

Implicación del alelo CCR5-Δ32 en la progresión clínica de pacientes VIH-1+ en Yucatán, México

Nina Valadez-González, D en C,^(I) Pedro González-Martínez, MD,^(I) Dora Lara-Perera, QFB,^(I)
Ligia Vera-Gamboa, MD,^(I) Renán Góngora-Biachi, MD.^(I)

Valadez-González N, González-Martínez P, Lara-Perera D, Vera-Gamboa L, Góngora-Biachi R. Implicación del alelo CCR5-Δ32 en la progresión clínica de pacientes VIH-1+ en Yucatán, México. Salud Pública Mex 2011;53:463-468.

Resumen

Objetivo. Establecer la frecuencia y la relación del alelo CCR5-Δ32 con la infección y la progresión clínica de pacientes VIH+ y en individuos expuestos seronegativos. **Material y métodos.** Se analizaron 355 muestras, 62 VIH+, 51 individuos expuestos seronegativos y 242 de la población general. Los VIH+ se subdividieron en: a) progresores normales n= 49; b) progresores lentos n= 10, y c) no progresores n= 3. **Resultados.** Se identificó el genotipo wt/Δ32 en 17.7% de los VIH+, 13.7% de los individuos expuestos seronegativos y 6.2% en la población general. El genotipo Δ32/Δ32 se encontró en 3.9% de los individuos expuestos seronegativos. Según la progresión clínica de los VIH+, se identificó el genotipo wt/Δ32 en 10.2% de los progresores normales, 30% de los progresores lentos y en 100% de los no progresores. **Conclusión.** El genotipo wt/Δ32 se observó en todos los no progresores, lo que apoya su papel en esta forma de progresión clínica en este grupo.

Palabras clave: VIH-1; progresión de la enfermedad; receptores CCR5; México

Valadez-González N, González-Martínez P, Lara-Perera D, Vera-Gamboa L, Góngora-Biachi R. CCR5-Δ32 allele involvement in the clinical evolution of HIV1+ patients in Yucatán, Mexico. Salud Pública Mex 2011;53:463-468.

Abstract

Objective. CCR5-Δ32 allele frequency needs to be identified in HIV+ patients and exposed seronegative individuals in Yucatan, Mexico, to understand this mutation's relationship to infection and disease progression. **Material and Methods.** A total of 355 samples were analyzed: 62 from HIV+ patients, 51 from exposed seronegative individuals and 242 from general population. Infected patients were subdivided into a) normal progressors n= 49; b) slow progressors n= 10, and c) non-progressors n= 3. **Results.** Genotype wt/Δ32 was identified in 17.7% of HIV+, 13.7% of exposed seronegative individuals and 6.2% of general population. Genotype Δ32/Δ32 was identified in 3.9% of exposed seronegative individuals. In infected patients, wt/Δ32 was identified in 10.2% of normal progressors, 30% of slow progressors and 100% of non-progressors. **Conclusion.** Genotype wt/Δ32 was observed in all non-progressing HIV+ patients, supporting its role in this group's disease development and clinical evolution.

Key words: HIV-1; disease progression; CCR5 receptors; Mexico

(I) Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México

Fecha de recibido: 7 de diciembre de 2010 • Fecha de aceptado: 3 de octubre de 2011

Autor de correspondencia: Dra. Nina Valadez González. Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán. Av. Itzáes 490 por 59, col. Centro. 97000 Mérida, Yucatán, México. Correo electrónico: valadez@uady.mx

El agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) es el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). De su estructura, una glicoproteína externa, la gp120, presenta una alta afinidad por el receptor CD4+ de la superficie celular, lo que determina el tropismo preferencial del VIH hacia células con este marcador. Para el ingreso del virus a las células son importantes dos correceptores, el CXR4 y el CCR5;¹⁻³ este último responde a las quimioquinas RANTES, MIP 1 alpha y MIP 1 beta que han sido identificadas como los principales factores supresores producidos por las células T CD8+ y que son producidas en grandes cantidades por los linfocitos T CD4+ de individuos con exposiciones múltiples al VIH-1 que no se han infectado (individuos expuestos seronegativos, ENI).⁴⁻⁵ El gen estructural CCR5 ha sido mapeado al cromosoma humano 3p21 y se ha identificado una delección de 32 pb (CCR5-Δ32) que se hereda en forma mendeliana, con diversas prevalencias en el mundo y se considera que este polimorfismo emergió recientemente en caucásicos.⁶ El alelo CCR5-Δ32 ocasiona un cambio de marco de lectura y genera una proteína no funcional, lo que explicaría el caso de los ENI.⁷⁻⁸ Estudios en adultos han mostrado que la delección homocigota se asocia con una resistencia importante pero no absoluta para la infección con el VIH-1 y que la forma heterocigota no confiere resistencia contra la infección por vía sexual, parenteral o perinatal, aunque sí se ha asociado a una progresión más lenta al sida, disminución lenta en las cuentas de linfocitos CD4+ y cargas virales más bajas, en comparación con los individuos infectados que no presentan la delección.⁹⁻¹⁵

