1
0	1	0	1	0	0	0	1	A	G2	AG2
0	0	2	0	0	0	0	0	B	B	BB
0	0	2	0	0	1	0	0	B	C	BC
0	0	2	0	1	0	0	0	B	D	BD
0	0	1	1	0	0	0	0	B	E	BE
0	0	1	1	0	0	1	0	B	F1	BF1
1	0	1	1	0	0	1	0	B	F2	BF2
0	1	1	1	0	0	0	0	B	G1	BG1
0	1	1	1	0	0	0	1	B	G2	BG2
0	0	2	0	0	2	0	0	C	C	CC
0	0	2	0	1	1	0	0	C	D	CD
0	0	1	1	0	1	0	0	C	E	CE
0	0	1	1	0	1	1	0	C	F1	CF1
1	0	1	1	0	1	1	0	C	F2	CF2
0	1	1	1	0	1	0	0	C	G1	CG1
0	1	1	1	0	1	0	1	C	G2	CG2
0	0	2	0	2	0	0	0	D	D	DD
0	0	1	1	1	0	0	0	D	E	DE
0	0	1	1	1	0	1	0	D	F1	DF1
1	0	1	1	1	0	1	0	D	F2	DF2
0	1	1	1	1	0	0	0	D	G1	DG1
0	1	1	1	1	0	0	1	D	G2	DG2
0	0	0	2	0	0	0	0	E	E	EE
0	0	0	2	0	0	1	0	E	F1	EF1
1	0	0	2	0	0	1	0	E	F2	EF2
0	1	0	2	0	0	0	0	E	G1	EG1
0	1	0	2	0	0	0	1	E	G2	EG2
0	0	0	2	0	0	2	0	F1	F1	F1F1
1	0	0	2	0	0	2	0	F1	F2	F1F2
0	1	0	2	0	0	1	0	F1	G1	F1G1
0	1	0	2	0	0	1	1	F1	G2	F1G2
2	0	0	2	0	0	2	0	F2	F2	F2F2
1	1	0	2	0	0	1	0	F2	G1	F2G1
1	1	0	2	0	0	1	1	F2	G2	F2G2
0	2	0	2	0	0	0	0	G1	G1	G1G1
0	2	0	2	0	0	0	1	G1	G2	G1G2
0	2	0	2	0	0	0	2	G2	G2	G2G2

Distribución de haplotipos y haplogrupos en el grupo control

El Gráfico 2 muestra las frecuencias de los haplotipos, según el análisis realizado en el grupo control de 99 donantes de sangre (Rocco y col 2003). La Tabla 10 muestra las frecuencias de combinación de haplogrupos en GC.

Gráfico 2: Composición Haplotípica del Grupo Control (n=99)

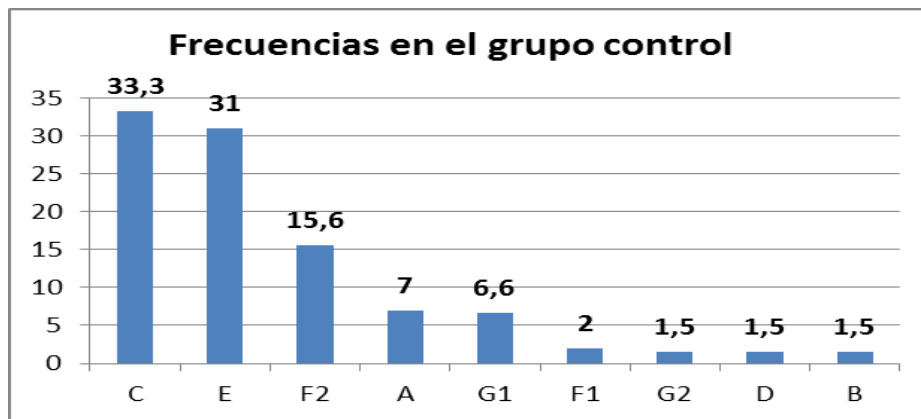


Tabla 10: Frecuencia de combinaciones de haplotipos en el grupo control

HH	Casos	Frecuencia	HH	Casos	Frecuencia
AC	3	0,03	DE	1	0,01
AE	7	0,07	DF2	2	0,02
AF2	2	0,02	EE	6	0,06
AG1	2	0,02	EF2	8	0,08
BC	2	0,02	EG1	5	0,05
BE	1	0,01	EG2	1	0,01
CC	10	0,1	F1F1	1	0,01
CE	24	0,24	F1F2	1	0,01
CF1	1	0,01	F2F2	4	0,04
CF2	10	0,1	F2G1	1	0,01
CG1	4	0,04	G1G2	1	0,01
CG2	2	0,02	Total	99	0,99

Resultados de la tipificación de haplotipos CCR5-CCR2

La Tabla 11 muestra los resultados de la tipificación de haplotipos en SP, ESN y GC.

Tabla 11: Haplotipos de CCR2-CCR5. n=número de casos y frec.: frecuencia

HAPLOTIPO	SP n (frec.)	ESN n (frec.)	GC n (frec.)
A	6 (4,2)	6 (4,7)	14 (7)
B	1 (0,79)	0 (0)	3(1,5)
C	46 (32,6)	34 (27)	66 (33,3)
D	0 (0)	0 (0)	3 (1,5)
E	45 (31,7)	36 (28)	61(30,8)
F1	4 (2,8)	6 (4,7)	4 (2)
F2	28 (19,7)	30 (23)	31 (15,6)
G1	7 (4,9)	6 (4,7)	13 6,6)
G2	5 (3,5)	10 (7,8)	3(1,5)

El único haplotipo que evidenció diferencia significativa entre ESN y GC fue el HHG2 (Δ 32) OR = 5.92 IC 95%: 1,59-21,99, $p=0,0045$. Comparando las frecuencias SP vs. GC y SP vs. ESN no se evidencian diferencias significativas.

Resultados de la tipificación de genotipos CCR5-CCR2

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la tipificación de genotipos de ambas cohortes de este estudio. Se calcularon los OR – IC 95% de cada combinación de haplotipos en los casos posibles por presencia del haplogrupo en ambas cohortes (sombreado en Tabla 12).

El haplogrupo HHE/HHE se asocia con mayor riesgo de infección mientras que HHE/HHF2 ejercería un efecto protector. Los resultados obtenidos fueron significativos:

✓ HHE/HHE: OR= 5,09 IC (95%) 1,05-24,63, p=0,0428

✓ HHE/HHF2: OR= 0,13 IC (95%) 0,03-0,50, p=0,0039

Se empleó el Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg para verificar la distribución de las mutaciones detectadas y que dan origen a los alelos, haplotipos y combinación de haplogrupos de GC, SP y ESN con 1 grado de libertad. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13.

