

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Facultat de Medicina
Departament de Medicina i Cirurgia

**Factores genéticos del huésped, riesgo de infección y de
progresión de la infección por el virus de la
inmunodeficiencia humana (VIH).**

**Dirigida por los Profesores Dr. Cristóbal Richart Jurado y
Dr. Francesc Vidal i Marsal.**

Tesis doctoral presentada por Consuelo Viladés Laborda para optar a

Grado de Doctora

Tarragona, Junio 2009

Cristóbal Richart Jurado, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital
Universitari de Tarragona Joan XXIII y Catedrático de Medicina de la Universitat
Rovira i Virgili de Tarragona, y Francesc Vidal i Marsal, Jefe Clínico del Servicio de
Medicina Interna del Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII y Catedrático de
Medicina de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona,

CERTIFICAN QUE:

La tesis Doctoral titulada "**Factores genéticos del huésped, riesgo de infección y de
progresión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)**",
presentada por Consuelo Viladés Laborda, ha sido realizada bajo nuestra dirección y
cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctora en Medicina.

Para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmamos la presente.

Tarragona, a 15 de Abril de 2009.

Dr. Cristóbal Richart Jurado

Dr. Francesc Vidal i Marsal

DEDICATORIA:

*Als meus pares
José María[†] i Consuelo*

*Lo que sabemos es una gota de agua,
lo que ignoramos es el océano.
(Isaac Newton)*

AGRADECIMIENTOS:

Al Prof. Dr. Cristóbal Richart Jurado, por la confianza depositada y las facilidades dadas desde un inicio.

Al Prof. Dr. Francesc Vidal i Marsal, por sus enseñanzas, su continuo estímulo, soporte y amistad.

Al Dr. José Joaquim Peraire Forner y el Dr. Sergi Veloso Esteban, amigos y compañeros de la Unidad de VIH del Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, por su colaboración en el desarrollo de los trabajos de esta tesis.

A los compañeros del Servicio de Medicina Interna por su soporte y buenos consejos.

A todos los compañeros del Hospital que han colaborado en los estudios que forman parte de esta tesis, sin los cuales no hubiera sido posible realizarla.

A Montserrat Vargas y Marta Sanjuán, enfermeras del Hospital de día del Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, por su colaboración en las extracciones de sangre.

A todo el personal de la Unitat de Recerca del Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, especialmente a la Dra. Montserrat Broch, Carmen Aguilar y Eva González, por el trabajo de laboratorio desarrollado en los trabajos de esta tesis.

A la Dra. Cristina Gutiérrez Forner y Dra. Montserrat Olona Cabases por su ayuda, colaboración y paciencia durante el análisis de los resultados de los trabajos de la tesis.

A todos y cada uno de nuestros pacientes, verdaderos protagonistas de estos trabajos, ya que siempre mostraron su disposición desinteresada a colaborar en los estudios.

Por último, a mi familia, por todo el soporte dado desde el inicio de andadura por el mundo de la Medicina

ABREVIATURAS:

ADN: ácido desoxiribonucleico

APOBEC: *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like.*

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNt: ARN de transferencia.

CCL2 -2518: polimorfismo en la posición 2518 de la quimioquina CCL2.

CCR2-V64I: polimorfismo en la posición 64 del receptor CCR2

CDC: *Center for Disease Control.* Centro para el control de las enfermedades.

CEESCAT: Centre d'Estudis Epidemiològics sobre la SIDA de Catalunya

CTL: *Cytotoxic T-Lymphocyte.* Linfocito citotóxico.

CX3CL1-2999C: polimorfismo en la posición 2999 de la quimioquina CX3CL1.

CX3CL1-3042C: polimorfismo en la posición 3042 de la quimioquina CX3CL1.

CX3CR1-T280M: polimorfismo en la posición 280 del receptor CX3CR1.

CX3CR1-V249I: polimorfismo en la posición 249 del receptor CX3CR1.

DAC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid.* Ácido etilendiaminotetracético.

ELISA: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.* Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

ENI: Expuesto no infectado.

gp: Glicoproteína.

GPCR: *G Protein Coupled Receptor.* Receptor acoplado a la proteína G.

HLA: *Histocompatibility Leukocyte Antigen.* Antígeno de histocompatibilidad.

HTLV-2: *human T-lymphotrophic virus type 2.* Virus linfotrópico humano de las células T tipo 2.

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

KIR: *Killer cell immunoglobulinlike receptors.* Receptor de células NK

LTNP: *Long-Term Non-Progressor.* No progresores a largo plazo.

LTR: *Long Terminal Repeat.* Repeticiones de fragmentos terminales.

MCP-1: *Monocyte chemotactic protein-1.* Proteína 1 quimiotáctica para monocitos.

MIP-1 α : *Macrophage inflammatory protein 1 α .* Proteína inflamatoria de los macrófagos 1 α .

MIP-1 β : *Macrophage inflammatory protein 1 β .* Proteína inflamatoria de los macrófagos 1 β .

NK: *Natural Killer.* Célula asesina natural.

NF- κ B: *Nuclear factor κ B*. Factor de transcripción nuclear κ B.

NSI (cepas): *Non Syncytium Inducing*. No inductoras de sincitios.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONUSIDA: Programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA.

pb: pares de bases.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.

RANTES: *Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted*.

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*. Fragmento de restricción de longitud polimórfica.

SDF-1: *Stromal Derived Factor type 1*. Factor tipo 1 derivado del estroma.

SI (cepas): *Syncytium Inducing*. Inductoras de sincitios.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SNP: *Single nucleotide polymorphism*. Polimorfismo de nucleótido simple.

TARGA: tratamiento antiretroviral de gran actividad.

TFIID: *Transcription Factor IID*. Factor de transcripción IID.

TI: Transcriptasa inversa.

TNF: *Tumor necrosis factor*. Factor de necrosis tumoral

UTR: *Untranslated region*. Región no traducida.

VHC: Virus de la hepatitis C.

VHG: Virus de la hepatitis G.

VHS-2: Virus herpes simple tipo 2.

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

VIH-2: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2.

VIS: Virus de la inmunodeficiencia del simio.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. El Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	17
1.1.1. Historia de la infección por el VIH-1	17
1.1.2. Estructura de los virus de la inmunodeficiencia humana	18
1.1.3. Epidemiología de la infección por el VIH.....	20
1.2. Inmunopatogenia de la infección por el VIH-1	24
1.2.1. Ciclo biológico del VIH	24
1.2.2. Entrada del VIH a la célula	29
- Moléculas de adhesión	29
- Receptores virales: CD4 y receptores de quimioquinas	29
- Receptores de quimioquinas e infección por el VIH-1	30
1.2.3. Mecanismos de propagación viral	35
1.2.4. Mecanismos de pérdida linfocitaria	36
1.2.5. Respuesta inmune frente al VIH	37
1.2.6. Mecanismos de escape viral	40
2. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1	43
2.1. Fases de la infección	45
2.2. Tipos de progresión	48
2.3 Factores moduladores de la progresión	50
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
3.1 Hipótesis	61
3.2 Objetivos	63

4.- PACIENTES Y MÉTODOS	65
4.1.- Diseño de los estudios	67
4.2.- Pacientes estudiados	67
4.3.- Variables de los estudios	70
4.4.- Recogida de muestras	70
4.5.- Metodología de laboratorio	71
4.6.- Recogida de datos	74
4.7.- Análisis estadístico	75
5- ESTUDIOS	77
5.1- "Spanish HIV-1-Infected Long-Term Non-Progressors of More Than 15 Years Have an Increased Frequency of the CX3CR1 249I Variant Allele".	79
5.2- "Polymorphisms in the 3' untranslated region of the <i>fractalkine</i> (CX3CL1) gene and the risk of the HIV-1 infection and disease progression"	87
5.3- "Effect of Genetic Variants of CCR2 and CCL2 on the Natural History of HIV-1 infection. CCL2-2518GG Is Overrepresented in a Cohort of Spanish HIV-1- Infected Subjects".	91
6.- DISCUSIÓN	101
7.- CONCLUSIONES	113
8.- BIBLIOGRAFIA	119

1- INTRODUCCIÓN

1.1.- El Virus de la inmunodeficiencia humana

1.1.1.- Historia

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el causante de la pandemia mundial del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y forma parte de la familia *Retroviridae* la cual engloba un número importante de virus. Todos ellos son similares en cuanto a organización genómica, estructura y ciclo replicativo.

De los distintos géneros de retrovirus hay dos que engloban especies que infectan a seres humanos: los lentivirus y los deltaretrovirus. Dentro del género de los lentivirus se encuentran los virus de la inmunodeficiencia humana¹.

Actualmente se conocen dos retrovirus capaces de producir inmunodeficiencia en seres humanos, VIH-1 y VIH-2. El más extendido y virulento es el VIH-1, cuyos tres grupos filogenéticos derivan de virus muy semejantes encontrados en los chimpancés. Se ha demostrado que este virus procede del virus de chimpancé VIScpz, que ha cruzado la barrera de las especies y ha infectado a la población humana al menos en tres ocasiones distintas y ha dado lugar a tres grupos distintos de VIH-1: el grupo M, que es el mayoritario en la pandemia del SIDA, y otros dos grupos menos extendidos: el O (de outlier o marginal), del que se han descrito varios centenares de casos, y el grupo N, del que sólo hay seis casos censados. El VIH-2 es menos virulento y está extendido principalmente en África occidental. Los monos de cara tiznada o mangabeis están ampliamente infectados por VIS y son el reservorio del VIH-2². Los análisis filogenéticos demuestran 8 grupos de VIH-2 que derivan de otras tantas introducciones en el hombre a partir de mangabeis de cara tiznada³.

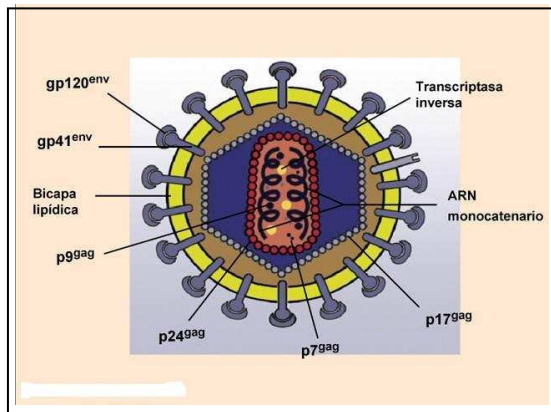
Los primeros casos de SIDA se describieron en Los Ángeles en junio de 1981⁴⁻⁹ y en diciembre del mismo año se caracterizó como entidad nosológica¹⁰⁻¹². En 1983 se

identificó un nuevo retrovirus del cual se demostró su implicación etiológica en el SIDA y se denominó virus de la inmunodeficiencia humana¹³. Sin embargo, el origen del VIH precede en al menos cinco décadas a su identificación como agente causal de la enfermedad¹⁴.

1.1.2.- Estructura de los virus de la inmunodeficiencia humana

El VIH-1 es una partícula esférica de 80 a 100 nm, con una estructura en tres capas: la interna o nucleoide, que contiene dos hebras completas de ARN más la nucleoproteína y las enzimas víricas, una cápside icosaédrica y una envoltura derivada de la célula huésped, donde se insertan las glicoproteínas (gp) y los antígenos de histocompatibilidad de clases I y II que derivan de la célula huésped¹⁵ (Figura 1).

Figura 1. Estructura del VIH-1



El genoma del virus es un ARN de cadena única formada por dos hebras idénticas, de polaridad positiva, de 9,6 kilobases de longitud. Las dos moléculas de ARN están físicamente unidas mediante puentes de hidrógeno en sus extremos 5'. La organización genómica de los retrovirus^{16,17} es siempre la misma: 5'-gag-pol-env-3' y, además,

dependiendo del tipo de retrovirus, hay genes adicionales, reguladores y accesorios, que en el caso del VIH-1 son 6: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*. (Figura 2 y Tabla 1).

En ambos extremos del genoma se encuentra una secuencia repetida (región LTR) de entre 18 y 250 nucleótidos según la especie. A continuación, y siguiendo el sentido 5'-3', hay una región no codificante única (U5), que es la primera en transcribirse y que formará el extremo 3' del provirus. Después viene la región de unión del primer ARNt específico, la región líder, los genes que codifican para las proteínas del virus, la cola de polipurinas y la región U3, que formará el extremo 5' del provirus.

Figura 2. Genoma del VIH-1 y proteínas que codifica

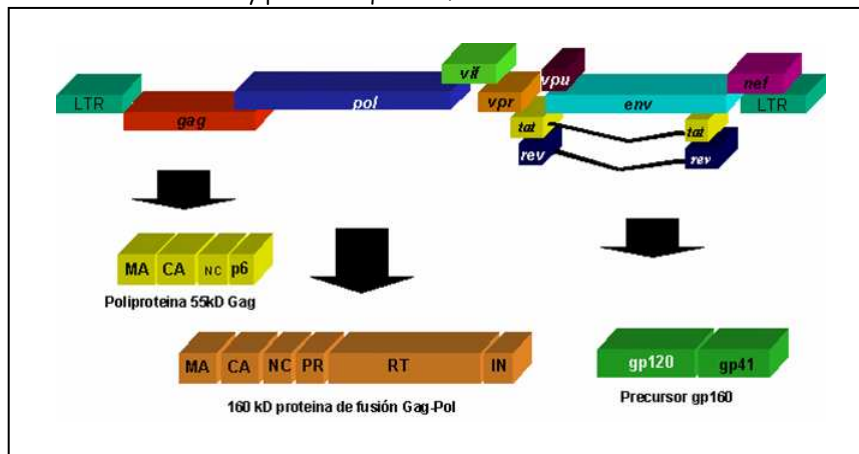


Tabla 1. Genes y proteínas del VIH-1

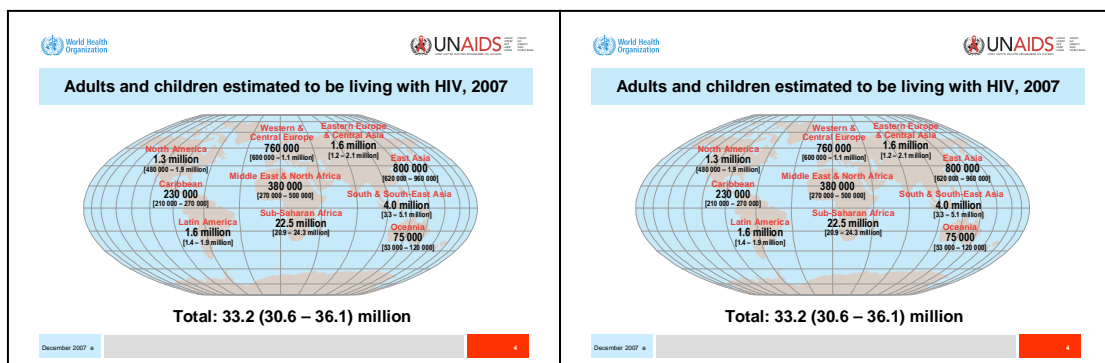
gen	proteína	función
env	gp160 gp120 (SU) gp41 (TM)	Poliproteína precursora Proteína de la envuelta viral. Interacción con el receptor CD4 Fusión de membranas
gag	p55 p24 (CA) p17 (MA) p7 (NC) p6	Poliproteína precursora Proteína de la cápsida Proteína de la matriz Proteína de la nucleocápsida Ribonucleoproteína, esencial para la encapsidación viral
pol	Transcriptasa inversa (RT) Integrasa (IN) Proteasa (PR)	Retrotranscripción, Actividad ARNasa H Integración Procesamiento postraduccional de las poliproteínas gag y gag-pol
tat	Tat	Elongador del ARN mensajero Transactivador
rev	Rev	Regulador del transporte y procesamiento del ARNm
nef	Nef	Regulación negativa de CD4 y HLA de clase I. Aumento de la infectividad viral Incremento de la retrotranscripción
vif	Vif	Aumenta la infectividad viral
vpr	Vpr	Transactivador viral. Transporte del complejo de preintegración al núcleo Parada del ciclo celular
vpu	Vpu	Secuestro de CD4 en el retículo endoplásmico. Aumenta la generación de viriones

1.1.3. - Epidemiología de la infección:

Desde 1981, cuando se detectaron los primeros casos de lo que posteriormente se denominaría SIDA⁴⁻⁹, más de 60 millones de personas han sido infectadas por el virus y actualmente es una de las causas más importantes de muerte en todo el mundo. La epidemia ha ido creciendo de forma exponencial en muchos países y se ha extendido a todas las áreas del planeta, del tal modo que actualmente es posible hablar de pandemia del VIH.

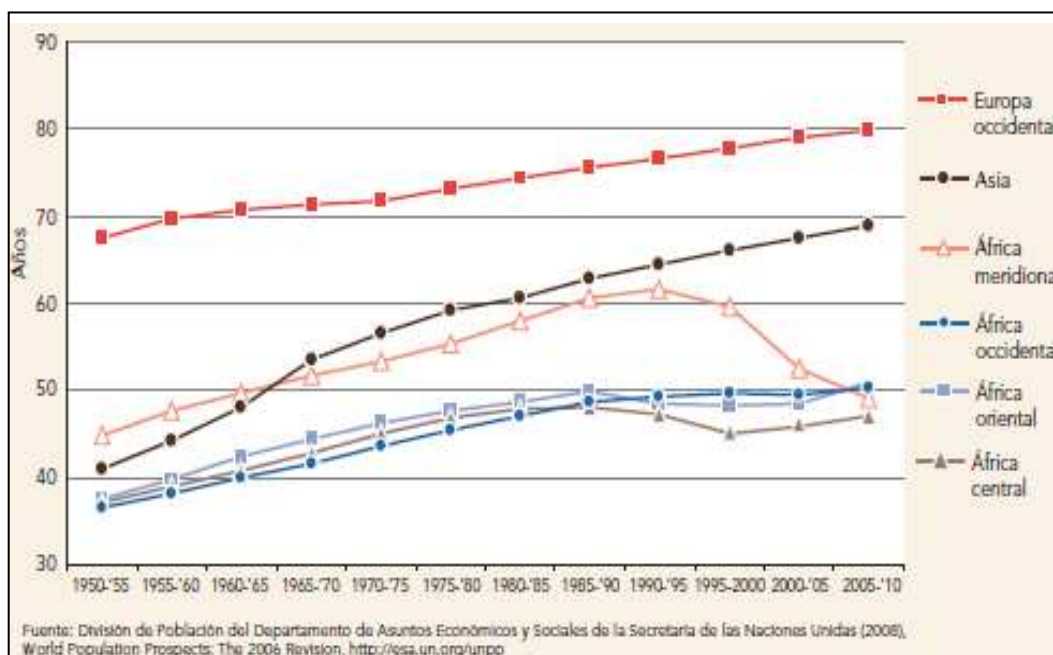
La OMS / ONUSIDA en su balance sobre la situación de la epidemia del SIDA en Diciembre de 2007, estimó que el número de personas vivas infectadas por el VIH en 2007 alcanzó la cifra de 33.2 millones¹⁸. Así mismo, se calcula que cada día 6.800 personas contraen la infección por el VIH y más de 5.700 fallecen a causa del SIDA y, se estima que el número de fallecidos en 2007 por esta infección fue de 2.1 millones (Figuras 3 y 4). Por este motivo, la pandemia del VIH constituye uno de los desafíos más importantes en enfermedades infecciosas para la salud pública. No obstante, la evaluación epidemiológica actual presenta elementos alentadores, ya que sugiere que la prevalencia de infección por el VIH se mantiene estable aunque el número general de personas que viven con el VIH sigue aumentando debido a la acumulación continua de nuevas infecciones con periodos más prolongados de supervivencia, medidos en una población general en constante crecimiento.