En México, en un grupo de pacientes VIH+ progresores lentos, se ha encontrado prevalencia de 20% de la forma heterocigota del alelo CCR5-Δ32. En un grupo de ENI también se encontró la delección heterocigota en el 20% y ningún caso homocigoto.¹⁶ En Yucatán, estudios preliminares reportan el genotipo wt/Δ32 en 9.3% de la población maya y en 0.72% de la población mestiza analizada.¹⁷ Algunas observaciones epidemiológicas sugieren que en grupos con alta exposición al VIH este polimorfismo participa en la protección contra la infección o en la evolución clínica de los individuos infectados. Así, 53% de las parejas sexuales de individuos infectados permanecía libre de infección a pesar de la exposición repetida por prácticas sexuales de alto riesgo;¹⁸ de igual manera, la frecuencia de infección entre trabajadoras sexuales que ejercen en Yucatán es de 0.28% en contraste con la prevalencia de 1.8% de infección con el virus linfotrópico de células T humanas tipo II –retrovirus que también se transmite por vía sexual–, lo que señala que a pesar de la alta frecuencia de las prácticas de riesgo, la infección por el VIH no ha ocurrido.¹⁹⁻²¹ Entre las parejas de

hombres que tienen sexo con hombres en Yucatán, algo similar se ha observado (prevalencia de infección de 15 a 25%), lo que también apoya el concepto de que existen personas “resistentes” a la infección con el VIH en nuestra población; de igual forma, hay un grupo de pacientes VIH+ que presentan progresión lenta de la infección.²²⁻²³ El objetivo del presente estudio fue conocer la frecuencia del alelo CCR5-Δ32 tanto en pacientes VIH+ como en ENI y su relación con un menor riesgo de infección y progresión de la enfermedad en pacientes de Yucatán, México.

Material y métodos

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, observacional, comparativo. La muestra fue por conveniencia en 355 individuos. Se formaron tres grupos: el grupo 1 con 62 personas infectadas con el VIH-1 antes de 1994 y que acudían a control médico regular. En el grupo 2 se incluyeron 45 personas seronegativas, parejas estables de personas infectadas con el VIH, con exposición repetida al virus a través de prácticas sexuales de riesgo (sin protección) y seis casos de exposición perinatal en los cuales no se detectó infección por el VIH después de dos años de seguimiento (serología negativa, PCR negativo, antígeno p24 en plasma negativo y conteo normal de CD4/CD8). En el grupo 3 se incluyeron 242 personas de la población general, que acudieron al laboratorio de Hematología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán en el período de junio de 2000 a octubre de 2005.

El proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán. Previo consentimiento libre e informado por escrito de acuerdo con los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1964 y sus modificaciones posteriores, a todos los participantes se les realizó una encuesta clínico-epidemiológica. El diagnóstico de infección con VIH-1 se estableció a través del método de ELISA (Enzyme linked immunoadsorbent assay, Genie II HIV-1/HIV-2-Sanofi, Pasteur). Todos los casos positivos se confirmaron por inmunodetección (New Lav Blot 1-Sanofi, Pasteur). De cada paciente se obtuvo una muestra de 5 ml de sangre venosa obtenida con anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetraacético); en el caso de las personas infectadas con VIH (grupo 1) previamente se separaron 3 ml de sangre para el conteo de linfocitos CD4/CD8 de acuerdo con el método de Froebel.²⁴ Los datos de este conteo, junto con otros de la evolución clínica, sirvieron para estratificar a los pacientes según la clasificación de Greenough y cols. en progresores