Tabla 12: Genotipos de CCR2-CCR5. n=número de casos y frec.: frecuencia

HH	SP		ESN	
	n	frec.	n	frec.
AA	0	0	1	1,6
AB	1	1,4	0	0
AC	3	4,2	2	3,1
AE	0	0	1	1,6
AF2	2	2,8	1	1,6
CC	7	9,8	3	4,7
CE	16	22,5	11	17,1
CF1	0	0	2	3,1
CF2	12	16,9	8	12,5
CG1	1	1,4	3	4,7
CG2	0	0	1	1,6
EE	9	12,7	2	3,1
EF1	1	1,4	2	3,1
EF2	3	4,2	13	20,3
EG1	4	5,6	3	4,7
EG2	3	4,2	2	3,1
F1F1	1	1,4	0	0
F1F2	1	1,4	0	0
F1G2	0	0	2	3,1
F2F2	3	4,2	2	3,1
F2G1	2	2,8	1	1,6
F2G2	2	2,8	3	4,7
G2G2	0	0	1	1,6
Total	71	99,7	64	100

Tabla 13: n=número de casos y frec.: frecuencia de mutaciones detectadas en SP, ESN y GC

MUTACION	nucleótidos	SP		ESN		GC	
		n	frec.	n	frec.	n	frec.
A29G	AA	59	83	50	78	83	84
	AG	12	17	13	20	15	15
	GG	0	0	1	2	1	1
G208T	GG	30	42	31	48	39	39
	GT	34	48	30	47	48	48
	TT	7	1	3	5	12	12
G303A+T627C	GT-GT	11	15	6	9	15	15
	GT-AC	31	44	27	42	56	57
	AC-AC	29	41	31	48	28	28
C630T	CC	71	100	64	100	97	98
	CT	0	0	0	0	2	2
	TT	0	0	0	0	0	0
A676G	AA	32	45	34	53	43	10
	AG	32	45	27	42	46	46
	GG	7	1	3	5	10	43
C927T	CC	44	62	30	47	69	70
	TC	22	31	32	50	28	28
	TT	5	7	2	3	2	2
CCR5 Δ 32	WT-WT	66	93	55	86	95	96
	WT-Δ32	5	7	8	12	4	4
	Δ32 -Δ32	0	0	1	2	0	0
V64I	VV	47	66	36	56	71	72
	VI	21	30	26	41	24	24
	II	3	4	2	3	4	4

En todos los casos se verificó el cumplimiento del Equilibrio de Hardy-Weinberg salvo con la mutación C630T, probablemente debido a la baja frecuencia detectada del alelo HD en ambas cohortes analizadas.

Seroconversiones

Tres hombres y una mujer evidenciaron en el control serológico realizado antes de finalizar este estudio haber contraído la infección por HIV. La tasa de seroconversión en estas parejas heterosexuales, resultó del 6,25% durante el período en el cual se desarrolló esta investigación.

En dos de los seroconvertidores se comprobó que la cepa viral infectante era la misma que estaba presente en su pareja. Los otros dos casos no pudieron concretar esta verificación dadas las bajas cargas virales detectadas.

La metodología empleada para este análisis fue desarrollada por la Dra. Paula Aulicino del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital Garrahan, quien amplificó secuencias del gen *env* del HIV, confirmando la transmisión de cepas con tropismo R5.

En cuanto a la combinación de haplotipos presente en estos individuos detectamos dos con HHE/HHF2 (una mujer y un hombre), un hombre HHC/HHE y otro hombre HHC/HHF1.

DISCUSION

En este estudio hemos demostrado mediante la genotipificación de los haplotipos CCR5-CCR2 y sus posibles combinaciones, que existe asociación estadística significativa con un factor predisponente HHE/HHE y otro protector HHE/HHF2 frente a la infección por el virus HIV en parejas discordantes de población argentina.

El valor de este análisis radica en el hecho que hasta el momento no hay publicaciones sobre este tema en nuestra población. Si bien las parejas discordantes han sido objeto de este tipo de estudios, éstos han sido desarrollados sobre grupos humanos con diferentes características étnicas (*Correa Vieira y col. 2011; Malhotra y col. 2011; Zapata y col. 2013; Chaudhari y col. 2014*) y dado que la frecuencia de estos alelos difiere notoriamente con la etnia resulta evidente la razón de la discordancia de resultados.

La población argentina se la define como caucásica dado el aporte de corrientes inmigratorias fundamentalmente provenientes de Europa, lo cual puede comprobarse mediante el análisis comparativo de las frecuencias alélicas, haplotípicas y genotípicas de otros marcadores genéticos: antígenos de histocompatibilidad HLA, antígenos eritrocitarios y alelos de proteínas y enzimas plasmáticas (*Piehl y col 1992, Paradiso y col. 199(a)2, Paradiso y col. 1992(b), Paradiso y col. 1992(c), Paradiso y col. 1993(a), Paradiso y col. 1993(b)*).

Inmunología de la infección

La mayoría de las infecciones por HIV resultan mediante transmisión a través de mucosas. La transmisión vaginal y rectal son las responsables de la infección en adultos,

mientras que en pediatría, la infección resulta de la ingestión oral de fluidos maternos, probablemente debido al pH neutro del jugo gástrico en los neonatos.

Actualmente la vía heterosexual es la mayor responsable de la expansión de la infección, sin embargo el tracto genital femenino es uno de los sitios menos eficientes para la transmisión, recientemente se ha sugerido que 1 de cada 900 exposiciones heterosexuales resultan en transmisión vaginal. La razón de este hecho no está demasiado clara dada la variabilidad de ese medio. Si bien se asocia con alta carga viral del semen, el entorno vaginal se defiende mediante barreras de inmunidad innata de mucosa. El mucus y el espesor del epitelio vaginal resultan preponderantes para la protección.

La transmisión a través del epitelio escamoso vaginal involucra la interacción del virus con células dendríticas y linfocitos T CD4+/CCR5+ presentes en la superficie de la mucosa vaginal. Las células dendríticas vaginales (células de Langerhans) no expresan ni CD4 ni CCR5, pero podrían oficiar de transportadoras adhiriendo el virus mediante receptores de lectina tipo C dependientes de manosa (MCLR). Una vez que el virus fue capturado, estas células migran y presentan el virus a la lámina propia que contiene abundantes linfocitos T CD4+/CCR5+ y macrófagos. Los linfocitos T CD4+/CCR5+ de memoria son los blancos primarios para la infección y replicación viral en los primeros estadios de la transmisión, por lo tanto la probabilidad de infección a través de mucosas es directamente proporcional a la disponibilidad de este tipo de linfocitos en estos tejidos.

La infección resulta de la formación de un nido de células formado por linfocitos T CD4+/CCR5+ que genera reacción inflamatoria resultando en el reclutamiento y

activación de más linfocitos T CD4⁺, con lo cual el nido se expande hasta que las células abandonan la mucosa y entran en los linfáticos aferentes de los ganglios de drenaje. Posteriormente las células infectadas alcanzarán el intestino que contiene la mayoría de las células blanco de la infección viral, su replicación, amplificación y establecimiento de infección irreversible (Xu H y col. 2013).

En el caso de transmisión por vía rectal, la mucosa intestinal es la zona donde mejor se desarrolla la amplificación de la infección en forma temprana. El tejido linfoide asociado al intestino (gut-associated lymphoid tissue: GALT) es el sitio de mayor persistencia viral en infectados crónicos.

Independientemente de la vía de transmisión se ha demostrado que hay una masiva infección y depleción de linfocitos T CD4⁺/CCR5⁺ activados de memoria que se corresponde con la alta carga viral plasmática que se evidencia pocos días post infección.

El rol preponderante del correceptor CCR5 está claramente establecido mediante el análisis del algoritmo del mecanismo de infección. Más aún, cabe mencionar el caso de Timothy Brown, conocido como el paciente de Berlín. Este hombre infectado recibió un trasplante de médula ósea proveniente de un donante histoidéntico cuyo genoma naturalmente carecía de CCR5 (homocigota para la mutación $\Delta 32$). Siete años después de dos episodios de trasplante de médula ósea del mismo donante, el Sr. Brown permanece curado tanto de la infección como de la leucemia que motivó el trasplante. Este hallazgo incluye biopsias de cerebro, intestino y nódulos linfáticos (Allers y col. 2011, Levy 2012).

Coinfección

Habiendo reclutado los integrantes que cumplieron los criterios de inclusión se procedió a su tamizaje serológico para HIV, HBV, HCV y HTLV. Los resultados obtenidos fueron confirmados en caso de requerirlo empleando la metodología pertinente para cada caso. Con respecto a la coinfección: no detectamos diferencias significativas entre la cohorte SP y el grupo general de individuos infectados por el virus HIV; ni entre los ESN y la población general.