Figuras 3 y 4. Prevalencia mundial de SIDA



La tasa de nuevas infecciones por el VIH ha disminuido en varios países pero, a nivel mundial, el aumento de nuevas infecciones en otros países contrarresta, al menos en parte, esta tendencia favorable. África subsahariana continua siendo la región más afectada por el VIH y, en 2007, le correspondieron el 67% de todas las personas que viven con le VIH y el 72% de los fallecimientos a causa del SIDA. Se estima que, en África Meridional, la expectativa de vida se ha reducido a niveles existentes en 1950 y, en la actualidad es inferior a los 50 años en la región (Figura 5). En cambio, la epidemia de VIH en Europa Occidental y Asia, de impacto epidemiológico menor, casi no afectaron las tendencias en la expectativa de vida de esas regiones.

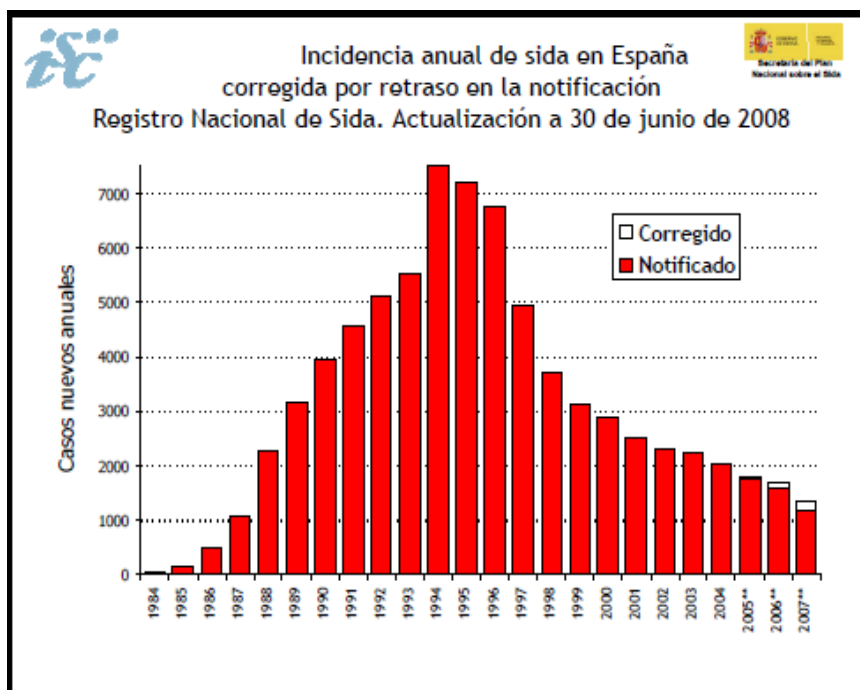
Figura 5: Expectativa de vida en el momento de nacer



Un aspecto que ha modificado la epidemiología de la infección es la implantación del tratamiento antiretroviral. Es de destacar que a medida que ha ido aumentando el acceso al tratamiento en los últimos diez años, ha ido disminuyendo el número de fallecimientos por SIDA.

En la última actualización sobre vigilancia epidemiológica del VIH en España presentada por el Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III), que cuenta con datos que provienen de 8 Comunidades Autónomas que aportan la información imprescindible de los casos recogidos en el quinquenio 2003-2007, se extraen las siguientes conclusiones: a) la transmisión del VIH ha disminuido notablemente respecto a la década de 1990, cuando España presentaba las tasas de incidencia más altas de Europa. Actualmente, se sitúa a niveles similares a otros países del entorno de la Unión Europea; b) Los patrones epidemiológicos de transmisión del virus han cambiado; mientras que en el pasado la mayor parte de las nuevas infecciones se produjo por compartir material para inyección de drogas, en la actualidad el VIH se transmite mayoritariamente por vía sexual. c) Las personas nacidas fuera del estado español suponen más de un tercio de los nuevos diagnósticos de VIH, resultado del aumento de población inmigrante que ha ocurrido en España en los últimos años¹⁹. (Véase la disminución en la incidencia anual de SIDA en España en la figura 6).

Figura 6. Incidencia anual de SIDA en España



En relación a Cataluña, el último informe emitido por el Centre de Estudis Epidemiològics sobre la SIDA de Catalunya (CEESCAT) recoge 427 nuevos casos de SIDA y 5184 nuevas declaraciones de infección por el VIH durante los años 2007-2008 y se asiste también a un cambio en relación con el factor de riesgo predominante para la adquisición de la infección, con aumento de los casos de infección por vía de relaciones heterosexuales, una estabilización en el grupo de riesgo de relaciones homosexuales y una disminución en el grupo de usuarios de drogas por vía endovenosa²⁰. Desde el inicio de la epidemia en 1981 hasta la actualidad en Cataluña se han declarado 16.135 casos de SIDA y se han producido 10.129 defunciones por esta causa. (Véase el progresivo descenso en la prevalencia de los casos de SIDA en los últimos 10 años en Cataluña en la figura 7, así como el descenso en el último año de los nuevos diagnósticos de infección por VIH en la figura 8)

Figura 7. Incidencia y prevalencia de SIDA en Cataluña

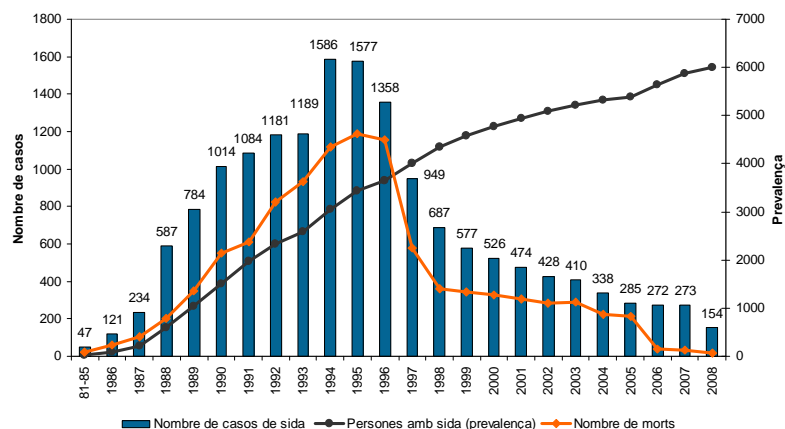
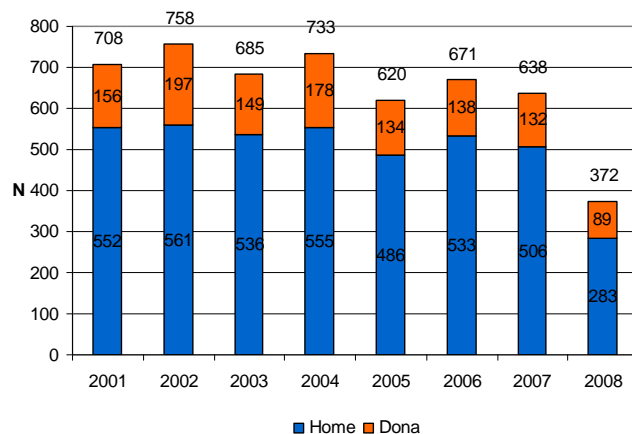


Figura 8. Nuevos diagnósticos de infección por el VIH en Cataluña

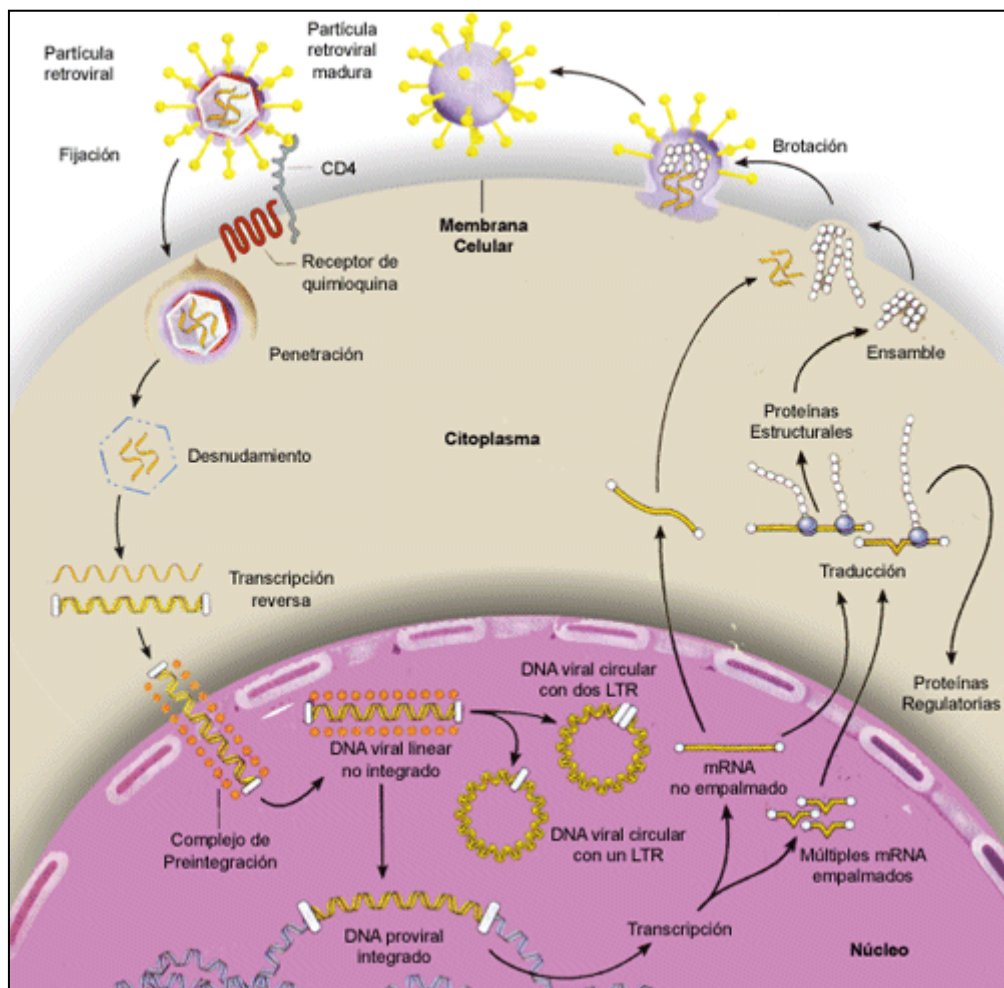


1.2. - Inmunopatogenia del VIH

1.2.1. - Ciclo biológico del VIH

El ciclo de replicación del VIH se divide en dos etapas bien diferenciadas. Tras una primera etapa de adsorción, fusión e internalización del virión que ocurre en la membrana celular, el virus se retrotranscribe de ARN viral a ADN proviral en el citoplasma mediante la acción de la transcriptasa inversa. Posteriormente, el complejo de replicación es transportado al núcleo donde el ADN proviral se integra en el ADN celular. El ciclo prosigue con la transcripción y activa traducción de las proteínas virales y termina con la morfogénesis y salida de nuevos viriones (Figura 9).

Figura 9. Ciclo biológico del VIH-1

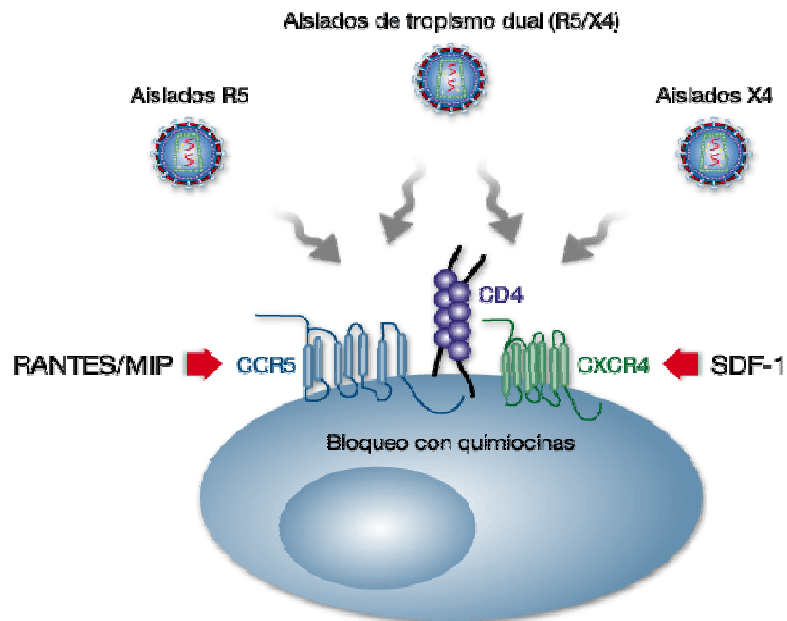


Adsorción, fusión e internalización del virión

Para iniciar la infección, las proteínas de la envoltura del VIH facilitan la fusión de las membranas viral y celular, y permiten la invasión del genoma viral en la célula. El gen *env* codifica para una proteína que se glucosila denominada gp160, cuya escisión mediante una proteasa celular da lugar a una glucoproteína superficial gp120 y otra transmembrana, gp41, y ambas permanecen asociadas de forma no covalente. La interacción de gp120 con el receptor CD4 en la membrana celular induce un cambio conformacional en la gp120²¹, resultando en la exposición de epítomos conservados que se encontraban ocultos, los cuales posibilitan la unión de este complejo a un segundo receptor (correceptor) que pertenece a la familia de los receptores de quimioquinas y está firmemente anclado en la membrana celular.

Se conocen varios correceptores que facilitan la entrada del VIH-1 al interior de la célula, pero los que utiliza principalmente son el CCR5 y CXCR4. La unión del virus al correceptor provoca otro cambio conformacional, esta vez en la proteína transmembrana (gp41) que posibilita la fusión de la envuelta viral con la membrana celular²², y posterior entrada de la nucleocápside viral. El uso de un correceptor u otro, por parte del virus, define el tropismo de la cepa viral hacia macrófagos (cepas R5) o linfocitos (cepas X4) o hacia linfocitos o macrófagos indistintamente (cepas R5X4 o duales). Las cepas R5 son las que existen en las fases iniciales de la infección, lo que indica el papel crítico de esta variante en la transmisión y en las etapas tempranas de la infección. Esta variante es la que también se detectará durante la fase asintomática de la enfermedad, pero a medida que avanza la infección se observa la presencia de cepas con tropismo X4 o dual (R5X4), cepas inductoras de sincitios, que están asociadas con la progresión de la enfermedad y depleción de linfocitos CD4⁺^{23,24}. (Figura 10, página 26)

Figura 10: Tropismo de cepas R5, R4 y duales



Transcripción inversa e integración:

Tras la entrada del virus se inicia su replicación mediada por la transcriptasa inversa (TI) contenida en el virión, que cataliza la formación de la primera cadena de ADN a partir del ARN viral. Para la síntesis de las dos cadenas de ADN viral se requiere la acción del dominio de ribonucleasa H, que degrada parcialmente el molde ARN original. Posteriormente el ADN de doble cadena lineal se integra en los cromosomas celulares, proceso catalizado por la integrasa viral. Para la integración del ADN viral en los cromosomas celulares, es necesario que el complejo de preintegración vaya acompañado de varias proteínas virales más alguna celular y se introduzca en el núcleo. El VIH se integra normalmente en células activadas, en las que no existe membrana nuclear. (Figura 9, página 24)

Latencia:

Se produce tras la infección y la integración del provirus. Sólo el 1% de los linfocitos CD4 están infectados y expresan ARN viral, para lo cual se requiere activación celular mediante estímulos formados por antígenos, citoquinas y mitógenos.

En los últimos años una serie de trabajos apuntan a que la latencia podría ser un fenómeno "activo" en el sentido de que sería mantenida por una serie de factores celulares como Murr-1²⁵. Recientemente se ha comunicado que la proteína APOBEC3G, un factor de restricción celular que impide la replicación viral estaría también implicada en el mantenimiento de la latencia del VIH. La neutralización de APOBEC aumenta la permisividad celular a la replicación ya que incluso linfocitos no activados replican el VIH de forma masiva²⁶.

Transcripción:

El siguiente paso en el ciclo biológico del VIH es la expresión de genes virales y síntesis del ARN que formará el genoma del nuevo virus. Las secuencias LTR contienen los elementos promotores para el inicio de la transcripción. (Figura 9, página 24)

El provirus latente inicia su transcripción mediante factores de transcripción del hospedador, como NF- κ B, Sp1 y el factor de transcripción TFIID (*Transcription Factor IID*)²⁷. El factor NF- κ B no existe en forma activa en los linfocitos CD4+ en estado de reposo celular y es inducido únicamente en el curso de los procesos de activación inmunológica, por lo que la replicación del VIH depende de la activación de los linfocitos infectados²⁸. Las proteínas Tat y Rev del virus son esenciales para la síntesis y procesamiento del ARNm viral²⁹. Una vez iniciada la síntesis del ARN viral, la expresión de la proteína viral Tat aumenta la tasa de transcripción del genoma del VIH y en cooperación con otros factores celulares, permite la elongación completa del ARNm del

virus³⁰. El resultado de la transcripción es un único transcrito de ARN mensajero (ARNm) que debe salir al citoplasma para ser procesado en ARN de diferentes medidas. Ambas etapas, procesamiento y transporte, son realizadas fundamentalmente por otra proteína viral denominada Rev.

En condiciones de transcripción activa del virus se calcula que llegan a producirse por día en una persona infectada varios miles de millones de nuevas partículas virales, para lo cual se activan varios millones de linfocitos CD4+.

Expresión genética temprana y tardía:

La expresión genética temprana comprende la transcripción de los genes reguladores, tat y rev, mientras que la tardía incluye los genes estructurales y enzimáticos codificados por gag, pol y env, así como los accesorios vif, vpr, vpu y nef. Además, es necesaria la presentación de la proteína Rev para que se expresen los genes tardíos. Rev codifica una proteína que facilita el transporte de los ARN mensajeros del núcleo al citoplasma, donde son traducidos por proteínas de los ribosomas celulares.

Morfogénesis y salida:

La traducción del ARNm proporciona la síntesis de poliproteínas que deben ser procesadas para formar las proteínas constitutivas del virus y estas ya podrán ser procesadas por las proteasas virales, a excepción de la gp160 que será procesada en gp120 y gp41 por proteasas celulares. En este proceso también participan otras proteínas virales, entre las que destacan vif y vpu³¹. Vif es necesario para el correcto ensamblaje de las partículas virales y vpu para la gemación de estas partículas. Además, estas proteínas virales son importantes en las fases finales de la infección ya que vpu aumenta la liberación de viriones y vif aumenta la infectividad entre 100 y 1000 veces.

La proteína vif interacciona y neutraliza la acción antiviral del factor celular APOBEC3G, esta proteína actuaría sobre el ARN genómico mensajero del VIH presente en el citoplasma evitando la producción de partículas virales^{32,33}. Las proteínas virales son transportadas a las inmediaciones de la membrana celular, donde ya estarán insertadas las proteínas gp120 y gp41.