normales (PN), con cuentas absolutas de CD4 <200/ μ l y porcentaje de CD4 <10%, o cuenta absoluta de CD4 <100 independiente de su porcentaje; progresores lentos (PL) CD4 >200/ μ l, con un porcentaje de CD4 >10%, o cuenta de CD4 >400/ μ l independiente del porcentaje, y no progresores (NP), con más de 10 años de infección sin datos clínicos de evolución, con cuentas absolutas de CD4 normales (CD4 > 400/ μ l, porcentaje de CD4 > 30%, o CD4 > 600/ μ l independiente del porcentaje de CD4) y sin tratamiento antirretroviral.²⁵ La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el método descrito por Higuchi.²⁶ La tipificación del gen CCR5 se llevó a cabo a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los oligonucleótidos CCR5F 5'-CTTCATTA-CACCTGCAGCTCT-3' y CCR5R 5'- CTCACAGCC-CAGTGCAG CTTCTTCT-3', los cuales flanquean la delección de 32 pb. Las condiciones de reacción fueron: Tris 10mM, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's (desoxirribonucleótidos trifosfato) 0.2mM c/u, oligonucleótidos 0.25 μ M c/u, 1.5 U Taq Gold (Perkin Elmer). La amplificación se realizó en un termociclador con el siguiente programa: 94 °C 10 min (1 ciclo); 94 °C 20 seg, 55 °C 20 seg, 72 °C 30 seg (35 ciclos); 72 °C 7 min (1 ciclo). Los productos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La determinación del genotipo se realizó de acuerdo con el tamaño de los productos de amplificación; para el genotipo homocigoto silvestre (wt/wt) se observó una banda de 184 pb; para los homocigotos con la delección de 32 pb (Δ 32/ Δ 32) el producto observado fue de 152 pb, y para los heterocigotos (wt/ Δ 32) se observaron dos bandas, una de 184 pb y la otra de 152 pb (figura 1).

El análisis estadístico se efectuó por χ^2 y/o prueba exacta de Fisher comparando las frecuencias alélicas entre los grupos VIH+ y los ENI, y entre los subgrupos de los pacientes VIH+, utilizando el programa Epi Info 2000.

Resultados

En el grupo 1 (n=62), los pacientes infectados con el VIH se clasificaron en tres subgrupos (CD4 y evolución clínica): 1) PN: 49 (79%); 2) PL: 10 (16.1%), y 3) NP: 3 (4.9%). Del grupo 2, en 45/51 (88.2%), la exposición fue por vía sexual.

El análisis del genotipo CCR5 en el grupo 1 mostró 17.7% (11/62) de heterocigotos wt/ Δ 32 (1 alelo normal y 1 deletado); el resto fue normal (wt/wt). No se encontraron homocigotos. En el grupo 2, 82.4% fue normal, 13.7% (7/51) fue wt/ Δ 32 y en dos personas (3.9%) se detectó la delección homocigota (Δ 32/ Δ 32) (figura 1). En el grupo 3, 6.2% (15/242) fue wt/ Δ 32 y 93.8% (227/242) fue normal. No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas de los grupos.

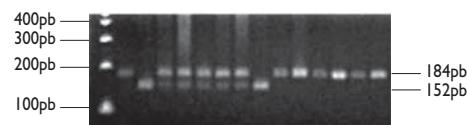


FIGURA 1.- AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN CCR5. GEL DE AGAROSA A 1.5% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO. CARRILES: 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100 PB; 2, CONTROL WT/WT; 3 Y 9, MUESTRAS DE HOMOCIGOTOS Δ 32/ Δ 32; 4-8, MUESTRAS DE HETEROZIGOTOS WT/ Δ 32; 10-15, MUESTRAS DE HOMOCIGOTOS WT/WT.

En el análisis por subgrupos, 5/49 (10.2%) de los PN tuvieron el genotipo heterocigoto wt/ Δ 32; el resto fue normal. En los PL, 3/10 (30%) fueron heterocigotos wt/ Δ 32; el resto fue normal. Los tres NP también fueron heterocigotos wt/ Δ 32. Sólo se encontró diferencia significativa al comparar los PN contra la suma de los PL+NP: ($p = 0.007$), observando que el genotipo wt/wt aumenta 7.54 veces (IC 95% de 1.49-40.73) el riesgo de progresión normal en comparación con el genotipo wt/ Δ 32 y la progresión lenta o no progresión clínica de los pacientes (cuadro I).

Cuando se analizó la asociación del genotipo heterocigoto con el género no se encontraron diferencias significativas en los tres grupos estudiados (cuadro II), aunque se observó que todas las mujeres del grupo 1 presentaron genotipo normal y en los hombres 22.4% fue del genotipo heterocigoto wt/ Δ 32.