En ESN se detectaron sólo dos casos de infección por otro agente patógeno viral (no HIV) con pareja SP coinfectada. A pesar que la vía de contagio sexual es compartida por el HIV, el HBV y el HCV, y que estas parejas no mantienen relaciones sexuales protegidas, podemos suponer que la protección genética evidenciada con respecto al HIV no lo es tal frente a otros agentes virales. Sin embargo el acotado número de casos no permite afirmaciones categóricas con respecto a este tema.

Sólo hemos considerado la infección por los agentes virales HBV, HCV y HTLV. Teniendo en cuenta que el espesor y la integridad del epitelio vaginal y del endocervix son preponderantes para la protección contra la infección por HIV, otros agentes patógenos de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Trichomona vaginalis*, *Herpes simplex tipo 2* y cualquier otro agente infeccioso capaz de producir reacción inflamatoria con deterioro de la integridad del epitelio, generación de reacción inflamatoria y reclutamiento de linfocitos CD4+ podría contribuir con la susceptibilidad (Schust y col. 2012). Lamentablemente no contamos con estos datos que hubieran sido de interés para este análisis de coinfección.

Tipificación de los haplotipos

Evidenciamos diferencias significativas con respecto a la frecuencia del alelo HHG2 ($\Delta 32$) al comparar ESN con SP y población general. Este hecho podría ser interpretado como la presencia de un alelo protector. Sin embargo la portación aislada de este alelo no resultó suficiente para inhibir la transmisión sino que es mandatorio el análisis de la combinación de haplotipos.

El genotipo con mayor susceptibilidad frente a la infección resultó ser el HHE/HHE con una medida de la asociación exposición/infección cinco veces superior comparado con otras combinaciones [OR=5,09 IC (95%) 1,05-24,63, $p=0,0428$]. Este hecho ya fue mencionado por *Mangano y col (2001)* quienes demostraron que la homocigosis para HHE incrementa la probabilidad de transmisión perinatal del HIV en niños hijos de madres infectadas de población argentina. Además es responsable de la máxima aceleración a SIDA y muerte en estos niños.

La combinación haplotípica que demostró mayor efecto protector fue HHE/HHF2 [OR=0,13 IC (95%) 0,03-0,50), $p=0,0039$]. *Mangano y col (2001)* en su estudio sobre transmisión perinatal demostraron que si un haplotipo HHE se combina con HHF2 los efectos aceleradores de la enfermedad del HHE resultan neutralizados.

La infección y la aceleración de la enfermedad no son homólogas, pero los resultados de diversos estudios de seguimiento de pacientes infectados que portan estos marcadores permiten realizar inferencias al respecto. Genotipos protectores retardan la enfermedad y los predisponentes la aceleran.

No podemos dejar de mencionar que distintos pares de haplotipos CCR5-CCR2 se asocian con alteraciones en la susceptibilidad frente al HIV dependiendo de la población

Influencia de los haplotipos del CCR5-CCR2 en la transmisión sexual del HIV1 en parejas discordantes

en estudio. En población africana HHD/HHE se asocia fuertemente con la predisposición a adquirir la enfermedad. En nuestro caso esta comparación es imposible hacerla dada la baja frecuencia poblacional del HHD. En este mismo estudio se afirma que HHF2 se asocia con una respuesta favorable frente a la infección si se considera la carga viral como parámetro; dado que ésta permaneció baja durante el desarrollo del estudio (*Malhotra y col. 2011*).

Asimismo *Correa Vieira y col. (2011)* describen un efecto reductor de riesgo para desarrollar SIDA en individuos con HHF2. En este caso no caracterizaron los nueve haplotipos sino solamente HHG2 y HHF2, demostrando efectos protectores de ambos alelos.

En diciembre de 2013 Zapata y col. publicaron un estudio homólogo al nuestro en población de parejas discordantes de Colombia donde reportan la asociación del CCR2-64I (HHF2) con resistencia frente a la infección. El análisis de estos datos en parejas discordantes originarias de la India no ofreció resultados comparables, dada la ausencia de los alelos CCR2-V64I y CCR5 Δ 32 (*Chaudhari y col. 2014*) en ese grupo étnico.

Expresión de los correceptores

Diversos autores afirman que la disponibilidad de la proteína CCR5 a nivel de la membrana de las células CD4+ condiciona la capacidad de infección del HIV-1 y la progresión de la enfermedad.

En base a esto puede especularse sobre los motivos por los cuales el alelo HHF2 resulta protector considerando su capacidad de disminuir la expresión de CCR5 en la superficie celular (*Kostrikis y col.1998*).

Cuando el CCR5 se co-expresa con CCR2 α -V64I éste interfiere más severamente con la expresión a nivel de la superficie celular del CCR5 comparado con el CCR2 α de tipo salvaje. Más aún, experimentos de inmuno-precipitación demostraron que el CCR2 α co-precipitaba con una forma inmadura del CCR5. Estos resultados sugieren que el CCR2 α se une al CCR5 a nivel del citoplasma y down-modula su expresión a nivel de la membrana, lo cual podría explicar el efecto protector y el retraso en la aparición de la sintomatología de la enfermedad por HIV-1 en pacientes con este alelo (*Nakayama y col.2004*). Estudios previos desarrollados por *Lee y col. (1998)* no habían podido demostrar diferencias funcionales entre CCR2 β y CCR2 β -V64I. La proteína mutada no demostró diferencias en sus funciones como correceptor, productor de quimioquinas o influencia en la función del CCR5. Es decir que la diferencia parecería radicar en la expresión de CCR2 α vs. CCR2 β .

Inmunidad mediada por células

La inmunidad mediada por células es un mecanismo de defensa que presenta gran variabilidad entre individuos, siendo las pruebas de hipersensibilidad retardada una medida eficiente in vivo para su evaluación. Si el estado de la inmunidad celular puede predecir la evolución clínica de pacientes infectados con HIV y más aún relacionarse con la reconstitución inmune post-instauración de la terapia antirretroviral y los polimorfismos del CCR5 se asocian con la actividad transcripcional, los niveles de expresión en la superficie celular, la infectividad ex vivo y la susceptibilidad frente a la infección; entonces es posible que los polimorfismos del CCR5-CCR2 afecten la inmunidad mediada por células (*Catano y col. 2011*).

En sus resultados Catano y col. Verificaron que el genotipo HHE/HHE presenta la menor respuesta de hipersensibilidad retardada frente a PPD (Proteína Purificada

Derivada de *Mycobacterium tuberculosis*). Este hecho es cuestionable dado que podría no haber existido exposición al *mycobacterium* o no haber recibido vacunación contra el bacilo de Calmette-Guerin, por lo tanto también testaron un neo-antígeno KLH (*Keyhole limpet hemocyanin* - proteína de un molusco marino) y obtuvieron los mismos resultados. El genotipo HHE/HHF2 se asoció con los mayores niveles de respuesta frente a ambos antígenos testeados. Se demostró en este estudio un alto nivel de concordancia entre los genotipos del CCR5 que poseen influencia sobre la respuesta inmune celular y aquellos que condicional la actividad transcripcional, la expresión, la replicación viral y la susceptibilidad frente al HIV. Esto indicaría una relación genéticamente determinada para estos eventos y podría afirmarse que los polimorfismos del CCR5-CCR2 afectan la susceptibilidad frente al HIV mediante dos mecanismos diferentes: la entrada y replicación viral y la inmunidad mediada por células.

Linfocitos citotóxicos específicos fueron detectados mediante citobrush en células del endocervix de mujeres que están repetidamente expuestas al HIV pero permanecen no infectadas (*Kaul y col, 2000, Kaul y col. 2003*) reafirmando el rol que hemos destacado para la capacidad de respuesta citotóxica.