Es en la membrana celular donde se van a producir las distintas interacciones, entre precursores del core, core viral, proteínas de la envuelta y membrana celular, que darán lugar a la partícula viral^{34,35}. La generación de la nueva partícula viral acabará con el proceso de gemación en el que se lleva una parte de la membrana de la célula huésped.

1.2.2.- Entrada del VIH en la célula

El proceso de entrada del VIH a la célula es un proceso secuencial que se produce mediante la interacción tanto inespecífica como específica de distintas moléculas situadas en la membrana celular.

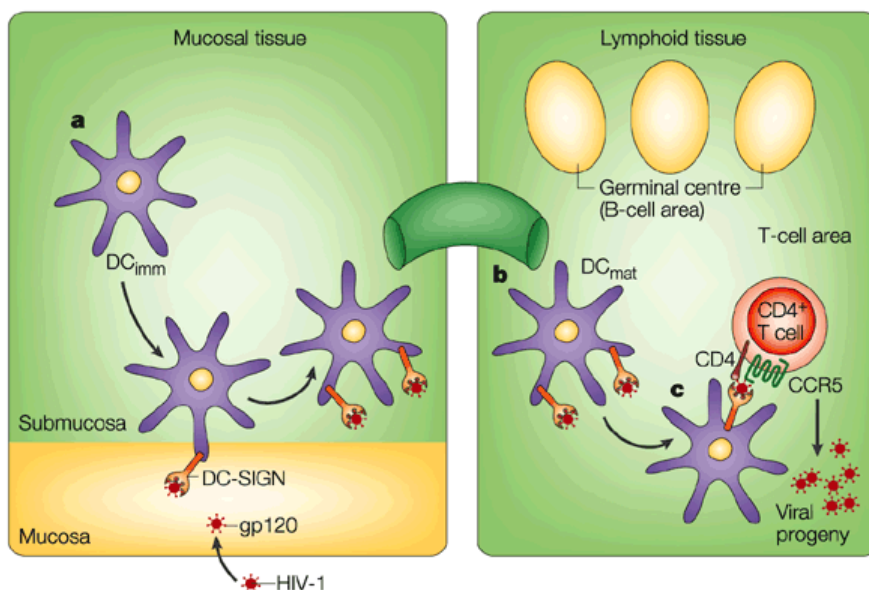
Moléculas de adhesión

Estructuras como los glicosaminoglicanos constituyen complejos a los que se adhieren con baja afinidad numerosos virus envueltos, entre los que se encuentra el VIH. Este no representa un proceso específico similar al que realiza un receptor pero contribuye a "atrapar" en la membrana plasmática viriones y quimioquinas.

Otras moléculas son más específicas y tienen mayor importancia en la fisiopatología de la infección. Así, se ha descrito la existencia, en la superficie de las células dendríticas, de una serie de lecitinas de tipo C denominadas DC-SIGN y L-SIGN, que unen distintos virus, incluido el VIH^{36,37}. No pueden considerarse receptores en sentido estricto, ya que su interacción se produce a través de residuos de

carbohidratos y no de estructuras conformacionales como sería en el caso de un receptor. Sin embargo, la unión del VIH a estas lecitinas facilita e incrementa la infección de los linfocitos circundantes (Figura 11).

Figura 11: Moléculas DC-SIGN en célula dendrítica



La alta afinidad del VIH por estas moléculas hace que las células dendríticas se encuentren literalmente cubiertas de partículas virales en la parte externa de su membrana y es en esta "sinapsis inmunológica" donde se producen los fenómenos de infección de los linfocitos CD4 que entran en contacto con las células dendríticas.

Receptores virales: CD4 y receptores de quimioquinas

La infección de la célula diana, el linfocito CD4+, se produce mediante la interacción con dos tipos de receptores. Por una parte existe un receptor específico y común a todos los subtipos de VIH, la molécula de CD4+. Esta proteína está presente en la superficie de los linfocitos T colaboradores y en células de estirpe mononuclear-fagocítica, lo cual determina el tropismo viral por estos tipos celulares. Sin embargo,

muy pronto se observó, que la presencia de la molécula CD4+ era condición necesaria pero no suficiente para permitir la entrada del VIH en la célula²¹. Con la expresión de la molécula CD4+ se producía la unión del virus a la célula pero no la fusión de las membranas ni la internalización de la nucleocápside viral. Para conseguir la infección se requerían además otras moléculas denominadas inicialmente "factores de fusión". Hoy sabemos que esta función de correceptores la realizan determinados receptores de quimioquinas²³.

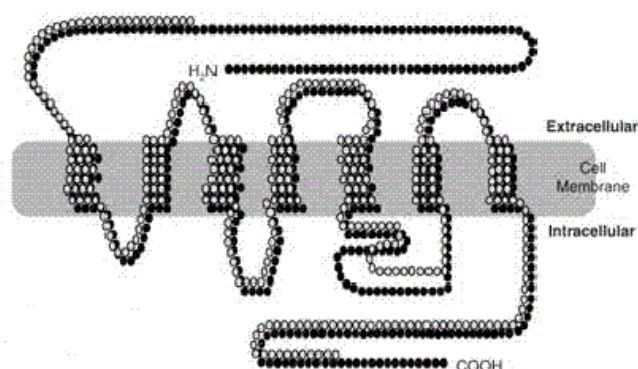
Quimioquinas

Su nombre proviene de "citoquinas quimiotácticas" ya que muchas de ellas poseen propiedades quimioatrayentes y regulan el tráfico de leucocitos. Las quimioquinas o citoquinas quimioatrayentes son una familia de proteínas de bajo peso molecular, con alto grado de homología, cuya característica bioquímica común es la conservación de 4 residuos de cisteína que se unen formando dos puentes disulfuro, esenciales para la actividad de la molécula. Dependiendo de si las dos primeras cisteínas están o no separadas por otro aminoácido, se han clasificado en quimioquinas CXC (Cis- X - Cis) y quimioquinas CC (Cis - Cis). Hay otras dos quimioquinas, la linfotactina y la fractalkina, que pertenecen a otras subfamilias. La linfotactina mantiene algunas de las características funcionales y estructurales de las quimioquinas, pero carece de dos de los cuatro residuos de cisteína³⁸. La fractalkina se trata de una proteína de membrana, que presenta un dominio con estructura de quimioquina en su extremo aminoterminal, este dominio se diferencia de las quimioquinas anteriores por la presencia de tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas, lo que permite abrir un nuevo grupo de quimioquinas, él de las quimioquinas CX3C³⁹.

Receptores de quimioquinas

Las quimioquinas ejercen su actividad mediante la interacción con receptores presentes en la membrana de las células diana. Estos receptores poseen "siete dominios transmembrana" (Figura 12) o GPCR (*G Protein Coupled Receptor*) y se caracterizan por presentar sus aminoácidos hidrofóbicos organizados en segmentos que atraviesan la membrana celular siete veces⁴⁰. Los dominios extracelulares del receptor están implicados en la unión de las quimioquinas mientras que los dominios intracelulares están implicados en el envío de señales a la célula. Esta superfamilia de receptores transmiten las señales al interior de las células mediante la interacción con proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (proteína *G*) y su extremo aminoterminal junto a los bucles extracelulares actuarían conjuntamente en la unión del ligando⁴¹, mientras que las regiones intracelulares, incluyendo el extremo carboxilterminal, intervienen en la traducción de las señales activadas tras la unión del ligando⁴².

Figura 12: Receptor de quimioquinas. En la imagen se observa el dominio extracelular, los 7 dominios transmembrana y el dominio intracelular.



Como ocurre en las quimioquinas, los receptores también pueden agruparse en dos grandes familias, que interaccionan con quimioquinas de la familia *CC* y *CXC*

respectivamente, además tenemos el receptor CX3CR1 cuyo ligando es la fractalkina o quimioquina CX3CL1.

Por otro lado, las quimioquinas muestran gran redundancia en la utilización de sus receptores; de esta manera, varias quimioquinas pueden acoplarse a un mismo receptor y una quimioquina puede ligarse a varios receptores^{43,44}.

Receptores de quimioquinas y VIH-1

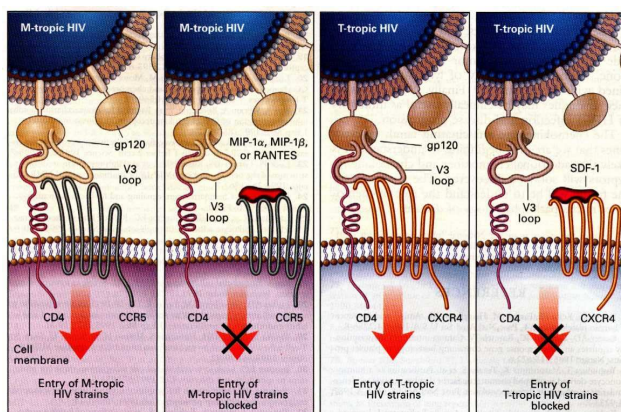
El primer paso para la identificación de los receptores de quimioquinas como correceptores del VIH se produjo en 1986 cuando Walker *et al*⁴⁵ demostraron que factores solubles de los linfocitos CD8+ podían controlar *in vitro* la infección por el VIH. Sin embargo, no fue hasta 1995 cuando Cocchi *et al*⁴⁶ lograron identificar las quimioquinas RANTES (regulated and activation, normal T cell expressed and secreted), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α y MIP-1 β como los factores supresores producidos por los linfocitos CD8+. Poco después, Feng *et al*⁴⁷ lograron demostrar un receptor de quimioquinas (posteriormente identificado como CXCR4) que actúa como correceptor de ciertas cepas de VIH.

En estudios *in vitro* se ha observado que muchos receptores de quimioquinas son capaces de actuar como correceptores del VIH, pero *in vivo* son fundamentalmente dos, CCR5 y CXCR4. El primero tiene como ligandos las CC-quimioquinas RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β ; es el receptor principal de las cepas R5, antes denominadas no sincitiales. El receptor CXCR4 tiene como único ligando la quimioquina SDF1, denominada actualmente CXCL12, y es el principal receptor de las cepas X4, antes denominadas sincitiales. La conformación de distintas regiones de la gp120, especialmente del bucle V3, condiciona el tropismo de los distintos aislados virales^{48,49}. Además de los virus con un tropismo estricto por CCR5 o por CXCR4 se han descrito variantes virales capaces de entrar en la

célula a través de los dos correceptores mayores (cepas de tropismo dual o ampliado, denominas R5X4) y aislados capaces de unirse a otros correceptores, como CCR2 o CCR3.

Las quimioquinas que se unen a CCR5 y CXCR4, especialmente RANTES, MIP-1 α / β y SDF, son capaces de inhibir la infección por el VIH debido a un fenómeno de competición en la unión con sus correceptores y por la internalización de los receptores de quimioquinas tras la interacción con su ligando (Figura 13).

Figura 13: Bloqueo de correceptores por quimioquinas



Así mismo, la caracterización de los correceptores del VIH y sus ligandos naturales ha permitido definir una serie de variantes genéticas que se asocian con resistencia a la infección o con una progresión lenta de la enfermedad.

Variantes genéticas de los correceptores, quimioquinas y infección por VIH

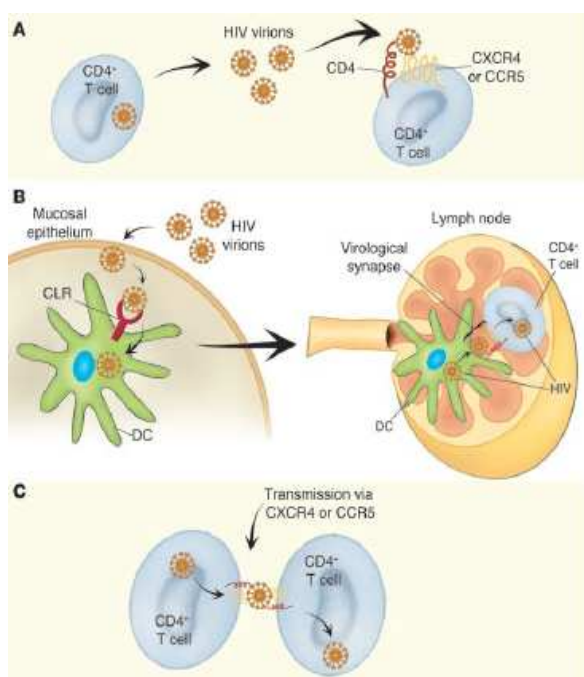
Las quimioquinas y sus receptores celulares son, en general, moléculas polimórficas. Variaciones puntuales (SNP o *single nucleotide polymorphism*) en los genes que codifican para las quimioquinas y sus receptores pueden condicionar la expresión y actividad funcional de estas moléculas y tener una influencia significativa en la patogénesis y progresión de la infección por el VIH.

La observación de que pacientes homocigotos para una mutación (delección de 32 pares de bases) en el receptor *CCR5* tenían resistencia natural a la infección por el VIH-1^{50,51} mientras que los pacientes heterocigotos para esta mutación se comportaban como no progresores a largo término⁵²⁻⁵⁵, desencadenó posteriores estudios en los que se han identificado una serie de variantes genéticas en las quimioquinas y sus receptores que se han asociado con modificaciones significativas en la evolución natural de la infección por el VIH⁵⁶⁻⁶⁵.

1.2.3. Mecanismos de propagación viral

Una vez que se ha producido la infección por el VIH van a existir tres vías de propagación en el organismo: a) la transmisión de viriones solubles libres de célula a célula en el torrente circulatorio; b) mediante la sinapsis virológica desde la célula dendrítica presentadora del virus a los linfocitos CD4+; y c) por la transmisión directa entre linfocitos CD4+⁶⁶ (Figura 14).

Figura 14: Mecanismos de propagación viral



1.2.4 Mecanismos de pérdida linfocitaria

La pérdida de los linfocitos CD4+ representa el evento inmunológico más característico de la infección por el VIH⁶⁷. La causa fundamental de esta pérdida es debida a la acción directa del virus como consecuencia del efecto citopático en la célula infectada de la alta replicación viral. Se ha estimado que alrededor de 10^8 linfocitos CD4+ son destruidos diariamente por el VIH por efecto citopático directo. Pero toda la disregulación inmunitaria observada en esta enfermedad no se explica solo por la destrucción linfocitaria por este mecanismo directo, y existen también otra serie de mecanismos indirectos.

Así, los mecanismos indirectos de destrucción de linfocitos CD4+ se pueden clasificar en aquellos mediados por la propia respuesta inmunitaria del paciente y los que se deben al efecto tóxico de proteínas que alteran las vías de transducción linfocitaria y llevan a la muerte celular. En el primer caso, los linfocitos infectados se convierten en dianas del sistema inmune y, al expresar péptidos virales en sus moléculas HLA de clase I, son susceptibles al reconocimiento y destrucción por los linfocitos citotóxicos. En el segundo caso, la apoptosis o muerte celular programada constituye un mecanismo fisiológico mediante el cual la célula se "suicida" de forma controlada. Datos experimentales apoyan la tesis de que el VIH puede inducir apoptosis⁶⁸ a través de mecanismos muy diferentes: activación crónica del sistema inmune, interacción entre los receptores y envuelta viral, efecto tóxico de proteínas virales y síntesis de citoquinas por linfocitos y macrófagos. Además de la gp120, se ha descrito que la proteínas Vpr y Tat ejercen un efecto proapoptótico.

Además de la destrucción de linfocitos CD4+ por los mecanismos arriba mencionados en la infección por el VIH-1 existe también una alteración en la homeostasis normal de estas células que lleva al agravamiento de esta pérdida. Durante la fase crónica de la

infección existe un bloqueo de la entrada de los linfocitos CD4+ en ciclo de división, este bloqueo en la activación y proliferación linfocitaria puede producirse a nivel central o periférico⁶⁷. También, la acumulación de partículas virales en los órganos linfoides origina un reclutamiento de linfocitos en estas zonas, produciéndose un "secuestro" de los mismos. Por último, además de los mecanismos previamente descritos, algunos autores proponen la existencia de un "agotamiento" del sistema inmune para explicar esta intensa citopenia generada en el curso de la infección⁶⁹.

1.2.5. Respuesta inmune frente al VIH

Respuesta humoral

La infección por el VIH induce una intensa respuesta de anticuerpos frente a prácticamente todas las proteínas reguladoras y estructurales del mismo. Se ha descrito síntesis de anticuerpos no sólo frente a la envoltura sino también frente a las proteínas de la matriz, de la nucleocápside viral y proteínas reguladoras del virus. Algunos de estos anticuerpos tienen capacidad neutralizante *in vitro* y en experimentos de inmunoterapia *in vivo*⁷⁰. Sin embargo, la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante es escasa y rápidamente se observa un escape viral a los mismos.

En relación a la respuesta humoral inespecífica existen numerosos factores solubles que son activos frente a la infección por el VIH. Los virus, en general, y el VIH en concreto, son sensibles a la inhibición por complemento. Los interferones también tienen actividad antiviral frente al VIH. Probablemente estos mecanismos representan una barrera parcial frente a la infección, pero son insuficientes para controlar la replicación viral completa.

Respuesta celular

En la infección por el VIH se produce una respuesta celular antiviral en distintas poblaciones: linfocitos CD4+ colaboradores, linfocitos CD8+ citotóxicos (CTL) y células de estirpe NK. Sin embargo, la mayoría de los trabajos coinciden en que la respuesta CD4+ y CD8+ constituye el mecanismo más importante de protección frente al VIH.

El estudio de la respuesta citotóxica *in vitro* (CTL) ha demostrado que en los pacientes seropositivos existe una expansión clonal de linfocitos CD8+ con actividad citotóxica⁷¹. Esta respuesta es especialmente marcada durante la primoinfección y su intensidad se correlaciona con el control de la replicación viral. La respuesta celular no se limita a los linfocitos CD8+, se ha demostrado que una respuesta CD4+ específica es importante no sólo para la puesta en marcha de una respuesta inmune eficaz frente al VIH sino por su propia actividad antiviral.

En relación a los mecanismos de inmunidad celular no específicos (no restringida por el sistema HLA), se ha descrito la existencia de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (DAC), así como una actividad citotóxica natural (NK) frente al HIV en pacientes seropositivos. Estas respuestas son más intensas en pacientes asintomáticos.

Además de su acción citolítica, los linfocitos CD8+ de pacientes seropositivos inhiben la replicación del VIH en ausencia de destrucción linfocitaria y esta actividad supresora corresponde a los factores solubles presentes en el sobrenadante generado a partir de linfocitos CD8+ activados. Esta actividad supresora corresponde principalmente a quimioquinas CC y CXC, como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β y SDF-1.

Respuesta inmunitaria en pacientes no progresores

Existe un pequeño porcentaje de pacientes infectados que sin tratamiento permanecen asintomáticos, y mantienen cifras de linfocitos CD4+ superiores a 500/ μ l,

así como, cargas virales muy bajas durante más de 15-20 años tras haber sido infectados (descrito con más detalle en página 49). En estos pacientes, denominados progresores lentos (*LTNP, Long Term Non progressors*) (véase más adelante, Historia natural de la infección, páginas 43-57), los mecanismos efectores frente al VIH presentan una actividad muy superior a la observada en pacientes que evolucionan rápidamente a SIDA⁷².