Discusión

La delección Δ 32 del gen CCR5 está presente en la población estudiada de la misma manera como se ha encontrado en la población del centro de México y en un grupo de ENI y pacientes infectados con el VIH-1 de la misma región.²⁹ La frecuencia del alelo CCR5 Δ 32 observada en el grupo VIH+ (0.089) es muy similar a lo reportado por Zimmerman y cols. para una población seropositiva de origen caucásico de EUA (0.113) y es significativamente mayor a los reportes de Trecarichi y cols. en una población seropositiva de origen italiano (0.037), y de Rugeles y cols. (0.017) en una población seropositiva de Colombia.²⁷⁻²⁹ En el grupo de ENI, la frecuencia del alelo CCR5 Δ 32 (0.107) es similar a los reportes de Trecarichi y cols. en una población ENI italiana y al de Dean y cols. para una población ENI de etnicidad mezclada en EUA.³⁰

En el grupo de ENI, la frecuencia del alelo CCR5 Δ 32 en su forma homocigota (3.9%) es similar a la reportada en diversos estudios, en los que se ha demostrado un

Cuadro I

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO CCR5 Δ32 EN 62 PACIENTES VIH+, 51 PERSONAS VIH- CON EXPOSICIÓN CRÓNICA AL VIRUS Y 242 PERSONAS DE POBLACIÓN GENERAL. YUCATÁN, MÉXICO

	Genotipo CCR5		
	wt/wt	wt/Δ32	Δ32/Δ32
Grupo I			
VIH positivos, n= 62			
Progresores normales* (n=49)	44	5	0
Progresores lentos [†] (n=10)	7	3	0
No progresores [§] (n=3)	0	3	0
Totales [#]	51	11	0
Grupo 2			
VIH negativos, n= 51			
Exposición sexual(n=45)	37	6	2
Exposición perinatal (n=6)	5	1	0
Totales [#]	42	7	2
Grupo 3 (n=242)			
	227	15	0

*[‡] Progresores normales vs Progresores lentos: No significativo

*[‡],[§] Progresores normales vs suma Progresores lentos y No progresores: Fisher=0.007, OR= 7.54 (IC 95% 1.49-40.73)

#,& Total VIH positivos vs Total VIH negativos: No significativo

Cuadro II
FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO CCR5 Δ32 EN 62 PACIENTES VIH+, 51 PERSONAS VIH- CON EXPOSICIÓN REPETIDA AL VIRUS Y 242 PERSONAS DE POBLACIÓN GENERAL DE ACUERDO CON EL GÉNERO. YUCATÁN, MÉXICO

	Genotipo CCR5		
	wt/wt	wt/Δ32	Δ32/Δ32
Grupo I			
VIH positivos, n= 62			
Femenino + (n=13)	13	0	0
Masculino ++ (n=49)	38	11	0
Totales	51	11	0
Grupo 2			
VIH negativos, n= 51			
Femenino ° (n=39)	33	4	2
Masculino °° (n=12)	10	2	0
Totales	42	7	2
Grupo 3			
Femenino * (n=174)	163	11	0
Masculino** (n=68)	64	4	0

+,++ Femenino/Masculino: No significativo

°,°° Femenino/Masculino: No significativo

*,** Femenino/Masculino: No significativo

papel importante de este genotipo en la prevención de la infección con el VIH-1 por la falta de expresión de la proteína CCR5 en la superficie celular. En este mismo grupo, la frecuencia de heterocigocidad observada (13.7%) es similar a la detectada en el grupo de VIH+ (17.7%), lo que puede sugerir que otros factores genéticos podrían estar participando en la protección contra la infección por el VIH-1.

Aun cuando el número de pacientes VIH+ con criterios de NP fue pequeño (3/62), la presencia del alelo CCR5Δ32 en forma heterocigota (wt/Δ32) sugiere la participación de esta delección en la falta de progresión clínica, ya que, al comparar la frecuencia de heterocigotos entre los PN (13.5%) y los NP (100%), en este estudio se encuentra diferencia significativa ($p=0.006$). Asimismo, este dato concuerda con lo reportado en otros estudios en los que se ha observado que la heterocigocidad de este alelo es mayor en personas que no progresan.^{12,13,25,31}