Seroconversiones

En esta patología y como ocurre en muchas otras, la presencia en el genoma de determinadas mutaciones da lugar a diferencias en la susceptibilidad o lo que denominamos predisposición. Sin embargo el carácter genético no es el único factor que interviene en el desencadenamiento de una enfermedad como tal. Ciertamente asociaciones fuertes pueden demostrarse en casos de mutaciones que generan proteínas

anómalas o ausentes, pero en el resto de los casos deben tenerse en cuenta una gran variedad de factores concomitantes y condicionantes.

Cuatro participantes que ingresaron y se mantuvieron ESN, al finalizar el protocolo demostraron infección por la cepa que era portada por su pareja en el momento de la seroconversión. No hemos demostrado mayor susceptibilidad con respecto al sexo tal como se esperaría considerando que se afirma que las mujeres son más propensas a contraer la infección si se las compara con los hombres debido a las características de las células redondas del semen y el carácter inmunosupresor del plasma seminal. Tres de las seroconversiones se produjeron en hombres y sólo una en una mujer. Un dato remarcable es que dos participantes que se infectaron portaban el genotipo HHE/HHF2, por lo que podemos especular que si bien esta combinación de haplotipos confiere cierto grado de protección frente a la infección, ésta no es absoluta y se encuentra condicionada a otros factores que no fueron objeto en este análisis. Además no podemos olvidar que está ampliamente reconocida la interacción del sistema inmune con el sistema neuro-endócrino y es fuertemente condicionado por alteraciones psicológicas y psíquicas.

Finalmente y a modo de corolario debemos remarcar que el factor genético analizado en este estudio es un condicionante cuyo valor hemos demostrado estadísticamente en esta población analizada.

La infección es el resultado de la interconurrencia de factores del hospedador y el virus, por lo tanto es evidente que el análisis de la variabilidad de este correceptor es sólo un aspecto dentro del universo de posibilidades condicionantes de la transmisión viral.

CONCLUSIONES

- ✓ La cohorte de individuos seropositivos se comporta igual que el grupo general de individuos infectados por el virus HIV con respecto a la frecuencia de coinfecciones.
- ✓ La cohorte de expuestos seronegativos presenta las mismas frecuencias de infección por otros virus que la población general.
- ✓ La tipificación de haplotipos en ambas cohortes evidenció una mayor frecuencia del alelo HHG2 ($\Delta 32$) en ESN con respecto a SP y población general.
- ✓ En la población analizada, el haplogrupo HHE/HHE se comportó como un factor genético predisponente y el HHE/HHF2 como un factor protector frente a la infección por el HIV.
- ✓ Las combinaciones de haplotipos que evidenciaron importancia en la transmisión sexual, también lo habían demostrado en la transmisión perinatal.

GLOSARIO

- ✓ **Adenilato ciclasa:** es una enzima que forma parte de la cascada de señalización de la proteína G, la cual transmite señales químicas desde el exterior de la célula a su interior a través de la membrana celular. La señal exterior se une a un receptor que transmite la señal a la proteína G, que a su vez la retransmite a la adenilato ciclasa convirtiendo adenosín trifosfato (**ATP**) a adenosín monofosfato cíclico (**cAMP**) el cual oficia de segundo mensajero.
- ✓ **Alelo:** cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia. Debe estar presente en al menos el 1% de la población para ser definido como tal, frecuencias menores representan mutaciones.
- ✓ **CCR – CXCR = Receptores de quimioquinas:** Los receptores de quimioquinas son proteínas integrales de membrana que se unen específicamente y responden a las citoquinas de la familia correspondiente CXC /CC. Pertenecen a una gran familia de receptores que pueden unirse en el interior celular a la Proteína G y poseen siete dominios transmembrana.
- ✓ **CD:** “cluster of differentiation” significa grupo de diferenciación y a continuación se consigna un número ordinal. Este nombre deriva del hecho de que al madurar las células adquieren y/o eliminan proteínas en su superficie. Existen más de 200 proteínas con CD asignado. Los antígenos de histocompatibilidad HLA, a pesar de cumplir con estas características, aún no han recibido un número CD de identificación.
- ✓ **Citobrush:** cepillo de cerdas muy finas empleado para la toma de muestra endocervical (muestra del canal interior del cuello cervical).
- ✓ **Down-modulación:** modulación negativa.
- ✓ **gp: glicoproteínas** o glucoproteínas son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Destacan entre otras

funciones la estructural y el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas.

- ✓ **Haplogrupo:** grupo de haplotipos o series de alelos en lugares específicos de un cromosoma.
- ✓ **Haplotipo:** combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus o varios loci, dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci.
- ✓ **Heterocigosis:** portador de diferentes alelos de un gen que confieren diferentes características genéticas.
- ✓ **Homocigosis:** portador del mismo alelo de un gen responsable de un carácter determinado, en cromosomas homólogos.
- ✓ **Lámina propia:** capa delgada de tejido conectivo que yace bajo el epitelio y junto al cual constituye las mucosas.
- ✓ **Ligando:** molécula capaz de ser reconocida por otra provocando una respuesta biológica.
- ✓ **Locus (plural loci):** es la localización específica de un gen, una secuencia de ADN o posición en un cromosoma.
- ✓ **Palíndromo:** es una palabra, número o frase que se lee igual hacia adelante que hacia atrás.
- ✓ **pb (par de bases):** dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están conectadas por puentes de hidrógeno.
- ✓ **mARN:** ácido ribonucleico mensajero.
- ✓ **Quasiespecies:** una quasiespecie viral es un grupo de virus relacionados por una o más mutaciones similares que compiten en un entorno altamente mutagénico.
- ✓ **Quimioquinas:** proteínas que dirigen la migración leucocitaria e intervienen en procesos fisiológicos y patológicos (inmunitarios e inflamatorios). Tienen bajo peso molecular ya que están compuestas por 92–99 aminoácidos y son secretadas por las células después del clivaje de una secuencia leader de 20-25

aminoácidos. Se distinguen dos subfamilias mediante el reordenamiento de las dos primeras cisteínas, las que se encuentran separadas por un aminoácido (CXC quimioquinas) o se encuentran adyacentes (CC quimioquinas). Todas estas proteínas se pliegan de manera semejante. (Baggiolini y col. 1994).

- ✓ **Etnia caucásica:** La raza caucásica o árabe europea, que ha poblado casi toda Europa, a excepción de las partes más septentrionales, el sur de Asia, el norte de África, como Egipto, Tamazgha (conocida como Berbería); la parte occidental de Asia: Arabia, Persia, Tartaria, Siria; una gran porción de Oceanía. Ha fundado colonias en todas las partes del globo. Esta raza se conoce por el color blanco de su piel y es la que ha dado nacimiento a los estados más civilizados y que más han dominado a los otros. Se llama caucásica o del Cáucaso porque las tradiciones y la filiación de los pueblos la llevaron a las montañas entre el mar Caspio y el Negro, desde donde se ha extendido. Ocupa en el globo entre el Círculo Polar y el Trópico de Cáncer.
- ✓ **Retrovirus:** Virus cuyo genoma está constituido por ARN en lugar de ADN, a diferencia del resto de los virus. Para infectar a una célula, deben retro-transcribir su ARN en ADN e insertarlo dentro del ADN propio de la célula a infectar. Para conseguirlo usan una enzima específica, la transcriptasa inversa.
- ✓ **SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida)** es el conjunto de enfermedades de muy diverso tipo (generalmente, procesos infecciosos o tumorales) que resultan de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana HIV.
- ✓ **SNP (single nucleotide polymorphism) polimorfismo de un solo nucleótido:** Constituye una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base del genoma. Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Si no se llega al 1% no se considera SNP y sí una mutación puntual.
- ✓ **Tropismo:** es la capacidad de un virus para infectar selectivamente determinadas poblaciones celulares en un órgano en particular. El tropismo viral es influenciado por factores virales y del hospedador.