Entender el mecanismo que conduce al aparentemente perdurable control de la replicación del VIH en este grupo de pacientes y sobre todo en los considerados "*controladores de élite*", que permanecen libres de enfermedad, con cargas virales plasmáticas indetectables y con cifras elevadas y estables de linfocitos CD4+, es el foco de interés de múltiples grupos de investigación en la actualidad ya que proporcionaría la información crítica y necesaria para planificar las estrategias de posibles vacunas terapéuticas frente al VIH. Además, dado el aumento de la disponibilidad de agentes biológicos que pueden modificar la respuesta del huésped, definir los mecanismos que conducen al éxito en el control de una infección crónica viral *in vivo*, podría llevar al desarrollo de una terapéutica de base inmune.

Respuesta inmune en sujetos repetidamente expuestos y no infectados

Un hecho destacable en el estudio de la infección por el VIH es la existencia de sujetos que a pesar de múltiples exposiciones al VIH no presentan infección, son los denominados expuestos no infectados (ENI). Al igual que los LTNP estos pacientes constituyen un grupo heterogéneo en que se combinan factores genéticos, inmunológicos y virológicos.

Entre los factores genéticos se ha descrito la correlación entre un alto grado de resistencia a la infección y el haplotipo HLAB35⁷³. También es conocido que la

homocigosis para la delección $\Delta 32$ -CCR5 confiere protección para la infección. En cuanto a los factores inmunológicos se han descrito distintos parámetros inmunológicos que podrían explicar esta resistencia a la infección como la detección de altos niveles de producción de RANTES en algunos ENI y la síntesis de IgA secretora específica frente al VIH en secreciones vaginales de mujeres expuestas pero no infectadas.

Igual que con los "controladores de élite" el estudio de este grupo de pacientes puede proporcionar datos clave para el planteamiento de vacunas preventivas.

1.2.6. Mecanismo de escape viral

Variabilidad genética

La variabilidad genética del VIH es alta y es debida a la elevada tasa de error de la transcriptasa inversa, lo que supone la producción de una gran proporción de virus defectivos y, la generación de una alta diversidad en las proteínas del virus que le permiten escapar al control de la respuesta inmune específica^{74,75}. A esta variabilidad debida a la tasa de error de la transcriptasa inversa se añaden otros mecanismos como la recombinación genética que origina nuevos subtipos.

Enmascaramiento de epítomos de neutralización

La estructura de la envuelta viral en su forma nativa oculta los dominios de interacción con los correceptores virales, este enmascaramiento explicaría la dificultad para generar anticuerpos frente a determinantes comunes de la envuelta y además la dificultad de dichos anticuerpos para acceder a sus dominios de neutralización, que sólo son expuestos en el estrecho contacto de interacción entre membrana viral y plasmática⁷⁶.

Rapidez en el establecimiento de la infección

En pacientes primoinfectados el establecimiento de la infección tras la inoculación del VIH es un proceso sumamente rápido⁷⁷⁻⁷⁹, así en siete días la infección se ha propagado a ganglios linfáticos sistémicos. La rapidez de instauración de estos reservorios, antes de que se desencadene la respuesta inmune específica, es un obstáculo de gran importancia para el control de la replicación viral, ya que el virus se establece en los linfocitos infectados, en los que persiste pese a una respuesta inmune específica.

Latencia y reactivación

El VIH es capaz de infectar de forma latente sus células diana, lo que le permite escapar de forma absoluta a la vigilancia inmunológica al no expresar productos virales en su membrana⁸⁰. Además, los procesos de reactivación y reinfección se producen en los centros germinales de los órganos linfoides, que presentan un microambiente idóneo para el proceso de la infección. Por otra parte, la reactivación a partir del estado de latencia es un proceso tan rápido que puede dificultar una respuesta citotóxica eficaz que destruya los linfocitos en que el virus se está reactivando.

Escape a los mecanismos de restricción celular de la infección

Dentro de los mecanismos de restricción celular, unos son generales y afectan a diversos virus pero, otros, son específicos y, en el caso de los retrovirus, existe una especificidad de especie que restringe la replicación de un retrovirus en otras especies. Algunos de estos mecanismos han sido caracterizados en el ser humano y corresponden a las proteínas TRIM5 α ^{81,82} y APOBEC3G⁸³. El VIH ha modificado determinados residuos de su cápside de manera que le permiten eludir el bloqueo por TRIM5 α humano. Así

mismo, la proteína APOBEC3G que favorece la formación de retrotranscritos con alta tasa de error (y por tanto abortivos) bloqueando de esta manera la infección, se ve sobrepasada por la expresión de una proteína viral que bloquea la acción de la APOBEC, la proteína vif^{83,84}.

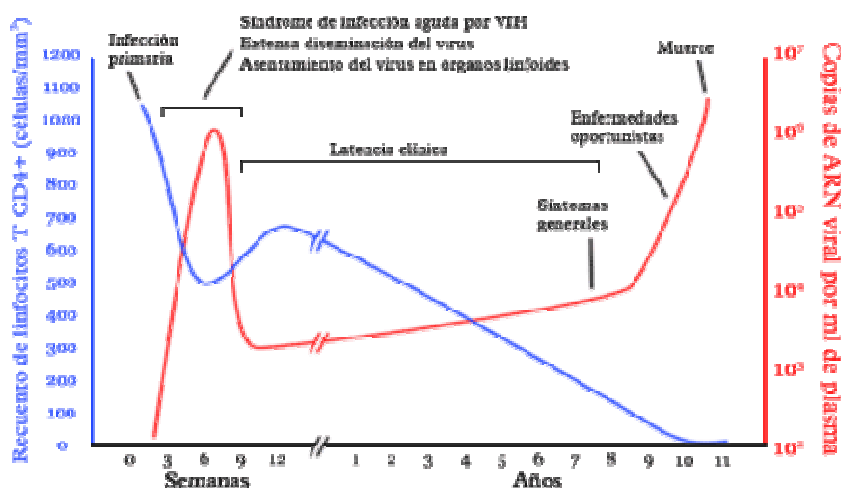
2. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

2.1. Fases de la infección

El curso natural de la infección por el VIH-1 se desarrolla típicamente de manera crónica y puede variar de un paciente a otro. Después de la entrada del virus en el organismo, se inicia un proceso en el que se distinguen una serie de fases o estadios evolutivos bien definidos, con una duración variable que depende, como se comentará después, de una serie de factores tanto del virus como del huésped.

Las distintas fases en que se divide la historia natural de la infección son: fase aguda o primoinfección, que comprende desde el momento del contagio hasta que se produce la seroconversión; fase crónica o asintomática, que tiene una duración muy variable, en la que existe un equilibrio dinámico entre la replicación viral y la respuesta inmunológica del paciente; y la fase final, a partir del diagnóstico de SIDA, a la que se llega como consecuencia de la ruptura de este equilibrio, aumentando la carga viral y con un progresivo deterioro de la función inmunitaria. Finalmente, en ausencia de tratamiento, se produce la muerte del paciente debido a los tumores o infecciones oportunistas (Figura 15). Evidentemente, el uso del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) desde el año 1996 ha modificado la historia natural de la enfermedad de forma espectacular

Figura 15: Historia natural de la infección por el VIH-1



Fase aguda

Entre 2 y 4 semanas después del contagio, alrededor de un 50% de pacientes presentan una primoinfección clínica de intensidad variable, caracterizada en la mayoría de los casos por un cuadro pseudomononucleósico y, menos frecuentemente, por otros cuadros como meningitis o, incluso, infecciones oportunistas⁸⁵. La única diferencia identificada entre los pacientes que presentan primoinfección sintomática respecto a aquellos que no la presentan es la carga viral en el *steady-state* (carga viral estable a los 6-12 meses de la infección, cuando se establece el equilibrio entre la replicación viral y la respuesta inmune) la cual es menor en los pacientes que han permanecido asintomáticos durante la primoinfección⁸⁶.

Durante esta fase se detecta una intensa viremia (entre 10^5 y 10^7 copias de ARN viral por ml de plasma)⁸⁷ y una depleción masiva de linfocitos CD4+ memoria específicos para el VIH⁸⁸. Se produce una diseminación del virus, con alta replicación del mismo a distintos niveles, principalmente en tejido linfático y sistema nervioso central, replicación que incluso en ausencia de signos clínicos se ha demostrado que existirá en todos los estadios de la infección por VIH⁸⁹. Más de un 1% de los linfocitos CD4+ de sangre periférica se infectarán durante la fase aguda, produciéndose una caída inicial de su número. Durante estos primeros días de la infección aguda se produce una depleción masiva de linfocitos CD4+ memoria específicos para el VIH. Unas 20 semanas después del contagio se desencadena la respuesta inmunológica específica que reduce la carga viral hasta que se alcanza una situación de equilibrio dinámico entre la replicación viral y la respuesta inmune, con cargas virales plasmáticas muy variables (media de 10^2 - 10^6 copias/ml) y recuperación del número de linfocitos CD4+, a esta situación se llega entre los 6 y 12 meses después de la infección.

El diagnóstico de la infección aguda por el VIH se basa principalmente en la detección de ARN vírico en plasma mediante la técnica de amplificación basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR o *polymerase chain reaction*)⁹⁰. La detección del Ag p24 mediante enzimoimmunoensayo (ELISA; o *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), constituye una prueba diagnóstica alternativa a la anterior. Pese a que resulta altamente específica, es menos sensible que la primera, y generalmente se utiliza como complementaria. Los anticuerpos específicos frente al VIH-1 no se detectan durante las primeras semanas de la infección, ya que hasta el momento de la seroconversión del paciente infectado (que suele tener lugar al cabo de 4-12 semanas tras el contagio) no se produce una respuesta humoral productora de anticuerpos específicos.

Fase crónica

En esta fase la activación persistente del sistema inmune, permitirá mantener controlada la replicación viral masiva durante muchos años, aunque durante estos años la replicación viral es muy elevada en los órganos linfoides⁷⁷. Con el tiempo, los mecanismos de inmunosupresión y destrucción de los linfocitos CD4+ por el VIH-1 junto con la aparición de variantes más agresivas del virus, romperán este equilibrio y el sistema inmunitario presentará una incapacidad progresiva para controlar la replicación que conducirá a la aparición de las enfermedades oportunistas de la fase final del SIDA. La carga viral con la que se llega al equilibrio dinámico (*steady-state*), será uno de los principales factores determinantes del tiempo de evolución a SIDA⁹¹.

Durante este periodo de infección crónica se pueden detectar altos niveles de ARN del VIH-1 en todo el ganglio linfático, especialmente en las regiones perifoliculares de los centros germinales. Hasta un tercio de los linfocitos CD4+ en tejido linfoide y sangre periférica tienen ADN del VIH-1 detectable, la mayor parte del cual es genoma

defectivo⁹¹. Una proporción significativa de los linfocitos CD4+, entre 0.1 y 1%, expresan ARN del VIH-1 en un momento dado, lo que indica la existencia de replicación activa⁹².

La velocidad con la que se produce el deterioro progresivo del sistema inmunitario, varía en los pacientes y, como se describirá con detalle en el siguiente apartado (sección 2.2, página 49), se diferencian tres grandes grupos de pacientes dependiendo de la rapidez de esta progresión a SIDA: progresores típicos, no progresores a largo plazo y progresores rápidos. En relación a la distinta velocidad que puede seguir la historia natural de la infección por el VIH-1 se han descrito diversos factores que alteran la historia natural de la evolución de la infección que se comentarán en el apartado 2.3 (página 50).

Fase final o de SIDA

Esta fase se caracteriza por una disminución de la actividad de los CTL anti-VIH, destrucción de la arquitectura linfática, gran incremento de la replicación viral y un recuento de linfocitos CD4+ inferior a 200/ μ l. Todo esto conducirá al paciente a un estado clínico sintomático con la aparición de las infecciones oportunistas y tumores definitorios de SIDA.

Afortunadamente, desde que se dispone del TARGA, el curso natural de la infección ha variado de manera espectacular, prolongándose la fase asintomática de la enfermedad y se consigue en la mayoría de los casos una estabilización clínica y una interrupción de la evolución natural hacia SIDA.

2.2. Categorías de pacientes según la rapidez de la progresión

Progresores típicos (PT).

El patrón de progresión típica ocurre en la mayoría de las personas infectadas (un 80-90%). Estos pacientes presentan una evolución caracterizada por una progresiva caída del número de linfocitos CD4+ durante un periodo de 7 a 10 años, hasta presentar finalmente las enfermedades definitorias de SIDA en ausencia de TARGA⁹³. Después de la primoinfección presentan una disminución muy marcada de la carga viral con una importante respuesta CTL que disminuirá progresivamente a lo largo del tiempo⁷¹.

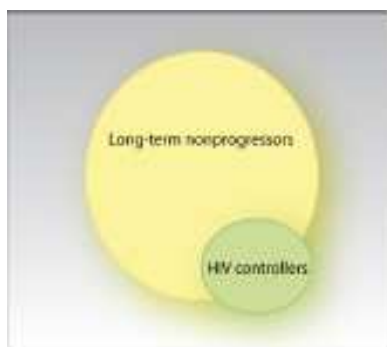
No progresores o progresores lentos (LTNP, *long term non progressors*) y controladores de élite o naturales.

Este grupo representa alrededor del 1-5% de los pacientes infectados⁹⁴. Se trata de pacientes asintomáticos durante más de 15-20 años tras haber sido infectados que, sin haber recibido tratamiento antirretroviral, mantienen una cifra de linfocitos CD4+ superior a 500/ μ ^{94,95}. La carga viral de estos pacientes es muy baja (usualmente menos de 5000 copias/ml). Un buen número de estos pacientes acaban evolucionando finalmente a SIDA^{96,97} por lo que se considera más acertado hablar de progresores lentos más que de no progresores a largo plazo.

Dentro de este grupo de pacientes, en los últimos años se ha diferenciado un subgrupo denominado *controladores de élite o naturales*, que son aquellos pacientes que a lo largo de la infección nunca han presentado una carga viral superior a los límites de detección utilizados en la práctica clínica (< 50 copias ARN/ml). Diversos estudios han puesto de manifiesto que los *controladores de élite* presentan unos niveles de ADN proviral en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) extremadamente

bajos y una menor replicación viral *in vivo*. Estos *controladores de élite* representan menos del 1% del total de los pacientes infectados, como se ilustra en la figura 16⁹⁸⁻¹⁰².

Figura 16. Distribución LTNP y controladores de élite



Los LTNP y los *controladores de élite* son considerados un modelo de autocontrol de la infección y constituyen la base de los estudios de la presente Tesis Doctoral.

Progresores rápidos

Este grupo comprende a los pacientes que presentan un curso hacia SIDA muy acelerado, entre 1 y 5 años después de la infección y representan alrededor del 5-10% del total de las personas infectadas¹⁰³. Estos pacientes presentan una rápida disminución de la respuesta CTL con la consiguiente caída de los linfocitos CD4+. La carga viral después de la primoinfección no disminuye de manera importante y suele estar asociado a fenotipos virales más agresivos (X4 o inductores de sincitios).

2.3. Factores que modulan la historia natural

La historia natural de la infección por el VIH-1 varía ampliamente entre los infectados. Los factores responsables de esta diversidad están por determinar, pero se cree que hay una compleja interacción de factores virales, ambientales y del huésped,

muchos de los cuales están comenzando a conocerse, que determina el curso de la infección.

Factores virales.

Entre los factores virales que modulan la historia natural de la infección cabe destacar, a parte de la dosis de VIH-1 infectante¹⁰⁴, el papel de las cepas de VIH-1 con capacidad de inducir la formación de sincitios (cepas X4 ó SI). Estas cepas tienen incrementada la capacidad destructora de los linfocitos T debido a una elevada capacidad citopática respecto a las cepas no inductoras de sincitios (cepas R5 ó NSI)¹⁰⁵.

Otros factores que se han relacionado con un enlentecimiento de la progresión de la infección han sido: una atenuación en la capacidad de replicación del virus debida a una delección del gen *Nef*¹⁰⁶, aunque esta atenuación no comporta necesariamente un estado de LTNP *in vivo*¹⁰⁷, mutaciones o delecciones en los genes reguladores o accesorios (*rev*, *tat*, *vpr* i *vpu*)^{108,109}; la alta variabilidad de las regiones expuestas y más inmunógenas de la gp160 mediante mutaciones de los epítomos de la envoltura que dificultará el reconocimiento por parte de los CTL¹¹⁰; y la aparición de mutaciones puntuales debidas a la presión efectuada por los antirretrovirales, que disminuyen su capacidad de replicación.

Entre todos estos factores virales la mutación R77Q en *Vpr* (*viral protein R*) ha demostrado en múltiples estudios una asociación con el estado de LTNP. Lum et al¹⁰⁹ detectaron esta mutación en el 80% de sus pacientes LTNP frente a un 36% de los pacientes progresores, resultados que se han visto confirmados en posteriores estudios^{111,112}

En los últimos años se han realizado diversos estudios^{113,114} en los que se ha conseguido aislar el VIH-1 en controladores de élite, demostrando en estos virus una cinética de replicación normal *in vitro* así como la ausencia de inserciones o deleciones en sus genes. Estos estudios tenían la limitación de estar realizados sobre cohortes muy reducidas, en ocasiones de menos de 10 pacientes. Recientemente, Miura et al.¹¹⁵ analizaron una cohorte de 95 controladores de élite de los que fueron capaces de obtener información genética viral de más del 94% de los sujetos, incluso de 17 de ellos obtuvieron la secuencia genómica completa. Los autores analizaron todas las variaciones genéticas conocidas que se han asociado con la modificación en la progresión de la infección por el VIH-1 (HLA-B27, HLA-B51, HLA-B57, inserciones o deleciones en *Nef*, *Gag*, polimorfismos en gp120, *Vpr*, *Vpu*, etc) y observaron que muchos de los defectos genéticos identificados previamente en los estudios a pequeña escala, mencionados anteriormente, no estaban presentes a niveles significativos. Estos hallazgos sugieren que los factores moduladores de la evolución de la infección dependientes del huésped tienen un peso más elevado que los factores virales para el control de la infección.

Factores ambientales

La coexistencia de otras infecciones víricas también se ha relacionado con la variabilidad de la historia natural de la infección. Estudios recientes sugieren que ciertos patógenos pueden atenuar la infección por el VIH-1 y reducir su progresión. Estos incluyen el virus de la hepatitis G (VHG o GBV-C) y el HTLV-2¹¹⁶ (virus linfotrópico humano de las células T tipo 2 o *human T-lymphotrophic virus type 2*).

La coinfección con el VHG, un flavivirus no hepatotrópico relacionado con el virus de la hepatitis C y relativamente común en los pacientes infectados por el VIH-1, se relaciona con un enlentecimiento de la progresión de la infección por el VIH-1¹¹⁷. El

mecanismo por el cual este virus beneficia a la infección por el VIH-1 no es bien conocido, pero se ha observado que el VHG disminuye la disponibilidad de los correceptores CCR5 y CXCR4 mediante la inducción de la síntesis de las quimioquinas específicas, ligandos naturales de los correceptores¹¹⁸. También se ha observado una disminución de la transcripción del VIH-1 desde el ADN integrado en las personas coinfectadas con este virus¹¹⁹.

El HTLV-2 es otro virus que parece atenuar la progresión de la infección por el VIH-1^{120,121}. Este virus induce la producción de diversas quimioquinas como CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) y CCL5 (RANTES), ligandos naturales del correceptor CCR5, resultando una inhibición de la replicación del VIH-1. Recientemente, se ha demostrado que una sobrerregulación de la quimioquina CCL3L1 o MIP-1 α (ligando de CCR5) observada en personas coinfectadas HTLV-2/HIV-1, produce un potente efecto inhibitor de las cepas con tropismo CCR5¹²².