El hallazgo de heterocigotos entre los PN difiere del reporte de Olsen y cols., que no los encuentran en pacientes con evolución clínica similar y que consideran que esta forma del alelo CCR5Δ32 se asocia con un mayor tiempo de progresión clínica y con una reducción más lenta de las células CD4+; esos hallazgos, junto con el hecho de no haber encontrado en los pacientes de Yucatán, México, diferencia en la frecuencia de heterocigotos entre los PN y los de PL, puede ser explicado por un largo tiempo de la infección por el VIH, que incluso en algunos casos es difícil de precisar con exactitud, y que en los heterocigotos el papel protector de la delección se refleja en un retraso de entre dos a cuatro años en la progresión clínica y que después de este tiempo, los pacientes evolucionan de una manera similar al grupo de progresión normal.¹² Así, consideramos la posibilidad de que en algunas personas ya haya pasado el período de "protección" y que por las cuentas de CD4 determinadas al momento del estudio, no se ubicara correctamente a estos pacientes. Otra posibilidad es que existan otros factores genéticos, como la mutación en el gen de la Interleucina 10 que favorece la progresión clínica rápida independientemente de la presencia del alelo CCR5Δ32, tanto en su forma homocigota como heterocigota; también hay que considerar los genes HLA Clase I como el HLA B*35 y el Cw*04 que han sido asociados con progresión rápida de la enfermedad, que no fueron incluidos en este estudio y que podrían estar participando en la progresión clínica rápida de los heterocigotos del grupo de progresores normales, independientemente de la presencia del alelo CCR5Δ32 en cualquiera de sus formas.^{32,33}

En resumen, este estudio demuestra la presencia del alelo CCR5Δ32 tanto en pacientes VIH+ como en

personas crónicamente expuestas al virus y sin infección. A diferencia de otros informes, no se logró relacionar la delección homo o heterocigota del alelo CCR5Δ32 como un factor de protección contra la infección en el grupo de ENI; sin embargo, llama la atención que en todas las pacientes mujeres del grupo VIH+ el genotipo fue normal, en contraste con 22.4% de los pacientes hombres, en quienes se detectó el genotipo heterocigoto. Esto puede sugerir un papel protector contra la infección del genotipo heterocigoto para el género femenino, hallazgo que deberá ser verificado con un mayor tamaño de muestra. Sin embargo, en los que se encontró la delección, la evolución clínica fue más lenta.

La participación del alelo CCR5Δ32 en forma homocigota en el proceso de infección con el VIH-1 y en la progresión clínica cuando se presenta en forma heterocigota hace necesario diseñar estudios de cohorte que nos permitan valorar su utilidad como marcador pronóstico de progresión en nuestra población. De igual manera, es importante considerar la prevalencia del genotipo heterocigoto encontrada en la población general de 6.2%, similar a la reportada por Salas-Alanís y cols. de 6.9% en población de Monterrey N.L., para evaluar el impacto del alelo Δ32 en el control de la epidemia del VIH/SIDA en nuestro país.³⁴