ANEXO



G O B I E R N O D E L A C I U D A D D E B U E N O S A I R E S
2013. Año del 30 aniversario de la vuelta a la democracia

Disposición

Número: DI-2013-25-HIFJM

Buenos Aires, Miércoles 6 de Febrero de 2013

Referencia: S/ Autorización estudio «Susceptibilidad genética al VIH-1 en la cohorte de parejas discordantes: estudio multicéntrico en Argentina».-

VISTO:

La Ley N°3301, el Decreto N° 58/2011, la Resolución N° 485/MSGC/2011, y

CONSIDERANDO:

Que la Ley N° 3301 sobre Protección de Derechos de Sujetos en Investigaciones en Salud, reglamentada por el Decreto N° 58/2011, establece el régimen para la actividad de investigación en salud con seres humanos;

Que la Resolución N° 485/MSGC/2011 aprobó los requisitos y procedimientos aplicables para otorgar la autorización a los proyectos y trabajos de investigación que se efectúen en los efectores dependientes del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires;

Que se propicia la solicitud de autorización del **«Susceptibilidad genética al VIH-1 en la cohorte de parejas discordantes: estudio multicéntrico en Argentina».**

Que el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Docencia e Investigación de este Hospital emitieron un dictamen favorable para la realización del mencionado estudio;

Que, asimismo, por artículo 22 inciso 2 del Anexo del Decreto N° 58/2011 y el punto 8 del Anexo I de la Resolución N° 485/MSGC/2011 corresponde estimar los gastos en los que incurrirá el hospital;

Que el presente estudio no generará gastos para el Hospital;

Que en cumplimiento de la citada normativa corresponde autorizar el mencionado estudio.

Por ello, y en uso de las facultades que les son propias,

EL DIRECTOR DEL HOSPITAL FRANCISCO JAVIER MUÑIZ

DISPONE

Art. 1.- Autorícese la realización del **«Susceptibilidad genética al VIH-1 en la cohorte de parejas discordantes: estudio multicéntrico en Argentina»** en el Hospital Francisco Javier Muñiz.

Art. 2.- El presente estudio no generará gastos para el Hospital.

Art. 3.- Regístrese, para su conocimiento y demás efectos pase a la Dirección General de Docencia e Investigación y a la Dirección de Investigación. Cumplido, archívese.

Validez desconocida
Digitally signed by Ricardo Marino Marino
Date: 2012.02.09 12:28:46 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires



RICARDO MARINO
SUBDIRECTOR MEDICO
HOSP.DE INFECCIOSOS FRANCISCO J.MUNIZ

Digitally signed by Comunicaciones
Oficiales
DN: cn=Comunicaciones Oficiales, c=AR,
o=GCBA, ou=Aplicaciones,
serialNumber=R&K



GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

HOSPITAL GENERAL DE AGUDOS "CARLOS G. DURAND"
COMITÉ DE DOCENCIA E INVESTIGACION

Buenos Aires, 07 de Setiembre 2005

Dra: Dora Terrones

Me dirijo a Ud. para informarle que el Protocolo "**Suceptibilidad genética al HIV-1 en una cohorte de parejas discordantes: un estudio epidemiológico**", ha sido aprobado bajo el TI. Disp. N° ...00358..... en el Registro del Comité de Docencia e Investigación, dicho N° deberá figurar en todos los pedidos de materiales o servicios, que se efectúen en este Hospital u otra Unidad de Organización de la Secretaría de Salud para el desarrollo de este trabajo.

Dr. TOMAS H. DI PIETRO
DIRECTOR
HOSPITAL G. C. G. DURAND



COMITÉ DE BIOÉTICA
HOSPITAL GRAL DE AGUDOS CARLOS G. DURAND
AMBROSETTI 756 (1405) CAP.FED.

Buenos Aires, 5 de septiembre de 2005.

Dra. María Angélica Lamas
 Secretaria Comité Docencia e Investigación.
 S/D.

Los miembros del Comité de Bioética en la reunión de la fecha hemos considerado el protocolo de investigación "Susceptibilidad genética al HIV-1 en una cohorte de parejas discordantes: un estudio epidemiológico" Presentado por la Dra. Carmen Dora Terrones.

De la lectura del mismo no surgen objeciones y se acepta su realización por todos los presentes en la reunión.

Ricardo Sergio Dalamón
 Médico

Omar Santillan
 Enfermero

María Gaffoglio
 Médica

Adrian gindin
 Médico

León Cubellun
 Médico

Claudia Rocca
 Abogada

Carmen Lessa
 Médica

Martín Puerto
 Sacerdote

María Elena Gonzalez Rosas
 Bioquímica



GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
HOSPITAL GENERAL DE AGUDOS "CARLOS G. DURAND"
 2009 Año de los Derechos Políticos de la Mujer

ACUERDO DE PARTICIPACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD

**REF: SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL HIV-1, EN UNA COHORTE DE PAREJAS
 DISCORDANTES: ESTUDIO MUTICENTRICO EN ARGENTINA**

El presente acuerdo se lleva a cabo entre el Colectivo de Trabajo en Parejas Discordantes del VIH-1, representado por la Dra. Carmen Terrones, Investigadora Principal en Argentina, del Centro de Investigación en Salud Poblacional (CISAP) / Hospital G. A. Carlos G. Durand (Centro Coordinador del estudio en Argentina), sito en Av. Díaz Vélez 5044 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires CP 1405, Argentina, y el/la Dr/a (Investigador Local) OSCAR GARCIA MEBANA con domicilio en AV. PADUANA S/N. 1º P. CAPITAL FEDERAL

Entre ambos deben cumplirse las condiciones de confidencialidad concernientes al estudio de referencia. La confidencialidad de la información se refiere a toda la información y documentos provistos concernientes al estudio de referencia y calificados con la leyenda "Información confidencial".

Al aceptar este acuerdo de confidencialidad el investigador acepta:

- Preservar la confidencialidad de la información que solo será utilizada con el propósito de llevar a cabo los términos del presente acuerdo de partes.
- Salvaguardar la información de su difusión a terceras partes con excepción del equipo de investigación que está determinado y firmado en la planilla de delegación de funciones elevada al centro coordinador CISAP.
- Asegurar que los investigadores que integren los equipos de investigación hospitalarios estén informados de la naturaleza de confidencialidad del estudio de referencia.
- Brindar información escrita al Centro Coordinador cuando éste se lo solicita
- No usar la información para beneficio personal
- Revocar este consentimiento en cualquier momento elevando nota por escrito al Centro Coordinador y Comité de Bioética involucrado (Comités de Docencia y Bioética del Hospital DURAND).
- La participación de los médicos se efectivizará mediante derivación de Parejas discordantes al Centro Coordinador (Hospital Durand) respetando los criterios de inclusión del presente protocolo.
- La inclusión como centro participante y/o investigador en los trabajos científicos que se publiquen como fruto de la presente investigación, seguirá un orden relacionado al número de pacientes efectivamente incluidos a este protocolo.

Las obligaciones de este acuerdo de confidencialidad continuarán independientemente de la finalización del protocolo y este contrato, cuya fecha expira en 5 años y se ajusta a las leyes nacionales, provinciales o municipales en las cuales residan los investigadores participantes del estudio. Las partes garantizan y representan la autoridad de la firma al pie.