Por otro lado, la coinfección con el virus de la hepatitis C (VHC), claramente se ha relacionado de manera consistente con un incremento en la progresión de la infección¹²³. También, se ha demostrado que el virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2) además de ser un factor mediático independiente de transmisibilidad del VIH-1, incrementa su replicación¹²⁴.

Factores del huésped

Entre los factores genéticos del huésped que modulan la historia natural de la infección se encuentran los diferentes patrones del HLA y las variantes genéticas de los correceptores celulares del virus. En referencia al sistema HLA, los alelos HLA de la clase I B27 y B57 se han relacionado con una progresión más lenta de la infección; concretamente HLA B*5701 y, en menor medida, HLA B27, están hiperrepresentados

entre los *controladores de élite* en relación a los progresores típicos en las cohortes Norteamericanas y Europeas^{125,126}. También se ha demostrado una alta asociación entre B27, B57 y LTNP¹²⁶. Asociaciones más fuertes con los LTNP, se han observado con los alelos B14 y C8¹²⁷. Otros serotipos HLA relacionados con progresión lenta han sido los homocigotos para Bw4¹²⁸. Al contrario, el B35 y Cw4 se han asociado con una progresión acelerada¹²⁹.

Las variantes genéticas de las quimioquinas y sus receptores son factores que han adquirido un papel clave desde que se describió la variante genética con el efecto más potente conocido sobre la infección por el VIH, un defecto en el gen *CCR5*. El gen defectivo contiene una delección de 32 pares de bases, polimorfismo denominado *CCR5Δ32*, que corresponde a la segunda asa extracelular del correceptor *CCR5*. Los pacientes homocigotos para esta variante alélica van a presentar un receptor no funcional y esto explica la resistencia a la infección por cepas del VIH-1 que utilizan este correceptor (cepas R5). La importancia del efecto de esta delección se pone de manifiesto en el caso presentado por Hutter et al.^{130,131} en el que un paciente con infección de más de 10 años de evolución por el VIH-1, que precisaba TARGA, fue sometido a un trasplante de médula ósea por padecer una leucemia mieloide aguda, se seleccionó como donante un homocigoto para la delección *CCR5Δ32* y, a los 20 meses del trasplante el paciente continua con cargas virales plasmáticas indetectables en ausencia de tratamiento antirretroviral. Los estudios epidemiológicos¹³² muestran que la frecuencia alélica de esta delección es entre 10 y 20% en caucásicos (particularmente en Europa del norte), siendo extremadamente rara en la población africana y asiática. La forma homocigota sólo se observa en un 1% de la población caucásica. También se ha demostrado que los portadores heterocigotos de esta variante genética presentan una evolución más lenta de la infección comportándose como LTNP. Posteriormente se han

identificado otros polimorfismos en la región promotora de *CCR5*, así la primera variante genética descrita en esta región fue *CCR5P1*, de forma que los pacientes homocigotos para esta variante progresan más rápidamente que los pacientes que no la presentan y parece ser debido a que produce un aumento de actividad del promotor que conduce a un aumento de los niveles de expresión de *CCR5* en la superficie celular¹³³. También se ha descrito un polimorfismo en la posición -2459 de la región promotora de *CCR5* que conduce a una menor expresión de este correceptor en la superficie de los macrófagos y se ha asociado con una progresión más lenta de la enfermedad^{134,135}. En relación al segundo correceptor mayor del VIH-1, el *CXCR4*, no se han encontrado variantes genéticas que se asocien con riesgo de infección y/o progresión de la enfermedad¹³⁶.

Variantes genéticas en otros quimiorreceptores, considerados correceptores menores, también se han asociado con variaciones en la evolución de la infección por el VIH-1. Así, la existencia de un polimorfismo en el gen *CCR2*, *CCR2 V64I*, se ha asociado con cierta resistencia a la infección¹³⁷ y retraso en la progresión de la enfermedad en distintas cohortes^{138,139} y además este efecto protector parece más marcado en las fases iniciales de la infección¹⁴⁰. A nivel del gen *CX3CR1* se han descrito dos polimorfismos (*V249I* y *T280M*), los estudios que se han realizado sobre su influencia en el riesgo de infección y/o progresión han sido contradictorios¹⁴¹⁻¹⁴³.

Entre las quimioquinas también se han descrito polimorfismos, así en *SDF1*, también llamado *CXCL12* y único ligando natural de *CXCR4*, se ha descrito una transición de *G* a *A*, denominada *SDF1-3'A* o *CXCL12-3'A*, de forma que los homocigotos para esta variante genética presentan un alto nivel de protección de progresión a SIDA ya que este polimorfismo restringe la emergencia de cepas X4 del VIH-1¹⁴⁴. A nivel del gen que codifica para *RANTES* también se ha descrito la presencia de un polimorfismo en la región promotora (*RANTES -28G*) que conlleva una sobrerregulación de la transcripción

y producción de esta quimioquina y como consecuencia se ha asociado a un retraso en la evolución de la enfermedad^{145,146}.

En los últimos años, se han descrito una serie de factores intracelulares del huésped que reducen la replicación viral. Entre estos factores destaca la APOBEC3G, un enzima viral que restringe la replicación viral. Esta citidina deaminasa, en ausencia de la proteína viral Vif (proteína que acelera la degradación de APOBEC3G), es capaz de inducir una hipermutación del ADN producido durante la transcripción inversa, mediante la cual la replicación viral se ve atenuada^{147,148}. Otro de los mediadores de la resistencia antiviral celular innata es TRIM5a⁸¹, que es capaz de bloquear la replicación antes del inicio de la transcripción inversa. No está claro si variaciones genéticas en estos factores del huésped pueden modular la historia natural de la infección.

Si que parece que presentan un papel más importante en la modulación de la historia natural de la infección, las variaciones de los receptores de las células NK (*natural killer*), denominadas KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), que regulan la función de estas células. Las NK representan la primera línea defensiva contra las infecciones virales, previa al desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Estudios recientes, han demostrado que los individuos que coexpresan KIR3DS1 (un receptor regulador de la superficie de las NK) junto a HLA-Bw4-80I presentan una menor carga viral en el *steady-state*, y un enlentecimiento en la progresión de la infección^{149,150}. Otras asociaciones relacionadas con una progresión más lenta han sido HLA B57 y altos niveles de KIR3DL1 (inhibidor del receptor)¹⁵¹.

Mención especial debe hacerse de los mecanismos relacionados con el sistema inmune adaptativo en los pacientes LTNP y *controladores de élite*. Estos pacientes presentan una actividad efectora inmune muy superior a la observada en los pacientes que progresan rápidamente¹⁵². La actividad citotóxica de los CTL está aumentada a través

de la producción de la proteína citolítica perforina¹⁵³ y de múltiples citocinas (interferón- γ , MIP-1 β , TNF- α , IL-2 y/o CD107a)^{154,155}, lo que se relaciona con el control completo sobre el VIH-1 de al menos algunos *controladores de élite*, pero como ha demostrado recientemente Miura et al.¹¹⁵ aún en estos pacientes que mantienen cargas virales por debajo de 50 copias de ARN/ml existe un escape a la actividad CTL. Así mismo, la actividad colaboradora de los linfocitos CD4+ también está aumentada. Se ha observado que tanto los *controladores de élite* como los LTNP presentan CD4+ que expresan cantidades elevadas de IL-2 específica e interferón- γ en respuesta a los péptidos del VIH-1^{156,157}. También se han observado títulos más elevados de anticuerpos neutralizantes en estos pacientes.

En esta tesis se presentan tres estudios inmunogenéticos sobre la influencia de diferentes polimorfismos genéticos en *CCR2*, *CCL2*, *CX3CR1* y *CX3CL1* en la progresión de la infección por el VIH-1 en la población española.

Estudio 1: "Los pacientes españoles infectados por el VIH-1 no progresores en más de 15 años tienen una frecuencia aumentada de la variante alélica 249I del *CX3CR1*". *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005; 40(5): 527-531.

Estudio 2: "Polimorfismos en la región 3' no traducida del gen de la fractalkina y el riesgo de infección por el VIH-1 y de progresión de la enfermedad". *AIDS.* 2007; 21(7): 891-893.

Estudio 3: "Efecto de las variantes genéticas de *CCR2* y *CCL2* en la historia natural de la infección por VIH-1". *CCL2-2518GG* esta sobrerrepresentado en una cohorte de pacientes españoles infectados por el VIH-1". *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007; 44(2): 132-138.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis.

Considerando que:

- 1.- El VIH-1 necesita interactuar con receptores de las quimioquinas además del receptor CD4+ de las células que va a infectar para poder penetrar en su interior.

- 2.- Generalmente utiliza los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4, llamados receptores mayores. Estudios, *in vitro* han observado que puede utilizar también otros receptores de la célula diana como son el CCR2 y CX3CR1 para su entrada.

- 3.- El único ligando natural conocido del receptor de quimioquinas CX3CR1 es la fractalkina o CX3CL1.

- 4.- CCR2 tiene como ligando natural la quimioquina MCP-1 o CCL2.

- 5.- Se ha demostrado que las quimioquinas pueden bloquear los correceptores y de esta manera disminuir su disponibilidad para ser utilizados por el VIH-1 para su entrada a la célula diana.

- 6.- Se sabe que la presencia de polimorfismos genéticos en los genes que codifican para CCR5 pueden modular el riesgo de infección y de la progresión de la enfermedad.

7.- Existen datos contradictorios a cerca de la influencia de estas variantes genéticas de los correceptores "menores", *CCR2* y *CX3CR1*, y sus ligandos naturales *CCL2* y *CX3CL1*, sobre el riesgo de infección por el VIH-1 y su historia natural.

8.- No hay estudios en la población española y particularmente en pacientes infectados por el VIH-1 con progresión lenta de la enfermedad que evalúen la influencia de estos polimorfismos de *CX3CR1*, *CX3CL1*, *CCR2* y *CCL2*.

Pensamos que:

Las variantes alélicas descritas en los genes que codifican para *CX3CR1*, *CX3CL1*, *CCR2* y *CCL2* pueden modificar la disponibilidad del correceptor para su uso por el VIH-1 y modular la historia natural de la infección, particularmente la de los progresores lentos.

Objetivos

Objetivo principal

Determinar si ser portador de las variantes alélicas de los receptores de quimioquinas CX3CR1 (V249I y T280M) y CCR2 (V64I) y/o de las quimioquinas correspondientes CX3CL1 (-2999T>C y -3042T>C) y CCL2 (-2518A>G) modulan el riesgo de infección por el VIH-1 y/o alteran la historia natural de la infección por el VIH-1, particularmente en los progresores lentos, en una cohorte de pacientes blancos españoles.

Objetivos secundarios

- 1.- Determinar la frecuencia alélica y las distribuciones genotípicas de los polimorfismos genéticos estudiados en una población española de origen caucásico.
- 2.- Evaluar la existencia de determinados haplotipos o genotipos que se transmiten en desequilibrio de ligamiento, así como, su influencia en la historia natural de la infección.
- 3.- Determinar la prevalencia y el efecto de la mutación CCR5 Δ 32

4. METODOLOGÍA

4.1.- Diseño de los estudios

Se trata de estudios transversales, multicéntricos de asociación genética de casos y controles.

4.2.- Pacientes estudiados

Todos los pacientes y los controles son españoles, mayores de 18 años y firmaron un consentimiento informado escrito según las normas del Comité Ético del hospital en el que son atendidos. Se excluyeron del estudio los inmigrantes de otros países, incluidos países europeos, así como sus descendientes. Los grupos de personas estudiadas fueron: no progresores o progresores lentos, expuestos no infectados, progresores típicos y controles no infectados.

4.2.1.- Pacientes.

Los pacientes se reclutaron de 7 centros participantes en este proyecto: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Hospital General de Granollers, Hospital del Mar de Barcelona, Hospital Clínic Universitari de Barcelona, Hospital Mutua de Terrassa, Hospital Universitari Sant Joan de Reus y Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII.

Se han estudiado 2 grupos de pacientes infectados por el VIH-1, cuyos criterios y categorías se detallan a continuación:

- **Progresores lentos o no progresores (LTNP):** Pacientes asintomáticos infectados por el VIH-1 desde hace más de 15 años que, en ausencia de tratamiento antirretroviral, mantienen una cifra de linfocitos CD4+ persistentemente por encima de 500 cel/ μ l y una carga viral plasmática del VIH-1 repetidamente menor de 5000 copias/ml. Dentro de este grupo se categorizaron también los controladores de élite o naturales⁹⁸⁻¹⁰², que se definieron como aquellos pacientes que a lo largo de la infección nunca han presentado una carga viral por encima de los límites de la detectabilidad utilizados en la práctica clínica (50 copias / ml).
- **Progresores típicos:** Pacientes con infección por el VIH-1 que han progresado a enfermedad avanzada, usualmente con la aparición de alguna condición definitoria de categoría C de acuerdo con los criterios de la clasificación de 1993 del CDC (Center for Disease Control and Prevention), con carga viral plasmática por encima de 35.000 copias /ml y una progresiva disminución de los linfocitos CD4+ con cifras inferiores a 350 cel/ μ l al menos en una ocasión durante los primeros 10 años de la infección.

En los pacientes en los que la fecha de la infección era desconocida se asumió como fecha de infección probable la intermedia entre la última fecha con serología negativa y la primera positiva¹⁴⁵.

4.2.2.-Expuestos no infectados

Personas con factores de riesgo para contraer la infección por el VIH-1 que han estado expuestas al virus de forma repetida y que no se han infectado. Dentro de este grupo se diferencian 2 subgrupos según el factor de riesgo para la adquisición de la infección:

- Expuestos vía parenteral: hemofílicos expuestos a concentrados de factores sin inactivación viral antes de 1986 no infectados por el VIH-1.
- Expuestos vía sexual: personas que han estado repetidamente expuestas al virus mediante la práctica de relaciones sexuales no protegidas con personas infectadas por el VH-1 durante los 12 meses previos al estudio, con una media de más de 600 coitos vaginales con eyaculación durante un periodo de seguimiento de 1 a 4 años.

Los criterios de no infección por el VIH en los sujetos repetidamente expuestos no infectados fueron la constancia de un enzimoimunoanálisis (ELISA) para VIH-1 negativo y carga viral plasmática del VIH-1 negativa en al menos 2 ocasiones en un intervalo de 6 meses.

4.2.3.- Controles sanos.

Los controles sanos provenían de un único centro (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII). Se trata de un grupo constituido por donantes voluntarios de sangre y personal sanitario.

4.3.- Variables del estudio

- a) Datos clínicos. Se realizó una historia completa a cada paciente, con anotación de la fecha de infección segura o probable y de la presencia o no de enfermedades oportunistas.

- b) Estudios de laboratorio
 - b.1) Carga viral plasmática del VIH-1.
 - b.2) Recuento de linfocitos CD4+
 - b.3) Análisis de los SNPs V249I (G>A) y T280M (C>T) en el gen CX3CR1
 - b.4) Análisis de los SNPs -2999T>C y -3042T>C en el gen CX3CL1
 - b.5) Análisis del SNP V64I (G>A) en el gen CCR2
 - b.6) Análisis del (SNP)) 2518 (A>G) en el gen CCL2
 - b.7) Análisis de la delección CCR5Δ32 en el gen CCR5

4.4.- Recogida de muestras

4.4.1.- Obtención de sangre y plasma

Tras un mínimo de 12 horas de ayuno, se extrajeron de la vena antecubital 2 tubos de 5 ml de sangre con EDTA (1mg/ml) como anticoagulante. Inmediatamente después de la extracción, un tubo de 5 ml se destinó a la determinación de linfocitos CD4+ . El segundo tubo se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos a 4°C, se separó el plasma en alícuotas, y se guardaron congeladas a -80° C hasta el momento de su procesamiento

para la determinación de la carga viral. El resto de la muestra se utilizó para la extracción de ADN.

4.4.2. - Extracción de ADN

Se obtuvo a partir de 500 µl de sangre total. Se extrajo el ADN de manera automática mediante el extractor *MagNa Pure LC Instrument* (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). El ADN se cuantificó por espectrofotometría. Las muestras de ADN se almacenaron a -80 C hasta su procesamiento para la determinación de los polimorfismos en los genes estudiados.

4.5. - Metodología de laboratorio

Carga viral del VIH:

La carga viral en plasma se determinó mediante el test de cuantificación *Cobas Amplicor HIV-1 Monitor test Ultra Sensitive* (Roche Diagnostics) y se utiliza el sistema *COBAS AMPLICOR versión 1.5* (Roche Diagnostics) para su análisis. El protocolo que se siguió fue el recomendado por el fabricante.

Determinación de linfocitos CD4+:

Las células se analizaron mediante un panel de anticuerpos monoclonales con tres marcadores por tubo y conjugados con fluorescein-isotiocinato (FITC), ficoeritrina (PE) y para CP (Tri Test CD4/CD8/CD3 en tubos trucount). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo *FAC Scan* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA). Para la adquisición y análisis de datos se utilizó el programa *Multiset* (Becton Dickinson).

Análisis de los polimorfismos V249I (G>A) y T280M (C>T) en el gen del quimiorreceptor

CX3CR1:

Los SNP V249I (G>A) y T280M (C>T) del quimiorreceptor CX3CR1 se analizaron conjuntamente mediante la amplificación de un fragmento de 300 pb por PCR y posterior secuenciación automática. Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando los cebadores específicos siguientes: cebador con sentido 5' CAG AAT CAT CCA GAC GCT GT 3' y antisentido 5' AGG CAT TTC CCA TAC AGG TG 3' (número de acceso GenBank BC028078.1). La PCR se realizó en un volumen de 50 µL, que contenía: 100 ng de ADN, 0.2mM de dNTP, 0.2µM de cada cebador, 3 mM de MgCl₂ y 1 U de Taq DNA polimerasa (GeneCraft, Lüdinghausen, Alemania). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR y se diluyeron en solución de formamida y después de una desnatularización a 95° durante 5 minutos las muestras se analizaban por secuenciación automática en un secuenciador "ABI PRISM 310 DNA sequence analyser" Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

Análisis de los polimorfismos -2999T>C y -3042T>C de la región 3' no traducida (3'UTR)

del gen de la quimioquina CX3CL1:

Se estudiaron mediante la amplificación de un fragmento de 242 pb y la posterior secuenciación automática por PCR. Los cebadores de la secuencia GenBank BC001163.1 eran los siguientes: 5' GGT GTG GCG CAG CAT ATT 3' y 5' ATC CTT GTC CAT GTC CTG CT3'. La PCR se realizó en un volumen de 50 µL, que contenía 100 ng de ADN, 0,2mM dNTPs (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania), 0.2 µM de cada cebador (Sigma, Chemical Co., St Louis, Missouri, USA), 3 Mm MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerasa (GeneCraft GmbH, Lüdinghausen, Alemania). Los productos de la PCR eran visualizados en un gel de agarosa al 2 %. Los fragmentos de ADN fueron purificados con el Kit

QIAquick PCR purification (QIAGEN GmbH, Germany) y secuenciados utilizando ambos cebadores en un analizador ABI PRISM310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, estados Unidos).