Agradecimientos

A la Q.F.B. Carmen Beatriz Keb-Zi, por el procesamiento de las muestras para PCR.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Dagleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;312:763-767.
2. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-877.
3. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-673.
4. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ cells. *Science* 1995;270:1811-1815.
5. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135-1148.
6. Liu R, Paxton WA, Choe S. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367-377.
7. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382:722-725.
8. Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, et al. Relative resistance to HIV infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high risk sexual exposures. *Nat Med* 1996;2:412-417.
9. Connor RL, Paxton W, Sheridan KE, Koupe R. Macrophages and CD4+ T Lymphocytes from two multiply exposed uninfected individuals resist infection with primary non-syncytium-inducing isolates of human immunodeficiency Virus Type I. *J Virol* 1996;70:8758-8764.
10. Xiao L, Weiss SH, Qari SH, Rudolph D, Zhao C, Denny TN, et al. Partial resistance to infection by R5X4 primary HIV type I isolates in an exposed-uninfected individual homozygous for CCR5 32-base pair deletion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:1201-1208.
11. Bradbury J. HIV-1-resistant individuals may lack HIV-1 coreceptor. *Lancet* 1996;348:463.
12. Eugen-Olsen J, Iversen AKN, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, et al. Heterozygosity for a deletion in the CCR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 1997;11:305-310.
13. Cohen OJ, Paolucci S, Bende SM, Daucher M, Moriuchi H, Moriuchi M, et al. CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5- Δ32. *J Virol* 1998;72:6215-6217.
14. Eskild A, Jonassen TO, Heger B, Samuels SO, Grinde B. The estimated impact of the CCR-5 Δ 32 gene deletion on HIV disease progression varies with study design. *AIDS* 1998;12:2271-2274.
15. Philpott S, Burger H, Charbonneau T, Grimson R, Vermund SH, Visosky A, et al. CCR5 Genotype and Resistance to Vertical Transmission of HIV-1. *J AIDS* 1999;21:189-193.
16. González-Díaz E, Villasis KA, Ruiz-Palacios GM, Soto-Ramírez LE. Genotipo del receptor CCR5 en individuos mexicanos infectados por VIH con progresión normal, lentos progresores y expuestos pero no infectados. En: Calva Mercado JJ (ed). Enfermedades Infecciosas y Microbiología. XXIII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. V Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia 1998;18:S29.
17. Quintal-Ortiz I. Identificación de los polimorfismos m555 y m303 en el gen que codifica para el receptor CCR5 en una población de la etnia Maya y Mestiza del Estado de Yucatán (tesis). Mérida (YUC): Universidad Autónoma de Yucatán, 2007.
18. Góngora-Biachi RA, González-Martínez P, Puerto-Manzano F, Franco-Monsreal J. Transmisión heterosexual del virus de inmunodeficiencia humana tipo I en un grupo de parejas residentes de la Península de Yucatán. *Rev Invest Clin* 1991;43:128-132.
19. Góngora-Biachi RA, González-Martínez P. Anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en una población de prostitutas de Mérida, Yucatán, México. *Rev Invest Clin* 1989;39:305-306.
20. Góngora-Biachi RA, González-Martínez P, Castro-Sansores C, Pavía-Ruz N, Rudolph DL, Lal RB, et al. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection among female prostitutes in Yucatan, Mexico. *Am J Med Sci* 1993;306:207-211.
21. Góngora-Biachi RA, Pavía-Ruz N, González-Martínez P, Puerto-Manzano F. Female prostitution and HIV infection in Yucatán, México. Fourth RCM International AIDS Symposium, San Juan Puerto Rico. November 3-4 1994:56.
22. Góngora-Biachi RA, González-Martínez P, Reyes-Pinto A, Lara-Perera D, López-Peraza A, Medina-Escobedo G. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (Ac-VIH) y su expresión clínica en un grupo de homosexuales del sexo masculino en Mérida, Yucatán. *Salud Pública Mex* 1987;29:474-480.

23. Góngora-Biachi RA, Arcila-Herrera H, González-Martínez P, Franco-Monsreal J, Puerto-Manzano F, Martínez-Reynoso A, et al. Anticuerpos contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana en una población homosexual masculina. *Salud Pública Mex* 1990;32:20-25.
24. Froebel KS, Doherty KV, Whitelaw JA, Hague RA, Mok JY, Bird AG. Increased expression of the CD45RO (memory) antigen on T cells in HIV-infected children. *AIDS* 1991;5:97-99.
25. Greenough TC, Brettler DB, Kirchhoff F, Alexander L, Desrosiers RC, O'Brien SJ, et al. Long-term nonprogressive infection with human immunodeficiency virus Type I in a hemophilia cohort. *J Infect Dis* 1999;180:1790-1802.
26. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. En: Erlich HA, ed. *PCR Technology*. Nueva York: Stockton Press, 1989:31-38.
27. Zimmerman PA, Bucklerwhite A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C. Inherited resistance to HIV-I conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5-studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997;3:23-36.
28. Trecarichi EM, Tambarelllo M, de Gaetano-Donati K, Tamburini E, Cauda R, Brahe C, et al. Partial protective effect of CCR5-Delta 32 heterozygosity in a cohort of heterosexual Italian HIV-I exposed uninfected individuals. *AIDS Res Ther* 2006;3:22-25.
29. Rugeles-López MT, Díaz FJ, Vega JA, Solano F, Nagles J, Bedoya G, et al. Frecuencia de mutaciones en el coreceptor CCR5 del virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) en diferentes grupos en Medellín. *Infectio* 2001;5:87-95.
30. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-I infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science* 1996;273:1856-1862.
31. Buseyne F, Janvier G, Teglas JP, Ivanoff S, Burgard M, Bui E, et al. Impact of heterozygosity for the chemokine receptor CCR5 32-bp-deleted allele on plasma virus load and CD4 T lymphocytes in perinatally human immunodeficiency virus-infected children at 8 years of age. *J Infect Dis* 1998;178:1019-1023.
32. Carrington M, Nelson G, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ. HLA and HIV-I: Heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 1999;283:1748-1752.
33. Carrington M, O'Brien SJ. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 2003;54:535-551.
34. Salas-Alanis JC, Mellerio JE, Ashton GHS, McGrath JA. Frequency of the CCR5 gene 32-base pair deletion in Hispanic Mexicans. *Exp Dermatol* 1999;24:127-129.