Dra. Carmen Terrones
 Investigadora Principal en Argentina

Firma:

Aclaración:

CODIGO DE PARTICIPACION: _____

Fecha: 22/3/10

Dr/a OSCAR GARCIA MEBANA
 Investigador Hospitalario

Firma:

Aclaración:

Fecha:

Centro de Investigación en Salud Poblacional -CISAP-
 Hospital General de Agudos "Carlos G. Durand"
 Av. Díaz Vélez 5044 pisos 8° y 9°. Capital Federal (1405)



GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
HOSPITAL GENERAL DE AGUDOS "CARLOS G. DURAND"
 2009 Año de los Derechos Políticos de la Mujer

ACUERDO DE PARTICIPACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD

**REF: SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL HIV-1, EN UNA COHORTE DE PAREJAS
 DISCORDANTES: ESTUDIO MUTICENTRICO EN ARGENTINA**

El presente acuerdo se lleva a cabo entre el Colectivo de Trabajo en Parejas Discordantes del VIH-1, representado por la Dra. Carmen Terrones, Investigadora Principal en Argentina, del Centro de Investigación en Salud Poblacional (CISAP) / Hospital G. A. Carlos G. Durand (Centro Coordinador del estudio en Argentina), sito en Av. Díaz Vélez 5044 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires CP 1405, Argentina, y el/la Dr/a (Investigador Local) HORACIO MINERONE, con domicilio en NEUQUEN 675 CABA

Entre ambos deben cumplirse las condiciones de confidencialidad concernientes al estudio de referencia. La confidencialidad de la información se refiere a toda la información y documentos provistos concernientes al estudio de referencia y calificados con la leyenda "Información confidencial".

Al aceptar este acuerdo de confidencialidad el investigador acepta:

- Preservar la confidencialidad de la información que solo será utilizada con el propósito de llevar a cabo los términos del presente acuerdo de partes.
- Salvaguardar la información de su difusión a terceras partes con excepción del equipo de investigación que está determinado y firmado en la planilla de delegación de funciones elevada al centro coordinador CISAP.
- Asegurar que los investigadores que integren los equipos de investigación hospitalarios estén informados de la naturaleza de confidencialidad del estudio de referencia.
- Brindar información escrita al Centro Coordinador cuando éste se lo solicita
- No usar la información para beneficio personal
- Revocar este consentimiento en cualquier momento elevando nota por escrito al Centro Coordinador y Comité de Bioética involucrado (Comités de Docencia y Bioética del Hospital DURAND).
- La participación de los médicos se efectivizará mediante derivación de Parejas discordantes al Centro Coordinador (Hospital Durand) respetando los criterios de inclusión del presente protocolo.
- La inclusión como centro participante y/o investigador en los trabajos científicos que se publiquen como fruto de la presente investigación, seguirá un orden relacionado al número de pacientes efectivamente incluidos a este protocolo.

Las obligaciones de este acuerdo de confidencialidad continuarán independientemente de la finalización del protocolo y este contrato, cuya fecha expira en 5 años y se ajusta a las leyes nacionales, provinciales o municipales en las cuales residan los investigadores participantes del estudio. Las partes garantizan y representan la autoridad de la firma al pie.

Dra. Carmen Terrones
 Investigadora Principal en Argentina

Firma:

Aclaración: TERRONES CARMEN

CODIGO DE PARTICIPACION: MH EI

Fecha:

Dr/a
 Investigador Hospitalario

Firma:

Aclaración: HORACIO MINERONE

Fecha:

Centro de Investigación en Salud Poblacional -CISAP-
 Hospital General de Agudos "Carlos G. Durand"
 Av. Díaz Vélez 5044 pisos 8° y 9°. Capital Federal (1405)



GOBIERNO DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
HOSPITAL GENERAL DE AGUDOS "CARLOS G. DURAND"
 2009 Año de los Derechos Políticos de la Mujer

ACUERDO DE PARTICIPACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD

**REF: SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL HIV-1, EN UNA COHORTE DE PAREJAS
 DISCORDANTES: ESTUDIO MUTICENTRICO EN ARGENTINA**

El presente acuerdo se lleva a cabo entre el **Colectivo de Trabajo en Parejas Discordantes del VIH-1**, representado por la **Dra. Carmen Terrones, Investigadora Principal en Argentina**, del **Centro de Investigación en Salud Poblacional (CISAP) / Hospital G. A. Carlos G. Durand** (Centro Coordinador del estudio en Argentina), sito en Av. Díaz Vélez 5044 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires CP 1405, Argentina, y **el/la Dr/a (Investigador Local) Dra. Carbone E.**, con domicilio en CABA

Entre ambos deben cumplirse las condiciones de confidencialidad concernientes al estudio de referencia. La confidencialidad de la información se refiere a toda la información y documentos provistos concernientes al estudio de referencia y calificados con la leyenda "Información confidencial".

Al aceptar este acuerdo de confidencialidad el investigador acepta:

- a) Preservar la confidencialidad de la información que solo será utilizada con el propósito de llevar a cabo los términos del presente acuerdo de partes.
- b) Salvaguardar la información de su difusión a terceras partes con excepción del equipo de investigación que está determinado y firmado en la planilla de delegación de funciones elevada al centro coordinador CISAP.
- c) Asegurar que los investigadores que integren los equipos de investigación hospitalarios estén informados de la naturaleza de confidencialidad del estudio de referencia.
- d) Brindar información escrita al Centro Coordinador cuando éste se lo solicita
- e) No usar la información para beneficio personal
- f) Revocar este consentimiento en cualquier momento elevando nota por escrito al Centro Coordinador y Comité de Bioética involucrado (Comités de Docencia y Bioética del Hospital DURAND).
- g) La participación de los médicos se efectivizará mediante derivación de Parejas discordantes al Centro Coordinador (Hospital Durand) respetando los criterios de inclusión del presente protocolo.
- h) La inclusión como centro participante y/o investigador en los trabajos científicos que se publiquen como fruto de la presente investigación, seguirá un orden relacionado al número de pacientes efectivamente incluidos a este protocolo.

Las obligaciones de este acuerdo de confidencialidad continuarán independientemente de la finalización del protocolo y este contrato, cuya fecha expira en 5 años y se ajusta a las leyes nacionales, provinciales o municipales en las cuales residan los investigadores participantes del estudio. Las partes garantizan y representan la autoridad de la firma al pie.

Dra. Carmen Terrones
Investigadora Principal en Argentina

Firma: TERRONES C.

Aclaración: [Firma]

CODIGO DE PARTICIPACION: _____

Fecha:

Dr/a
Investigador Hospitalario

Firma: Edith A. Carbone
 Médica Infectiologa
 M.N. 49.926

Aclaración: EDITH A. CARBONE

Fecha: 8/3/2010

Centro de Investigación en Salud Poblacional -CISAP-
 Hospital General de Agudos "Carlos G. Durand"
 Av. Díaz Vélez 5044 pisos 8° y 9°. Capital Federal (1405)

Consentimiento informado

Para hombre ó mujer VIH Negativo

Identificación de determinantes genéticos que modifiquen la infección por el HIV

Propósito e introducción

Por la presente yo..... con DNI:..... he tenido exposiciones al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Se sabe que no todas las personas se infectan a pesar de estar en contacto con el virus pudiendo estar relacionado con factores celulares y/o virales. El objetivo de este proyecto es indagar mediante un rastreo genético la identificación de los posibles genes celulares involucrados en proteger o facilitar la infección viral (estudios sobre el virus y hospedador). Para participar en el estudio se me ha solicitado una muestra de mi sangre por única vez para la realización del estudio molecular que permita determinar si existe asociación entre determinados genes y la posibilidad de adquirir la infección por el HIV. Este estudio ha sido aprobado por las autoridades pertinentes del Hospital Carlos G. Durand así como también el Comité de Docencia e Investigación y Bioética, el mismo estará a cargo del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital Garrahan.