Análisis de la mutación V64I (G>A) en el gen del quimiorreceptor CCR2:

El SNP V64I (G>A) en el gen del CCR2 se analiza mediante la amplificación de un fragmento de 234 pares de bases (pb) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación automática. Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando los cebadores específicos siguientes: cebador con sentido 5' TTA CGG TGC TCC CTG TCA TA 3', y cebador antisentido 5' TCA TTT GCA GCA GAG TGA GC 3' (número de acceso de GenBank AF545480). La PCR se realizó con un volumen de 50 µL con 100 ng de ADN, 0.2 mM de deoxinucleosido trifosfato (dNTP), 0.2 µM de cada cebador, 2 mM de MgCl₂ y 1 U de Taq DNA polimerasa (GeneCraft, Lüdinghausen, Alemania). Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% por electroforesis. Los productos amplificados se diluyeron en solución de formamida y después de una desnatularización a 95° durante 5 minutos las muestras se analizaron por secuenciación automática en un secuenciador ABI PRISM 310 DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

Análisis del polimorfismo en la posición -2518 (A>G) en el gen de la quimioquina CCL2:

El SNP -2518(A>G) se analizó mediante fragmentos de restricción de longitud polimórfica ("RFLP") y se siguió la metodología siguiente: se realizó una PCR con los cebadores con sentido 5' CCA GCC AAA TGC ATT CTC TT 3' y antisentido 5' CTT TGC TGG CTG AGT GTT 3' (número de acceso de GenBank AY357296). La PCR se realizó en un volumen de 50 µL, que contenía: 100ng de ADN, 0.2mM de dNTP, 0.2µM de cada

cebador, 2 mM de MgCl₂ y 1 U de Taq DNA polimerasa (GeneCraft, Lüdinghausen, Alemania). El producto de la amplificación de 322 bp se digirió a 37°C de 4 a 6 horas con la enzima de restricción Pvu II (New England Biolabs, Ipswich, MA, Estados Unidos) y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Los fragmentos amplificados correspondían a un fragmento de 322 pb correspondiente al alelo A (ausencia del sitio de restricción) y dos fragmentos de 152 pb y 170 pb correspondientes al alelo G.

Determinación del polimorfismo CCR5Δ32 del quimiorreceptor CCR5:

Se trata de una delección de 32 pb. Se determinó mediante análisis de fragmentos con el programa GeneScand y el secuenciador automático ABI PRISM310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). La PCR utiliza los cebadores con sentido 5' CGT CTC TCC CAG GAA TCA TC 3' y antisentido 5' TTC CCG AGT AGC AGA TGA CC 3' (número de acceso de Genbank AF031237.1). Los productos de la PCR se visualizaban en un gel de agarosa al 2.5%. Los fragmentos amplificados se comprobaron con un marcador interno de 500 pb y se obtenía un fragmento de 174 pb para el alelo salvaje y un fragmento de 142 pb para el alelo mutado.

4.6.- Recogida de datos

Las variables clínicas y analíticas se recogieron en cuestionarios estandarizados y se creó una base de datos con el sistema informático SPSS/PC+ (versión 12.0 para Windows; SPSS, Chicago, IL)

7.- Análisis estadístico:

Se realizó una descripción inicial de las variables con la media +/- desviación estándar o mediana (rango) para las distribuciones no paramétricas. Las diferencias en niveles entre grupos (carga viral plasmática, etc..) se compararon usando el test de la T de Student, el test de la U de Mann-Whitney o ANOVA cuando fue necesario. Las frecuencias de genotipos y alelos en los distintos grupos se compararon mediante el test de la χ^2 o el test exacto de Fisher cuando así se requirió y se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. El equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó mediante el test de la χ^2 goodnes-of-fit. Para evaluar la asociación entre los distintos genotipos y alelos entre las diferentes categorías de pacientes definidas se calcularon la odds-ratio y el intervalo de confianza al 95%.

Se utilizó el programa informático SSPS versión 12.0 para Windows.

5. ESTUDIOS

5.1.- Estudio 1

“Los pacientes españoles infectados por el VIH-1 no progresores en más de 15 años tienen una frecuencia aumentada de la variante alélica 249I del CX3CR1”

Spanish HIV-1-Infected Long-Term Non-Progressors of More Than 15 Years Have an Increased Frequency of the CX3CR1 249I Variant Allele.

Francesc Vidal, MD, PhD, Consuelo Viladés, MD, Pere Domingo, MD, PhD, Montserrat Broch, PhD, Enric Pedrol, MD, PhD, David Dalmau, MD, PhD, Hernando Knobel, MD, PhD, Joaquim Peraire, MD, Cristina Gutierrez, PhD, M^a Antonia Sambeat, MD, PhD, Angels Fontanet, Elisabeth Deig, MD, Mireia Cairó, MD, Milagros Montero, MD, Cristobal Richart, MD, PhD, and Simon Mallal MD, PhD on behalf of the Chemokines LTNP Study Group.

J Acquir Immune Defic Syndr 2005; 40 (5): 527-531

Factor de impacto: 4.412 (9/50 Enfermedades Infecciosas, 1^{er} cuartil)

Este estudio fue financiado por la Fundación La Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, 02/1834), la Red Española de Investigación en SIDA (RIS 603/173) y el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 02/1282).

Este trabajo en parte fue presentado en parte en el 45th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Washington, DC; Diciembre 2005. Abstract: ICAAC05-A-1860-ASM.

BASIC SCIENCE

Spanish HIV-1–Infected Long-Term Nonprogressors of More Than 15 Years Have an Increased Frequency of the CX3CR1 249I Variant Allele

Francesc Vidal, MD, PhD,* Consuelo Viladés, MD,* Pere Domingo, MD, PhD,†
Montserrat Broch, PhD,* Enric Pedrol, MD, PhD,‡ David Dalmau, MD, PhD,§
Hernando Knobel, MD, PhD,|| Joaquim Peraire, MD,* Cristina Gutiérrez, PhD,*
Ma Antònia Sambeat, MD, PhD,† Àngels Fontanet,† Elisabeth Deig, MD,‡ Mireia Cairó, MD,§
Milagros Montero, MD,|| Cristóbal Richart, MD, PhD,* and Simon Mallal, MD, PhD¶
on behalf of the Chemokines LTNP Study Group

Background and Objectives: The influence of the polymorphisms of the *CX3CR1* chemokine receptor gene on the natural history of HIV-1 infection is controversial. This study aimed to determine whether functionally active *CX3CR1* genetic variants are associated with long-term nonprogressive infection of >15 years in HIV-1–infected Spanish patients.

Patients and Methods: Two single-nucleotide polymorphisms, V249I (G > A) and T280M (C > T), of the *CX3CR1* gene were assessed in 271 Spaniards. These included 60 HIV-1–infected patients who were long-term nonprogressors (LTNPs) of >15 years, 109 HIV-1–infected patients who were usual progressors (UPs), and 102 control subjects. The *CCR5Δ32* was also assessed. Genotyping was performed using polymerase chain reaction and automatic sequencing analysis methods on white cell DNA. Genotype and allele frequencies were compared by the χ^2 test and the Fisher exact test.

Results: The frequencies of the 249I variant allele were 42% for LTNPs, 24.5% for UPs, and 35% for healthy controls; the differences between LTNPs and UPs were significant (odds ratio 0.46; 95% CI: 0.27 to 0.75; $P = 0.0017$). For 280M the distribution was 16% for LTNPs, 14% for UPs, and 17% for healthy controls ($P = \text{NS}$). The

haplotype 249I280T was significantly more common in LTNPs than in UPs ($P = 0.0007$). These results persisted after excluding from the analysis the individuals carrying the *CCR5Δ32*.

Conclusions: *CX3CR1* 249I variant allele is more frequent in Spanish HIV-1–infected LTNPs of >15 years. This effect is independent of the presence of the *CCR5Δ32* allele.

Key Words: AIDS, HIV-1 infection, long-term nonprogressors, *CX3CR1*, chemokines, chemokine receptor, *CCR5*

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:527–531)

A striking feature in HIV-1 infection is that the natural evolution varies broadly among infected patients. To test the hypothesis that disease progression may be genetically determined, attention has recently been paid to diverse host-cell proteins that are used by HIV-1 to perpetuate infection. Among these, genetic variants of the chemokine receptors used by HIV-1 to enter the target cells such as *CCR5*, *CXCR4*, and *CCR2* have been investigated.^{1–6}

CX3CR1, a leukocyte chemotactic and adhesion receptor for the human chemokine fractalkine, is also used by some HIV-1 strains as a coreceptor.⁷ Two common and functional single-nucleotide polymorphisms within the human *CX3CR1* gene have been reported: a G to A nucleotide substitution, which translates isoleucine instead of valine at the position 249 (V249I), and a C to T nucleotide substitution, which translates methionine instead of threonine at the position 280 (T280M).⁸ Information about the impact of these single-nucleotide polymorphisms on the natural history of HIV-1 infection is discordant, and reasons for discrepancy should be sought mainly in the different ethnic origins, definitions, and composition of the cohorts studied.^{8–14} Noteworthy is that most reports^{8–11} have studied these allelic variants in rapid progressors and typical (or usual) progressors (UPs), rather than in true long-term nonprogressors (LTNPs). In this study we aimed to evaluate whether *CX3CR1* genetic variants were associated with LTNP infection of >15 years' duration in a cohort of Spanish HIV-1–infected patients.

Received for publication April 14, 2005; accepted September 2, 2005.

From the *Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Catalonia, Spain; †Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; ‡Hospital General de Granollers, Spain; §Fundació per a la Recerca, Hospital Múnia de Terrassa, Universitat de Barcelona, Spain; ¶Hospital del Mar de Barcelona, Spain; and ¶Royal Perth Hospital and Murdoch University, Perth, Western Australia.

See appendix for the Chemokines and LTNP Study Group members.

Funded by The Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, 02/1834); the Spanish AIDS Research Network (RIS G03/173); and the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 02/1282).

This work was presented in part at the 45th annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Washington, DC; December 16–19, 2005; abstract no. ICAAC05-A-1860-ASM.

Reprints: Francesc Vidal, Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili Mallfré Guasch, 4 43007 Tarragona, Catalonia, Spain (e-mail: fvidal@comt.es).

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

PATIENTS AND METHODS

Design and Setting

This was a multicenter observational case-control study. All subjects were recruited from a prospectively collected cohort of almost 3000 HIV-1-infected patients treated at the HIV outpatient clinics of the 5 participating hospitals. These hospitals are located in Catalonia in the northeast of Spain in a geographical area <100 km in diameter and they treat a homogeneous population.

Population

Two subsets of HIV-1-infected patients were studied: LTNPs and UPs. Criteria for LTNP were as follows: asymptomatic HIV-1 infection known to be of >15 years' duration; in the absence of any antiretroviral treatment, a stable CD4⁺ cell count persistently >500 cells/ μ L; and a plasma HIV-1 viral load repeatedly <5000 copies/mL.¹⁵ Patients were categorized as UPs if HIV-1 infection had progressed to advanced disease, ie, the appearance of class C HIV-1 disease, according to the 1993 Centers for Disease Control criteria,¹⁶ and had plasma HIV-1 viral load >35,000 copies/mL and a CD4⁺ cell count that declined over time and that was <350 cells/ μ L at least once in the first 10 years of infection. For a few patients whose date of infection was not available, this was assumed to be the midpoint between the first positive and the last negative HIV-1 blood test.¹⁷ As a control group we also studied a sample of healthy subjects recruited from blood donors. All subjects in our study were white Spaniards. Immigrants from other countries, including those from other European countries, and their descendants were excluded. Informed oral consent was obtained from each participant. The project was approved by local ethical research committees.

Samples

Blood, DNA, and Plasma

Blood samples with ethylenediamine tetra-acetic acid were obtained from an antecubital vein. Five milliliters of whole blood was used to determine CD4⁺ cell count, and 500 μ L was used for DNA isolation by a MagNa Pure LC Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Plasma for determining HIV-1 viral load was obtained by centrifugation at 3500 g, for 15 minutes at 4°C.

Laboratory Methods

CX3CR1 Genotypes

The *CX3CR1* V249I and T280M mutations were studied by polymerase chain reaction and sequencing analysis.⁸ Amplification reactions were performed with the following primers: primer forward 5' CAGAATCATCCAGACGCTGT3' and primer reverse 5' AGGCATTTCCCATACAGGTG3' (Genbank Accession number: BC028078.1) and under the following conditions: in a final volume of 50 μ L with 0.2 mM of deoxyribonucleoside triphosphate, 0.2 μ M of primers, 3 mM MgCl₂, and 1 unit of Taq DNA polymerase (GeneCRAFT, Lüdinghausen, Germany). The program was as follows: 30 cycles of 30 seconds of denaturation at 94°C, 30 seconds of annealing at 60°C, and 30 seconds of extension at 72°C. Polymerase chain reaction products of 300 bp were electrophoresed

on a 2% agarose gel. The amplified products were diluted in formamide solution, denaturated at 95°C for 5 minutes, and analyzed by automatic sequencing in an ABI PRISM 310 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

HIV-1 Infection-Related Parameters and *CCR5* Δ 32 Mutation

HIV-1 infection, plasma HIV-1 viral load, blood CD4⁺ cell count, and *CCR5* Δ 32 were assessed as previously described.¹⁸

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS/PC+ statistical package (v. 12.0 for Windows; Chicago, IL). Descriptive data are expressed as mean \pm SD or median (range) for nonparametric distributions. Differences in levels between groups were compared using a Student *t* test, Mann-Whitney *U* test, or analysis of variance when necessary. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by the χ^2 goodness-of-fit test. Genotype and allele frequencies in the different groups were compared by the χ^2 test or Fisher exact test when necessary. A *P* value of <0.05 was considered significant. For multiple comparisons of allelic frequencies, the Bonferroni correction was used and the calculated level of significance was a *P* value \leq 0.003.

RESULTS

A total of 271 individuals were studied: 169 HIV-1-infected patients and 102 healthy controls. All subjects were white Spaniards. Of these patients, 60 were LTNPs and 109 UPs. Most (>90%) of the latter had progressed to advanced infection and were receiving antiretroviral drugs. The age, gender, and risk factors of LTNPs and UPs for acquiring HIV-1 were similar. Table 1 shows the characteristics and main data on the population studied. As expected by the case definition of LTNPs and UPs, they differed in duration of infection, CD4⁺ cell count, and plasma viral load.

CX3CR1 Gene Polymorphisms

Table 2 shows the genotype distribution and allele frequencies in the *CX3CR1* gene at the positions V249I and T280M for the groups defined. The genotype distribution in the population studied fits the expected Hardy-Weinberg equilibrium.

No significant differences were detected in the genotype distribution and allele frequencies of the 280M variant between the 3 groups defined. With respect to 249I, no differences were observed between healthy controls and HIV-1-infected subjects taken as a whole (*P* = NS). However, there were significant differences in the *CX3CR1* V249I genotype distribution (*P* = 0.007) and allele frequencies (*P* = 0.0017) between UPs and LTNPs, which showed that the mutated allele A (249I) was more frequent in the LTNP subset (odds ratio: 0.46; 95% CI: 0.27 to 0.75). This was maintained after excluding the 45 individuals heterozygous for *CCR5* Δ 32.

The analysis of extended genotypes of the 2 *CX3CR1* polymorphisms showed no differences in the whole distribution between healthy controls and HIV-1-infected subjects. However, in the infected cohort, there were significant

J Acquir Immune Defic Syndr • Volume 40, Number 5, December 15 2005 *CX3CR1 249I Variant Allele in Long-Term Nonprogressors*

TABLE 1. Demographic and Clinical Characteristics of the Population Analyzed

Variable	HIV-1 LTNP (n = 60)	HIV-1 UP (n = 109)	Controls (n = 102)	P
Male (%)	37 (62)	78 (71.5)	73 (72)	NS
Age (years) (mean ± SD)	40.3 ± 7.4	41.8 ± 8.9	44.6 ± 10.1	0.04
Duration of HIV-1 infection in years (mean ± SD)	17.3 ± 1.8	6.7 ± 2.7	—	<0.0001
Years from first time documented HIV infection to treatment (mean ± SD)	—	4.8 ± 1.3	—	
Plasma HIV RNA (copies/mL) (mean and range)	899 (<50 to 4800*)	11,808 (<50 to >750,000)	—	<0.0001
CD4 ⁺ cell count (cells/μL) (mean and range)	757 (503–2080)	478 (6–1404)	—	<0.0001
Risk factor for HIV				
Injection drug users	41 (70.7%)	74 (67.9%)	—	NS
Homosexual	5 (8.3%)	9 (8.3%)	—	NS
Heterosexual	10 (16.7%)	19 (17.4%)	—	NS
Other	4 (6.9%)	7 (6.4%)	—	NS

*<50 was arbitrarily counted as 49.

Most UPs (>90%) were receiving highly active antiretroviral therapy. The high upper range of CD4⁺ cell count and the low lower range of plasma viral load in UPs represent the effect of antiretroviral treatment.

differences between UPs and LNTPs due to an increase in the genotypes carrying the A allele in the LNTP subset ($P = 0.01$; Table 3). Likewise the observed haplotypes revealed a predominance of the 249I280T in the LNTP group ($P = 0.0007$; Table 3). This was maintained when the individuals carrying the *CCR5Δ32* mutation were excluded. The haplotypes detected also revealed that the 280M mutation was always associated with 249I polymorphism.

CCR5Δ32

Table 2 shows that there were no significant differences in *CCR5* genotype distribution and allele frequencies between the different groups. *CCR5Δ32* homozygosity was not observed.

DISCUSSION

In this study we have observed that Spanish LNTPs have an increased frequency of the *CX3CR1* 249I variant allele. No relation was established between the 280M variant allele and LNTPs. The haplotype 249I280T was also significantly associated with LNTP, and this did not depend on the presence of the *CCR5Δ32* allele. Neither the 249I nor the 280M allele influenced the risk of infection. Additionally, our data confirm a close linkage disequilibrium between 249I and 280M.¹⁹ The 280M mutation is always inherited with the 249I variant allele, whereas 249I can occur as an isolated polymorphism.

Our results therefore suggest that the *CX3CR1* 249I allele has a modulator effect over the disease. The higher

TABLE 2. *CX3CR1* Genotype and Allele Frequencies in the Groups Analyzed

Genotype and Allele Frequencies	All		P	HIV-1 Infected		P
	Controls (n = 102)	HIV-1 Infected (n = 169)		HIV-1–Infected UPs (n = 109)	HIV-1–Infected LNTPs (n = 60)	
<i>CX3CR1</i>						
V249I (G > A)						
GG	44 (43%)	84 (50%)		63 (58%)	21 (35%)	
GA	45 (44%)	65 (39%)	NS	37 (34%)	28 (47%)	0.007
AA	13 (13%)	19 (11%)		8 (8%)	11 (18%)	
Mutated allele A	71 (35%)	103 (30.5%)	NS	53 (24.5%)	50 (42%)	0.0017*
<i>CX3CR1</i>						
T280M (C > T)						
CC	68 (67%)	122 (73%)		79 (73%)	43 (72%)	
CT	33 (32%)	42 (25%)	NS	27 (25%)	15 (25%)	NS
TT	1 (1%)	4 (2%)		2 (2%)	2 (3%)	
Mutated allele T	35 (17%)	50 (15%)	NS	31 (14%)	19 (16%)	NS
<i>CCR5†</i>						
wt/wt	87 (87%)	135 (81%)	NS	88 (81%)	47 (81%)	NS
wt/Δ32	13 (13%)	32 (19%)		21 (19%)	11 (19%)	
Δ32	13 (6.5%)	32 (10%)	NS	21 (10%)	11 (9.5%)	NS

*Odds ratio: 0.46 (95% CI: 0.27 to 0.75).