Yo he entendido que el objetivo de este estudio es realizar una investigación para comprender mejor la infección por el HIV, HCV y otros retrovirus, sin tener un beneficio directo para mi. Me han informado que los resultados de este estudio de investigación pueden ser presentados en congresos o publicaciones científicas, sin embargo mi identidad y la de mi familia no será revelada y la privacidad será preservada, manteniendo mis derechos legales.

Beneficios: Yo entiendo que no hay beneficios directos para mi por participar en este estudio, aunque los datos obtenidos pueden proveer información valiosa acerca de la comprensión de la infección por HIV y colaborar en el desarrollo de nuevos medicamentos y/o vacunas.

Riesgos: No hay riesgos asociados para mi asociados con mi participación, ya que el cuidado médico recibido no cambiará. No acarrearé gastos para mí, ni para mi obra social ni para el Hospital.

Confidencialidad: Entiendo que mi identidad, así como la información obtenida en relación con ella permanecerá confidencial y no será revelada a otras personas, incluidos miembros de mi familia que no estén asociadas al estudio. Si los datos son usados para publicación o reportes, no se mencionarán datos de filiación para el análisis y comunicación de datos.

Entiendo que la participación en este estudio es voluntaria y que puedo negarme a participar. La decisión de participar en el estudio, no afectará el cuidado médico que pudiera necesitar mi familia o yo. Se me han aclarado todas las dudas y he recibido una información satisfactoria acerca de este requerimiento.

Apellido y Nombre del participante

Firma del participante

Apellido y Nombre del Investigador

Firma del investigador

Fecha...../...../.....

Ante cualquier duda puede consultar con la Presidenta del Comité de Bioética del Hospital Carlos G. Durand Dra. Norma Boloniati Tel: 4982-5555

Consentimiento informado

Para hombre ó mujer VIH Positivo

Identificación de determinantes genéticos que modifiquen la infección por el HIV

Por la presente yo. con DNI Nº. padezco la infección por HIV-1 y acepto voluntariamente ingresar a este protocolo de investigación, que desea estudiar a las personas que convivimos con una persona no infectada y así buscar las respuestas posibles a la transmisión en las parejas. No recibiré ningún pago por esta participación y seré controlado de mi infección por HIV-1 a lo largo de dieciocho meses.

Me informan que tendré que responder unas encuestas que contienen preguntas personales que mantendrán bajo estricto secreto profesional, mis respuestas serán analizadas en forma anónima y me extraerán sangre por única vez de la cual analizarán las características genéticas (tanto del virus como el hospedador) . Me explicaron que puedo suspender mi participación en cualquier momento en este protocolo y ello no me acarreará ningún trastorno como así tampoco a mi familia que se atienden en este hospital.

Apellido y Nombre del participante

Firma del participante

Apellido y Nombre del Investigador

Firma del investigador.

Ante cualquier duda puede consultar con la Presidenta del Comité de Bioética del Hospital Carlos G. Durand Dra. Norma Boloniati Tel: 4982-5555

BIBLIOGRAFIA

Allers K, Hutter G, Hoffman J, Loddenkemper C, Thiel E et al. ***Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 D 32/ CCR5 D 32 stem cell transplantation.*** Blood 2011; 117 2791-2799.

Baggiolini M., Dahinden C. ***CC chemokines in allergic inflammation.*** Immunology Today Vol 15 N° 3, 1994

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey, F, Nugeyre MT, et al. ***Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome AIDS.*** Science 220: 868-871, 1983

Berger EA, Murphy PM, Father JM. ***Chemokine receptors as HIV-1 co-receptors: roles in viral entry, tropism and disease.*** Ann. Rev. Immunol. 17: 657-700, 1999

Boletín sobre el VIH-SIDA e ITS en la Argentina N°30, Año XVI, Diciembre de 2013, Ministerio de Salud, presidencia de la Nación

Carrington M, Dean M, Martin MP, O ´Brien SJ, ***Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences.*** Hum. Mol. Genet. 1999; 8: 1939-1945

Catano G, Chykarenko Z, Mangano A, Bologna R, Sen L, Ahuja S et al. ***Concordance of CCR5 genotypes that influence cell-mediated immunity and HIV1 disease progression rates.*** JID 203: 263-272, 2011

Chaudhari DV, Kerkar S, Chavan V, Mehta PR, Mania-Pramanik J. ***Chemokine receptors CCR5 and CCR2 genes in HIV positive, exposed seronegative and in HIV unexposed individuals: A study from Mumbai.*** Indian J. Dermatol. Venereal Leprol, Net letter - Dic. 2014

Cicala C, Arthos J and Fauci A. ***HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV.***, J. Trans. Med. 9(Suppl. 1) S2, 2011

Clark V, Dean M, ***Haplotype structure and linkage disequilibrium in chemokine and chemokine receptor genes.*** Hum. Gen.. Vol 1. N° 4. 255–273 May 2004

Correa V, Martinez Barral MF, Mendoza Sassi RA, et al. ***The effect of combined polymorphism in chemokines and chemokine receptor son the clinical course of HIV-1 infection in Brazilian population.*** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Vol 106 (4): 408-414, June 2011

Coviello S., Terrones C., Paradiso P., Hermosid S., Pesaresi M., Vargas O. **Prevalencia de coinfección HTLV I-II / HIV 1-2**. IV Congreso Argentino de SIDA – 2009

Dragic, T., et al., **HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CCR5**. Nature, 1996. **381**(6584): p. 667-73.

Fenyo E, Morfeldt-Mason L, Chiodi F, Lind B, VongGerfelt A, Albert J, et al. **Distinctive replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates**. J Virol 1998; 62: 4.414-9.

Horuk R, **Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields**. Immunology Today, Vol.20, 89-84, 1999

Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neuman AU, Zhang L, He T, et al. **The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression**. Nature Med 1996; 2: 1.240-3.

Kaslow R, Dorak T, Tang J **Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection**. JID 191 Suppl.1 568-577, 2005

Kaul R, et al. **HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi**. J Immunol. 2000; 164:1602–1611.

Kaul R, et al. **Quantitative ex vivo analysis of functional virus-specific CD8 T lymphocytes in the blood and genital tract of HIV-infected women**. AIDS. 2003; 17: 1139–1144.

Kostrikis I, Neumann A, Thompson B et al. **A polymorphism in the regulatory region of the CC-Chemokine receptor 5 gene influences perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 to African-American infants**, JVirol. 1999 December; 73 (12) 10264-10271)

Lee B, Doranz B, Rana S, Yi Y, Mellado M et al. **Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5 and CXCR4**. Virol. 1998 Sept.; 72(9): 7450-7458

Lehner T, Wang Y, Whittall T and Seidl T, **Innate immunity and HIV-1 infection**. Adv. Dent. Res. 23:19-22, 2011

Levy JA, **Virus -host interactions in HIV Pathogenesis: Directions for Therapy**. Adv. Dent. Res. 23(1): 13-18, 2011

Levy Jay and Levy Yves. **HIV infection: What should be considered in approaches for a cure?** AIDS: 2012 November 13; 26(17)

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Marin SR, Horuk R, *et al.* ***Homozygous defect in HIV-1 co-receptor accounts for resistance in some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.*** Cell 1996; 86: 367-77.

Malhotra R, Hu L, Song W, Bril I *et al.* ***Association of chemokine receptor gene (CCR2-CCR5) haplotypes with acquisition and control of HIV-1 infection in Zambians.*** Retrovirology 2011, 8:22

Mangano A, Gonzalez E, Dhanda R, *et al.* ***Concordance between the CC chemokine Receptor 5 genetic determinants that alter risks of transmission and disease progression in children exposed perinatally to HIV.*** J Infect Dis 2001; 183 1574-85

Michael NI, Louie LG, Rohrbaum AI, *et al.* ***The role of CCR5 and CCR2 polymorphism in HIV-1 transmission and disease progression.*** Nat Med 1997; 3:1160-2

Moore, J.P., *et al.* ***The CCR5 and CXCR4 coreceptors-central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection.*** AIDS Res Hum Retroviruses, 2004. 20(1): p. 111-26.

Mosier D and Sieburg H- ***Macrophage-tropic HIV: critical for AIDS pathogenesis?*** Immunology Today Vol.15 No 7 : 332-339, 1994

Mummidi, S., Bamshad M., Ahuja, S. *et al.* ***Evolution of Human and Non-human Primate CC Chemokine Receptor 5 Gene and mRNA.*** J.Biol.Cem Vol 275, N° 25, issue of June 23, pp.18946-18961, 2000

Nakayama E, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T ***A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform.*** AIDS 2004 Mar 26; 18(5):729-38.

Paradiso, P., Puntarulo, A., Alcázar, D, Di Lonardo, A.M. ***Phenotype and gene frequencies of erythrocyte antigens in argentine population: Rh and MNSs systems.*** Primeras Jornadas Franco - argentinas de Inmunología y Genética Molecular, 1992 (a)

Paradiso, P., Puntarulo, A., Alcázar, D, Di Lonardo, A.M. ***Phenotype and gene frequencies of erythrocyte antigens in argentine population: Kell, Duffy and Kidd systems.*** 1* Primeras Jornadas Franco - Argentinas de Inmunología y Genética Molecular, 1992(b)

Paradiso, P., Puntarulo, A., Alcázar, D, Di Lonardo, A.M. ***Phenotype and gene frequencies of erythrocyte antigens in argentine population: ABO, Lewis and P systems.*** Primeras Jornadas Franco - Argentinas de Inmunología y Genética Molecular, 1992 (c)

Paradiso P, Alcázar D, Di Lonardo AM **Estudio poblacional de los antígenos eritrocitarios en la Argentina.** Congreso Argentino de Inmunología, San Miguel de Tucumán, 7 al 9 de octubre de 1993 (a)

Paradiso P, Alcázar D, Di Lonardo AM **Frecuencia de portadores de alelos recesivos del sistema ABO y genotipos poco probables del sistema sanguíneo Rh** Congreso Argentino de Inmunología, San Miguel de Tucumán, 7 al 9 de octubre de 1993 (b)

Paradiso, P., Rosales L., Frega A, Frino M., Vargas O. **Prevalencia de infección y coinfección por diferentes agentes patógenos en donantes de sangre de un Servicio de Hemoterapia.** Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana, 47,17, 1997

Paradiso P., Frega A., Rosales L., Vargas O. **Influencia recíproca de la co-infección por los retrovirus HIV y HTLV.** VIII Congreso Argentino de Medicina Transfusional – 2010

Piehl L, Bierfass G., Paradiso P, Coraggio H.y col. **Frecuencias fenotípicas y alélicas de la fosfatasa ácida eritrocitaria, glioxalasa y factor B de la properdina en población argentina,** MEDICINA; 52, N° 5: 405, 1992

Premack BA, Schall Tj, **Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection.** Nat. Med 2:1174-1178, 1996.

Rocco CA, Mangano A, del Pozo A y Sen L. **Distribution of CCR5-CCR2 haplotypes in an Argentinean population.** AIDS Res. Hum. Retro. 2003; 19 943-5

Salkowitz J, Bruse S, Meyerson H, Valdez H et al. **CCR5 promoter polymorphism determines macrophage CCR5 and magnitude of HIV-1 propagation in vitro.** Cli. Immunol. 2003 Sep.; 108(3): 234-240

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber C-M, et al. **Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptorgene.**Nature1996; 382:722-5.

Schust DJ, Quayle AJ, Amedee AM. **Mucosal co-infections and HIV-1 transmission and pathogenesis.** Curr HIV Res. 2012; 10:195–201.

Shieh B, Lian Y, Hsieh P, Wang S and Li C. **Influence of nucleotide polimorfism in the CCR2 and CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4.** International Immunology, Vol 12 NO. 9:1311-1318, 2000

Shuitemaker H, Kootstra NA, De Goede Rey, de Wolf F, Miedema F, Tersmette M. **Monocytotropic human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of**

Influencia de los haplotipos del CCR5-CCR2 en la transmisión sexual del HIV1 en parejas discordantes

HIV infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture.

J Virol 1991; 65: 356-63.

Stephens C, Reich D, Goldstein D, Doo Shin H, Smith D et al. ***Dating the origin of the CCR5 Δ 32 AIDS-Resistance allele by the coalescence of haplotypes.*** Am. J. Hum. Genet. 62: 1507-1515, 1998.

Struif S, Proost P, Vandercappellen J, Dempe S, Noyens B et al. ***Synergistic up-regulation of MCP-2/CCL8 activity is counteracted by chemokine cleavage, limiting its inflammatory and anti-tumoral effects.*** Eur J Immunol. 2009 Mar; 39 (3):843-57

Taborda-Vanegas N, Zapata W and Rugeles M. ***Genetic and immunological factors involved in natural resistance to HIV1 infection.*** Open Virol J 5: 35-43, 2011

Termestte M, de Goede RE, Ai BJ, Winkel IN, et al. ***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: 2026-2032, 1988

Tersmette M, Gruters RA, DeWolf F, DeGoede REY, Lange JMA, Schellekens PTA, et al. ***Evidence for a role of a virulent human immunodeficiency virus (HIV) variant in the pathogenesis of acquired immunodeficiency virus syndrome: studies on sequential isolates.*** J Virol 1989; 63: 2.118-25.

Vargas, Paradiso, Rosales, Frega, Frino, Aloisio. ***Prevalencia de infección y coinfección por diferentes agentes patógenos en donantes de sangre de la División Hemoterapia del Hospital Durand.*** VII Congreso Iberoamericano y VI Congreso Argentino, I Simposio del Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional- 2008

Xu H, Wang X and Veazey R. ***Mucosal Immunology of HIV infection*** Immunol. Rev. 2013 July; 254 (1): 10-33

Zapata W, Aguilar Jimenez W, Pereda Trujillo N, Rojas W. et al. ***Influence of CCR5 and CCR2 genetic variants in the resistance/susceptibility to HIV in serodiscordant couples from Colombia.*** AIDS Research and Human Retroviruses, Vol 29 N°12, 2013.

Zimmerman P A, Buckler-White A, Alkatib, G, Spaldin T et al. ***Inherited resistance to HIV1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5. Studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial back-ground and quantified risk.*** Mol. Med. 3: 23-26, 1997

Zwolinska K., Knysz B., Rybka K., Pazgan, S., Gasiorowsky J., et al., ***Protective effect of CCR5 Δ 32 against HIV infection by the heterosexual mode of transmission in a Polish population.*** AIDS Res Hum retroviruses 2013 Jan, 29 1 54-60.

Sitios de INTERNET consultados:

- 1 - http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/press.pdf
- 2 - <http://www.diplomatie.gouv.fr>
- 3 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCR5> chemokine (C-C motif) receptor 5
- 4 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCR2> chemokine (C-C motif) receptor 2
- 5 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183979982?report=genpept> (CCR2 var. α)
- 6 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001116513.2(CCR2 var. β)
- 7 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?ORG=hum&MAPS=ideogr, est, loc & LINK S=ON&VERBOSE=ON&CHR=3>