†wt/wt: wild-type homozygotes; wt/Δ32: Δ32 heterozygotes.

DNA of some patients could not be amplified (1 for *CX3CR1* and 2 for *CCR5*).

TABLE 3. CX3CR1 V249I and T280M Genotypes and Haplotypes

Genotype	V249I	T280M	All		P	HIV-1		P
			Controls (n = 102)	HIV-1 (n = 169)		HIV-1 UPs (n = 109)	HIV-1 LTNP (n = 60)	
1	GG	CC	44 (43.1%)	84 (49.7%)	NS	63 (58.3%)	21 (35%)	0.01
2	AA	CC	1 (1%)	6 (3.6%)		2 (1.9%)	4 (6.7%)	
3	AA	TT	1 (1%)	4 (2.4%)		2 (1.9%)	2 (3.3%)	
4	AA	CT	11 (10.8%)	9 (5.4%)		4 (3.7%)	5 (8.3%)	
5	GA	CC	23 (22.5%)	35 (20.8%)		16 (14.8%)	19 (31.7%)	
6	GA	CT	22 (21.6%)	30 (17.9%)		21 (19.4%)	9 (15%)	
Haplotype								
V249T280	G	C	133 (65.2%)	233 (69.3%)	NS	163 (75.5%)	70 (58.3%)	0.007
I249T280	A	C	36 (17.6%)	56 (16.7%)		24 (11.1%)	32 (26.7%)	
I249M280	A	T	35 (17.2%)	47 (14.0%)		29 (13.4)	18 (15%)	

prevalence of this mutant allele in LTNP could represent a protective factor over disease progression because a more rapid immunologic slope was detected in the group that we have called UPs, in whom this allele was underrepresented. It is difficult to assign just a protective or a deleterious role for this genetic marker, because the genotypic distribution in both UPs and LTNP had no differences compared with the healthy population. In this sense, the A mutated allele was significantly lower in UPs compared with healthy subjects (Table 2), but when genotypic combination of 249I and 280M was analyzed, a clear increase in the genotype 5 including the A allele was observed in LTNP with respect to healthy controls (Table 3). Moreover, no clear differences were observed in haplotype combinations for both HIV-1 cohorts and healthy controls (Table 3).

These new findings are in contrast with some previous published reports. Thus, in the French cohorts, patients homozygous for the 249I280M haplotype had a trend to more rapid progression toward AIDS and death than patients with the wild-type alleles or those who were heterozygous.⁸ In further studies in 3 North American cohorts, this accelerating effect in mutant homozygotes was not found, but heterozygosity was associated with a weak delay in developing AIDS and death.⁹ An absence of effect of the 280M genetic variant on disease progression among infected subjects, as is observed in our study, has also been reported in 2 studies from French¹⁰ and Dutch¹² cohorts. There are some possible explanations for this apparently discordant data. First, in the Spanish population analyzed here, the genotype distribution of the CX3CR1 V249I allele differs from that reported for other whites.⁸ It is difficult to explain the higher 249I frequency in our population, but it perhaps reflects genuine genetic diversity due to migration patterns and the occupation of Spain historically by eastern populations. Second, the characteristics of the cohorts evaluated largely differ among studies because the mean duration of HIV-1 infection of our LTNP subjects was much longer (>15 years) than that of the French *Asymptomatiques à Long Terme* (ALT)⁸ and Genetic Resistance to HIV (GRIV)¹⁴ cohorts, whose average duration of HIV-1 infection was markedly lower (8 years). These more strict phenotypic criteria in the selection of the nonprogressor patients may have facilitated the finding of differences in CX3CR1 polymorphisms

between both HIV-1 subsets presented here. The low number of subjects homozygous for this mutation in our study does not permit us to discard an implication of this allele in the progression of the disease, in agreement with findings reported by Kwa et al.¹² However, the similar distribution of extended genotypes in UPs and in LTNP allowed us to think that the allelic influence of the 280M variant on disease progression must be low, if any.

In summary, our results suggest that CX3CR1 V249I polymorphism partly explains the diversity of HIV-1 disease progression among individuals. Further studies are needed to reproduce and validate these data in larger cohorts of well-defined UP and LTNP HIV-1-infected patients. If so, our results would then provide an insight for continued investigation of this chemokine receptor as a possible target for future antiretroviral drugs.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. M. Olona for her help in epidemiologic and statistical assessment.

REFERENCES

- McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard PF, et al. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. *Lancet*. 1998;352:866-870.
- Cohen O, Paolucci S, Bende SM, et al. CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5. *J Virol*. 1998;72:6215-6217.
- Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part II: Genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med*. 2001;134:978-996.
- Ioannidis JPA, Rosenberg PS, Goedert JJ, et al. Effects of CCR5, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles of HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med*. 2001;135:782-795.
- Tang J, Kaslow RA. The impact of host genetics on HIV infection and disease progression in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2003;17(Suppl 1):S51-S60.
- Nolan D, Gaudieri S, John M, et al. Impact of host genetics on HIV-disease progression and treatment: new conflicts on an ancient battleground. *AIDS*. 2004;18:1231-1240.
- Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, et al. Identification of CX3CR1: a chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV. *J Biol Chem*. 1998;273:23799-23804.

J Acquir Immune Defic Syndr • Volume 40, Number 5, December 15 2005 CX3CR1 249I Variant Allele in Long-Term Nonprogressors

8. Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*. 2000;287:2274-2277.
9. McDermott DH, Colla JS, Kleeberg CA, et al. Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease. *Science*. 2000;290:2031a.
10. Hendel H, Winkler C, An P, et al. Validation of genetic case-control studies in AIDS and application to the CX3CR1 polymorphism. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;26:507-511.
11. Faure S, Meyer L, Genin E, et al. Deleterious genetic influence of CX3CR1 genotypes in HIV disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;32:335-337.
12. Kwa D, Boeser-Nunnink B, Schuitemaker H. Lack of evidence for an association between a polymorphism in CX3CR1 and the clinical course of HIV infection or virus phenotype evolution. *AIDS*. 2003;17:759-761.
13. Liu MX, Wang FS, Hong WG, et al. Distribution of HIV-1 coreceptor CX3CR1 allelic polymorphisms in general population, HIV-1 high-risk group and HIV carriers of Chinese indigenous Han and Uygur people. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2003;24:595-598.
14. Puissant B, Abbal M, Blancher A. Polymorphism of human and primate RANTES, CX3CR1, CCR2 and CXCR4 genes with regard to HIV/SIV infection. *Immunogenetics*. 2003;55:275-283.
15. Mikhail M, Wang B, Saksena NK. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev* 2003;5:230-244.
16. Castro KG, Ward JW, Slutsker L, et al. CDC 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992;41(RR-17):1-20.
17. McDermott D, Beecroft MJ, Kleeberger CA, et al. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2000;14:821-826.
18. Vidal F, Peraire J, Domingo P, et al. Lack of association of SDF-1 3'A variant allele with long-term non-progressive HIV-1 infection is extended beyond 16 years. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 (In press).
19. DeVries MD, Cao H, Wang J, et al. Genomic organization and evolution of the CX3CR1/CCR8 chemokine receptor locus. *J Biol Chem*. 2003;278:11985-11994.

APPENDIX

The members of the Chemokines & LTNP Study Group and coauthors of the paper are: Francesc Vidal, Consuelo Viladés, Joaquim Peraire, Montserrat Broch, Cristina Gutiérrez, Miguel López, Sergi Veloso, María Saumoy, Montserrat Olona, Cristóbal Richart (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain); Pere Domingo, Ma Antonia Sambeat, Angels Fontanet, Josep Cadafalch, Montserrat Fuster (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain); Enric Pedrol, Elisabeth Deig, Anna Soler (Unitat d'Infeccions-VIH, Hospital General de Granollers, Observatori de la Salut Dr. Carles Vallbona, Granollers, Spain); David Dalmau, Anna Ochoa, Mireia Cairó (HIV Unit, Infectious Diseases Service, Fundacio per a la Recerca, Hospital Mútua de Terrassa, Universitat de Barcelona, Spain); Hernando Knobel, Milagros Montero, Ana Guelar (Hospital del Mar, Barcelona, Spain); Judit González (Pius Hospital, Valls, Spain); Simon Mallal (Royal Perth Hospital and Murdoch University, Perth, Western Australia).

5.2.- Estudio 2

"Polimorfismos en la región 3' no traducida del gen de la fractalkina y el riesgo de infección por el VIH-1 y de progresión de la enfermedad".

Polymorphisms in the 3' untranslated region of the *fractalkina* (CX3CL1) gene and the risk of the HIV-1 infection and disease progression.

Joaquim Peraire, Francesc Vidal, Montserrat Plana, Pere Domingo, Blai Coll, Consuelo Viladés, Felipe Garcia, Sergi Veloso, Josep M^a Gatell and Montserrat Broch.

AIDS 2007 ; 21 (7) : 891-893

Factor de impacto : 5.846 (4/50 Enfermedades Infecciosas, 1^{er} cuartil)

Este estudio ha sido financiado por la Fundación La Marató de TV3 (02/1830), la Red Española de Investigación en SIDA (RIS G03/173) y el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 04/1752, 05/1501, 05/1591 y 07/0976).

Parte de este trabajo fue presentado en parte en la 14th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, Febrero 2007 (Abstract D-309)

Polymorphisms in the 3' untranslated region of the fractalkine (CX3CL1) gene and the risk of HIV-1 infection and disease progression

Fractalkine (CX3CL1) is the only natural ligand of the HIV-1 co-receptor CX3CR1 [1,2]. In-vitro data support a potent and specific role for CX3CL1 as a blocking factor for HIV-1 infection [3]. No reports so far have assessed whether the CX3CL1 gene is polymorphic. A search of the single nucleotide polymorphisms database from the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) identified two polymorphic sites located at the 3' untranslated region (UTR) of the gene, a T to C transition at position 2999 and a T to

C transition at position 3042. The 3' UTR of the gene is a critical region for messenger RNA stability and protein translation [4,5]. In this study we assessed whether these two CX3CL1 genetic variants influence the risk of HIV-1 infection or disease progression among infected individuals in a cohort of adult white Spaniards with CCR5Δ32 wild type.

Our study cohort consisted of 263 white Spaniards; 86 healthy controls, 31 repeatedly exposed but uninfected

Table 1. CX3CL1 genotype and allele frequencies in the groups analysed.

Genotype and allele frequencies	HC (n=86)	EU (n=31)	HIV-1 infected (n=146)	P	HIV-1 UP (n=88)	HIV-1 LTNP (n=58)	P
CX3CL1 2999 (T>C)							
TT	55 (64%)	21 (70%)	72 (52%)	0.15	45 (54%)	27 (49%)	0.81
TC	27 (31%)	7 (23%)	50 (36%)		28 (34%)	22 (40%)	
CC	4 (5%)	2 (7%)	16 (12%)		10 (12%)	6 (11%)	
Variant allele C	35 (20%)	11 (18%)	82 (30%)	0.03	48 (29%)	34 (31%)	0.70
CX3CL1 3042 (T>C)							
TT	56 (65%)	20 (67%)	67 (49%)	0.11	44 (53%)	23 (42%)	0.33
TC	25 (29%)	8 (27%)	57 (41%)		30 (36%)	27 (49%)	
CC	5 (6%)	2 (6%)	14 (10%)		9 (11%)	5 (9%)	
Variant allele C	35 (20%)	12 (20%)	85 (31%)	0.003	48 (29%)	37 (34%)	0.40

EU, Repeatedly exposed to HIV-1 but uninfected individuals; HC, healthy controls; LTNP, long-term non-progressors; UP, usual progressors. The CX3CL1 genotype distribution at positions 2999 and 3042 in control subjects fit the expected Hardy-Weinberg equilibrium. Genotype and allele numbers do not match with patients studied because DNA for CX3CL1 genotyping could not be amplified in some individuals.

individuals, and 146 HIV-1-infected patients. Of these patients, 88 were usual progressors and 58 were long-term non-progressors (LTNP) of over 16 years' duration. The details and characteristics of this cohort have been extensively described elsewhere [6,7]. The project was approved by the local ethical research committees. Five hundred microlitres of whole blood was used for genomic DNA isolation. The 3'UTR CX3CL1 single nucleotide polymorphisms mentioned above were studied by amplifying a fragment of 242 basepairs and then automatic sequencing of the polymerase chain reaction (PCR) products. Primers from the GenBank sequence BC001163.1 were as follows: 5'-GGTGTGGCGCAGCATATT-3' and 5'-ATCCTTGTCATGTCCTGCT-3'. PCR was carried out in a final volume of 50 µl, containing 100 ng DNA, 0.2 mM deoxyribonucleotide triphosphate (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 0.2 µM of each primer (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), 3 mM magnesium chloride, 1U Taq DNA polymerase (GeneCraft GmbH, Lüdinghausen, Germany). The PCR conditions were as follows: 96°C for 7 min, followed by 35 cycles each of 96°C for 30s, 58.5°C for 30s and 72°C for 30s. A final extension step was carried out at 72°C for 7 min. PCR products were visualized on 2% gel stained with ethidium bromide. Amplicons were purified using the QIAquick PCR purification kit. Purified products were automatically sequenced in both directions on an ABI PRISM 310 DNA sequence analyser and following the protocol of the Big Dye Terminator cycle sequencing kit version 3.1

subjects: $P=0.03$ for 2999C, and $P=0.003$ for 3042C. None of these allelic variants influenced disease progression because they were equally represented in both usual progressors and LTNP. These new data merit consideration, however, because the associations that we found are based only on allelwise comparisons and not on genotypewise comparisons. As pointed out elsewhere, associations based on a single contrast are less likely to be replicated in further studies than those based on more contrasts [8], therefore the data must be treated with caution. The rationale for studying CX3CL1 is that the complex chemokine-chemokine receptor is currently considered to be a functional unit, thus the ability and availability of a particular co-receptor to bind HIV-1 may be mediated by chemokine binding. In this regard our results suggest that the CX3CL1 2999C and 3042C allele may have a modulating effect on the disease, and the higher prevalence of this mutant allele in HIV-1-infected patients may be a predisposing factor to infection. These findings emphasize that the CX3CR1/CX3CL1 axis may influence HIV-1 disease transmission, as has been suggested by the finding of an increased CX3CL1 expression in several cell types in T-cell zones of lymph nodes from HIV-1-infected patients [9]. Moreover, CX3CL1 is considered to be a T helper type 1 chemokine [10,11] as well as IFN- γ , IL-1 and TNF- α . CX3CL1 therefore plays an important role in a T helper 1-type immune response as the amplification circuit of polarized T helper type 1 cells [12]. Given the minor in-vivo role of CX3CR1 in the early phases of HIV-1 infection, it seems

(Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Genotype distribution and allele frequencies in the different groups were compared using the χ^2 test or Fisher's exact test when necessary. A *P* value of less than 0.05 was considered significant. The Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by the χ^2 goodness-of-fit test.

Table 1 shows the *CX3CL1* genotype and allele distributions in the different groups. Carriage of the *CX3CL1* 2999C and 3042C variant alleles was more frequent in HIV-1-infected patients than in uninfected

plausible that the effects of *CX3CL1* on HIV-1 transmission are a result of its immune properties rather than *CX3CR1* blockade.

Acknowledgements

The members of the Chemokines and HIV Study Group and co-authors of the paper are: Francesc Vidal, Joaquim Peraire, Consuelo Viladés, Montserrat Broch, Cristina

Gutiérrez, Miguel López-Dupla, Sergi Veloso, Maria Saumoy, Montserrat Olona, Joan Josep Sirvent, Carmen Aguilar, Eva González, Cristóbal Richart (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain); Felipe Garcia, Montserrat Plana, Anna López, Teresa Gallart, Oriol Coll, Anna Suy, Meritxell Nomededeu, Mireia Arnedo, Josep M^a Gatell (Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain); Pere Domingo, Gracia Mateo, Mar Gutiérrez, M^a Antonia Sambahar, Angels Fontanet, Josep Cadafalch, Montserrat Fuster (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain); Blai Coll, Carlos Alonso-Villaverde, Sandra Parra, Lluís Masana (Hospital Universitari de Sant Joan, Reus, Spain); Jorge del Romero (Centro Sandoval, Madrid, Spain); José Ignacio Lorenzo (Hospital la Fe, Valencia, Spain); and Judit González (Pius Hospital, Valk, Spain).

Joaquim Peraire^a, Francesc Vidal^a, Montserrat Plana^b, Pere Domingo^c, Blai Coll^d, Consuelo Viladés^a, Felipe Garcia^b, Sergi Veloso^a, Josep M. Gatell^b and Montserrat Broch^a, ^aHospital Universitari Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; ^bHospital Clinic, Universitat de Barcelona, Spain; ^cHospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and ^dHospital Universitari de Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

Sponsorship: This study was funded by the Marató de TV3 (02/1830), the Spanish AIDS Research Network (RIS G03/173), and the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 04/1752, 05/1501, 05/1591 and 07/0976). M.S. was the recipient of a research grant from the Instituto de Salud Carlos III. B.C. is a recipient of a research career award from the Instituto de Salud Carlos III, Madrid. M.P. was supported by contract FIS03/00072 from the Fundació Privada Clinic per la Recerca Biomèdica in collaboration with the Spanish Health Department. F.G. was the recipient of a grant from the IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona.

Part of this work was presented at the 14th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, February 2007 [Abstract D-309].

J.P., F.V. and M.B. contributed equally to this work.

Received: 15 December 2006; revised: 20 January 2007; accepted: 30 January 2007.

References

1. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385:640-644.
2. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, et al. Neurotactin, a membrane anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 1997; 387:611-617.
3. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV. *J Biol Chem* 1998; 273:23799-23804.
4. Hesketh J. 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochem Soc Translat* 2004; 32:990-993.
5. Kozak M. How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs? *Gene* 2004; 343:41-54.
6. Vidal F, Viladés C, Domingo P, Broch M, Pedrol E, Dalmau D, et al. Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the *CX3CR1* 249I variant allele. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40:527-531.
7. Viladés C, Vidal F, Plana M, Domingo P, Alonso-Villaverde C, Pedrol E, et al. Effect of genetic variants of *CCR2* and *CCL2* on the natural history of HIV-1-infection: *CCL2-2518GG* is over-represented in a cohort of Spanish HIV-1-infected subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 44:132-138.
8. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001; 29:306-309.
9. Foussat A, Bouchet-Delbos L, Berrebi D, Durand-Gasselin I, Coulomb-L'Hermine A, Krzysiek R, et al. Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients. *Blood* 2001; 98:1678-1686.
10. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic control. *J Exp Med* 1998; 188:1413-1419.
11. Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, D'Ambrosio D, Albanesi C, Stoppacciaro A, et al. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest* 2001; 107:1173-1181.
12. Zeng Y, Jiang J, Hoebner N, Wenkel J, Gaedcke G, Xiang R, et al. Fractalkine gene therapy for neuroblastoma is more effective in combination with targeted IL-2. *Cancer Lett* 2005; 228:187-193.

5.3.- Estudio 3

"Efecto de las variantes genéticas de CCR2 y CCL2 en la historia natural de la infección por VIH-1" CCL2-25186G esta sobrerrepresentado en una cohorte de pacientes españoles infectados por el VIH-1"

Effect of Genetic Variants of CCR2 and CCL2 on the Natural History of HIV-1 infection. CCL2-25186G Is Overrepresented in a Cohort of Spanish HIV-1-Infected Subjects.

Consuelo Viladés, MD, Montserrat Broch, PhD, Montserrat Plana, MD, PhD, Pere Domingo, MD, PhD, Carlos Alonso-Villaverde, MD, PhD, Enric Pedrol, MD, PhD, Hernando Knobel, MD, PhD, Davis Dalmau, MD, PhD, Joaquim Peraire, MD, PhD, Cristina Gutierrez, PhD, Anna López, M^a Antonia Sambeat, MD, PhD, Montserrat Olona, MD, Felipe Garcia, MD, PhD, Cristobal Richart, MD, PhD, Josep M^a Gatell, MD, PhD, and Francesc Vidal, MD, PhD, on behalf of the Chemokines and Long-Term Nonprogressors Study Group.

J Acquir Immune Defic Syndr 2007; 44(2): 132-138

Factor de impacto : 4.412 (9/50 Enfermedades Infecciosas, 1^{er} cuartil)

Este estudio fue financiado parcialmente por la Fundación La Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833 y 02/1834), la Red Española de Investigación en SIDA (RIS G03/173), el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 05/1501 y 05/1591).

BASIC SCIENCE

Effect of Genetic Variants of *CCR2* and *CCL2* on the Natural History of HIV-1 Infection

CCL2-2518GG Is Overrepresented in a Cohort of Spanish HIV-1-Infected Subjects

Consuelo Viladés, MD,* Montserrat Broch, PhD,* Montserrat Plana, MD, PhD,† Pere Domingo, MD, PhD,‡
Carlos Alonso-Villaverde, MD, PhD,§ Enric Pedrol, MD, PhD,|| Hernando Knobel, MD, PhD,¶
David Dalmau, MD, PhD,# Joaquim Pereira, MD,* Cristina Gutiérrez, PhD,* Anna López,†
M^a Antònia Sambeat, MD, PhD,‡ Montserrat Olona, MD,* Felipe Garcia, MD, PhD,†
Cristóbal Richart, MD, PhD,* Josep M^a Gatell, MD, PhD,† and Francesc Vidal, MD, PhD* on behalf
of the Chemokines and Long-Term Nonprogressors Study Group

Background and Objectives: Polymorphisms in the genes that encode for the *CCR2* chemokine receptor and its natural ligand *CCL2* have been shown to influence the natural history of HIV-1 infection, although data are inconsistent. Our aim was to determine whether functionally active *CCR2* and *CCL2* genetic variants influence the risk of infection and disease progression in a cohort of white Spaniards.

Patients and Methods: This was a multicenter genetic association case-control study. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs), *V64I* (G > A) of the *CCR2* gene and *-2518* (A > G) of the *CCL2* gene, were assessed in 318 individuals: 73 HIV-1-infected long-term nonprogressors (LTNPs) of >16 years duration, 109 HIV-1-infected usual progressors (UPs), 36 heavily exposed to HIV-1 but uninfected individuals (EUs), and 100 control subjects. The distribution of

the *CCR5Δ32* allele was also assessed. Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) or PCR and automatic sequencing analysis methods on white blood cell DNA. Genotype and allele frequencies were compared by the χ^2 test and the Fisher exact test.

Results: *CCR2* genotype distribution and allele frequencies showed nonsignificant differences between groups. The distribution of *CCL2* alleles showed no significant differences between groups. HIV-1-infected individuals had, however, a significantly higher prevalence of the variant homozygous *CCL2 GG* genotype compared with EUs ($P = 0.02$). This result persisted when we studied only individuals with wild-type *CCR5*. Genotype and allele distribution of *CCL2* was similar in HIV-1-infected UPs and LTNPs.

Conclusions: In our cohort of white Spaniards, homozygosity for the variant *CCL2-2518GG* genotype is overrepresented in HIV-1-infected subjects.

Key Words: AIDS, *CCL2*, *CCR2*, chemokines, chemokine receptor, HIV-1 infection, long-term nonprogressors

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;44:132–138)

The natural history of HIV-1 infection varies greatly between individuals.^{1–5} To test the hypothesis that the risk of infection and disease progression may be at least partially genetically determined, attention has recently been paid to diverse host-cell proteins that are necessarily used by HIV-1 to infect cells. Among these, genetic variants of the cellular coreceptors used by HIV-1 and their natural ligands, the chemokines, have attracted the interest of researchers because of their critical role in the process by which the virus enters into the target cells.^{6–11}

We recently studied the influence of common allelic variants of *CCR5*,¹² *RANTES*,¹² *CXCR4*,¹³ *SDF-1*,¹⁴ and *CX3CR1*¹⁵ on the natural history of HIV-1 infection in a cohort of white Spaniards. Here, we report a study into the effect of genetic variants of *CCR2* and *CCL2* (known also as monocyte

Received for publication August 7, 2006; accepted October 9, 2006.

From the *Department of Internal Medicine, Infectious Diseases and AIDS Research unit, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; †Department of Infectious Diseases, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ‡Infectious Diseases Unit, Department of Internal Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; §Department of Internal Medicine, Hospital Universitari de Sant Joan, Reus, Spain; ||Infectious Diseases-HIV unit, Hospital General de Granollers, Granollers, Spain; ¶Department of Internal Medicine and Infectious Disease, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; and #HIV Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain. Partially funded by the Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, and 02/1834), the Spanish AIDS Research Network (RIS G03/173), the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 05/1501 and 05/1591) and Fundacion para la prevencion del sida en España (FIPSE 36610/06). Maria Saumoy is the recipient of a research grant from the Instituto de Salud Carlos III. Montserrat Plana was supported by contract FIS03/00072 from the Fundació Privada Clínic per la Recerca Biomèdica in collaboration with the Spanish Health Department. Felipe Garcia was recipient of a grant from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Barcelona.

Reprints: Francesc Vidal, MD, PhD, Department of Internal Medicine, Infectious Diseases, and AIDS, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Mallafrè Guasch 4, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain (E-mail: fvidal@comt.es).

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins

chemoattract protein-1 [MCP-1]) on the risk of HIV-1 infection and disease progression. The rationale behind this study is that *CCR2* is a CC chemokine receptor that may act as an HIV-1 coreceptor.¹⁶ A common single nucleotide polymorphism (SNP) that translates isoleucine instead of valine (V64I) has been described in the *CCR2* gene.¹⁷ The effect of this *CCR2* allelic variant on the natural course of HIV-1 has been widely assessed, with inconsistent results. Reports elsewhere^{17–20} and a meta-analysis⁹ have suggested a significant impact on the risk of infection¹⁸ and disease progression^{9,17,19,20} in different cohorts. Other reports, however, have tempered this toward less robust or no effects.^{21,22} Other investigations found that *CCR2-64I* may delay disease progression early after infection but that carriage of this variant allele is no longer influential in late advanced stages of the infection.^{23–26} The reasons for this discrepancy should be searched for mainly in the different ethnic origins, definitions, and compositions of the cohorts studied. The binding of *CCR2* by ligands such as *CCL2*²⁷ modulates its biologic functions. *CCR2* and *CCL2* should therefore be regarded as a functional unit.²⁸ *CCL2* is a polymorphic gene, and a functional SNP within the regulatory region of the *CCL2* gene has been described.²⁹ To date, information about the effect of *CCL2* allelic variants on the natural history of HIV-1 infection in adults^{30,31} and children^{31,32} is scarce.

We therefore aimed to evaluate whether *CCR2* and *CCL2* genetic variants influence the risk of HIV-1 infection and disease progression in a cohort of white Spanish HIV-1–infected patients made up of long-term nonprogressor (LTNPs) of >16 years duration and usual progressors (UPs). This extreme LTNP phenotype was selected to avoid the protective effect against disease progression exerted by the presence of the *CCR2-64I* variant allele during the first years of infection.²⁵ We also studied a group of individuals who are resistant to HIV-1 infection. The *CCR5Δ32* allele was also assessed.

PATIENTS AND METHODS

Design and Setting

This was a multicenter population association study. All subjects were recruited from a prospectively collected cohort of almost 6000 HIV-1–infected patients treated at the HIV outpatient clinics of the 8 participating hospitals.

Population

Two subsets of HIV-1–infected patients were studied: LTNPs and UPs. Criteria for LTNPs were asymptomatic HIV-1 infection of longer than 16 years' duration in the absence of any antiretroviral treatment, a stable CD4⁺ cell count persistently >500 cells/μL, and a plasma HIV-1 viral load repeatedly <5000 copies/mL.⁴ LTNPs were further divided into 2 subgroups according to whether their plasma viral load was detectable (DVL) or persistently undetectable. LTNPs in the latter subgroup were called elite controllers.³³ Patients were categorized as UPs if HIV-1 infection had progressed to advanced disease, namely, the appearance of class C HIV-1 disease, according to the 1993 Centers for Disease Control and Prevention criteria,³⁴ in addition to a plasma HIV-1 viral load of >35,000 copies/mL and a CD4⁺ cell count that declined

over time and was at least once <350 cells/μL in the first 10 years of infection. For a few patients whose date of infection was not available, this was assumed to be the midpoint between the first positive and last negative HIV-1 blood tests.^{30,35} A group of repeatedly exposed but uninfected individuals (EUs) was also evaluated. These were categorized into 2 groups according to the risk factor for acquiring HIV-1: parenterally exposed and sexually exposed. The parenterally exposed group was made of hemophiliacs who were exposed to nonviral inactivated clotting factor concentrates before 1986; they belonged to a large cohort of hemophiliacs who mostly became HIV-1 infected, and all of them, including those studied here, also became infected with hepatitis C virus.^{36,37} The sexually exposed group was made up of individuals who have had high exposure through unprotected sex with HIV-1–infected partners during the past 12 months before the study, with a median of >600 episodes of vaginal intercourse with ejaculation during the period of follow-up, which ranged between 1 and 4 years. These individuals and their HIV-1–infected partners belonged to a large cohort of individuals with long-term follow-up.^{36,37} Criteria for non-HIV-1 infection in EU individuals were a negative HIV-1 enzyme immunoanalysis and undetectable plasma viral load after at least 4 consecutive determinations at 6-month intervals.^{36,37} As a control group, we studied a sample of healthy subjects recruited from voluntary blood donors. All subjects in our study were white Spaniards. Immigrants from other countries, including those from other European countries, and their descendants were excluded. Informed consent was obtained from each participant. The project was approved by the local ethical research committees.

Samples

Blood, DNA, and Plasma

After 12 hours of fasting, blood samples with ethylenediaminetetraacetic acid were obtained from an antecubital vein. Five milliliters of whole blood was used to determine the CD4⁺ lymphocyte cell count, and 500 μL was used for DNA isolation by a MagNa Pure LC Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Plasma for determining HIV-1 viral load was obtained by centrifugation at 3500g for 15 minutes at 4°C.

Laboratory Methods

HIV-1 Infection

HIV-1 infection was diagnosed using a positive enzyme immunoanalysis and confirmed by a positive Western blot test.

Plasma HIV-1 Viral Load

Plasma HIV-1 viral load was determined by the HIV Cobas Ampliprep CAP-CTMHIV-1 using the COBAS AMPLICOR system (Roche Diagnostics). The cutoff for an undetectable viral load was 50 copies/μL.

Assessment of Blood CD4⁺ Lymphocytes

Samples were analyzed using a flow cytometer FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA). Data acquired were analyzed using the Multiset program (Becton Dickinson).

Genotype Determination

Personnel performing genotyping analysis (Montserrat Broch, Carmen Aguilar, and Eva González) were blinded to the HIV-1 status of patients and controls and to the HIV-1 disease progression status of patients.

CCR2 Genotype

The V64I (G > A) SNP in the *CCR2* gene was studied by polymerase chain reaction (PCR) and automatic sequencing analysis. The amplification reactions were performed as follows: primer forward, 5' TTA CGG TGC TCC CTG TCATA 3', and primer reverse, 5' TCA TTT GCA GCA GAG TGA GC 3' (GenBank Accession number: AF545480); final volume of 50 μ L with 0.2 mM of deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.2 μ M of primers, 2 mM of MgCl₂ and 1 U of Taq DNA polymerase (GeneCraft, Lüdinghausen, Germany). The program was 30 cycles of 30 seconds of denaturation at 96°C, 30 seconds of annealing at 61°C, and 30 seconds of extension at 72°C. PCR products of 234 base pairs (bp) were electrophoresed on a 2% agarose gel. The amplified products were diluted in formamide solution, denaturated at 95°C for 5 minutes, and analyzed by automatic sequencing in an ABI PRISM 310 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

CCL2 Genotype

The -2518 (A > G) SNP in the *CCL2* gene was studied by restriction fragment length polymorphism (RFLP). The conditions for amplification were as follows: primer forward, 5' CCA GCC AAA TGC ATT CTC TT 3', and primer reverse, 5' CTT TGC TGG CTG AGT GTT 3' (GenBank Accession number: AY357296); PCR with final volume of 50 μ L, 0.2 mM of dNTP, 0.2 μ M of primers, 2 mM of MgCl₂ and 1 U of Taq DNA polymerase (GeneCraft). The program was 30 cycles of 30 seconds of denaturation at 96°C, 30 seconds of annealing at 56°C, and 30 seconds of extension at 72°C. PCR products of 322 bp were digested by Pvu II (New England Biolabs, Ipswich, MA) at 37°C for 4 to 6 hours and electrophoresed on a 2.5% agarose gel: a 322-bp fragment

corresponding to A allele (restriction site absent) and a set of 152 bp and 170 bp corresponding to the G allele.

CCR5 Δ 32 Genotype

This was assessed as previously described.¹²⁻¹⁵

Statistical Analysis

This was performed using the SPSS/PC+ statistical package (version 12.0 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, IL). Descriptive data are expressed as mean \pm SD or median (range) for nonparametric distributions. Differences in levels between groups with continuous variables were compared using a Student *t* test, Mann-Whitney *U* test, or ANOVA when necessary. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by the χ^2 goodness-of-fit test. Genotype distribution and allele frequencies in the different groups were compared by the χ^2 test or Fisher exact test when necessary. A *P* value of <0.05 was considered significant. With respect to the risk of infection, our primary analysis was between HIV-1-infected and EU subjects; data on genotype distribution and allele frequencies from healthy controls were considered only descriptive.

RESULTS

Three hundred 18 individuals were studied: 182 HIV-1-infected patients and 136 uninfected individuals (100 healthy controls and 36 EUs). Of these patients, 109 were UPs and 73 were LTNPs. Of the LTNP subjects, 39 were elite controllers. The age, gender, and risk factors for acquiring HIV-1 infection of UPs and LTNPs were not significantly different. Most UPs (>90%) were receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). Table 1 shows selected characteristics of the populations studied.

CCR2 Gene Polymorphisms

Genotype distribution and allele frequencies of the V64I G > A polymorphism in the *CCR2* gene for the control group and the different patient categories are shown in Table 2. The genotype distribution in control subjects fit the expected Hardy-Weinberg equilibrium. The distribution of genotypes containing the variant A allele, homozygous or heterozygous,

TABLE 1. Demographic and Clinical Characteristics of the Population Analyzed

Variable	Healthy Controls (n = 100)	EUs (n = 36)	HIV-1 UPs (n = 109)	HIV-1 LTNPs (n = 73)	<i>P</i>
Male (%)	73 (73%)	22 (61%)	78 (71.5%)	50 (62.5%)	0.50
Age (y) (mean \pm SD)	44.6 \pm 10.1	46.7 \pm 9.2	41.8 \pm 8.9	41.6 \pm 7.1	0.82
Duration of HIV-1 infection (mean \pm SD)	—	—	6.2 \pm 2.7	18.2 \pm 1.6	<0.0001
Years from first time documented HIV-1 infection to treatment (mean \pm SD)	—	—	4.8 \pm 1.3	—	—
Plasma HIV-1 RNA (copies/mL) (mean and range)	—	—	11,808 (<50-750,000)	267 (<50-4600)	<0.0001
CD4 ⁺ T-cell count (cells/ μ L) (mean and range)	—	—	478 (6-1404)	772 (503-2080)	<0.0001
Exposure to HIV-1	—	—	—	—	—
Parenteral	—	22 (61%)	61 (58%)	47 (64.5%)	—
Sexual	—	14 (39%)	39 (37%)	22 (30%)	0.61
Other	—	—	5 (5%)	4 (5.5%)	—

<50 was arbitrarily counted as 49.

TABLE 2. CCR2 and CCL2 Genotype and Allele Frequencies in the Groups Analyzed

Genotype and Allele Frequencies	HCs (n = 100)	EUs (n = 36)	HIV-1-Infected (n = 182)	P (EUs vs. HIV-1-Infected)	HIV-1 UPs (n = 109)	HIV-1 LTNPs (n = 73)	P (HIV-1-UPs vs. HIV-1-LTNPs)
<i>CCR2-V64I (G > A)</i>							
GG	83 (87.4%)	31 (86.1%)	148 (83.6%)	0.86	87 (82.8%)	61 (84.7%)	0.69
GA	12 (12.6%)	5 (13.9%)	28 (15.8%)		17 (16.2%)	11 (15.3%)	
AA	0	0	1 (0.6%)	0.84	1 (1%)	0	0.78
Variant allele A	12 (6.3%)	5 (6.9%)	30 (8.5%)		19 (9%)	11 (7.6%)	
<i>CCL2-2518 (A > G)</i>							
AA	56 (60.2%)	19 (52.8%)	97 (55.4%)	0.02	52 (51%)	45 (61.6%)	0.35
AG	35 (37.6%)	17 (47.2%)	54 (30.9%)		34 (33.3%)	20 (27.4%)	
GG	2 (2.2%)	0	24 (13.7%)	0.96	16 (15.7%)	8 (11%)	0.15
Variant allele G	39 (21%)	17 (23.6%)	102 (29.1%)		66 (32.3%)	36 (24.6%)	
<i>CCR5Δ32*</i>							
wt/wt	87 (87%)	30 (85.7%)	143 (78.6%)	0.34	88 (80.7%)	55 (75.3%)	0.49
wt/Δ32	13 (13%)	5 (14.3%)	39 (21.4%)		21 (19.3%)	18 (24.7%)	
Variant Δ32 allele	13 (6.5%)	5 (7.1%)	39 (10.7%)	0.36	21 (9.6%)	18 (12.3%)	0.52

wt indicates wild-type allele; Δ32, 32-bp deletion.

Genotype and allele numbers do not match with patients studied because DNA for *CCR2*, *CCL2*, and *CCR5* genotyping could not be amplified in some individuals.

*Homozygosity Δ32/Δ32 was not detected.

was nonsignificantly differently distributed between HIV-1-infected and EU individuals ($P = 0.86$). Allele-wise analysis also showed nonsignificant differences between HIV-1-infected and EU individuals ($P = 0.84$). Among the infected patients, genotype-wise and allele-wise analyses showed no significant differences between UPs and LTNPs ($P = 0.69$ and $P = 0.78$, respectively; see Table 2). When we analyzed the LTNP subset of patients and compared elite controllers versus those with a DVL, we found no significant differences in *CCR2* genotype or allelic distribution. Further analysis of the *CCR2* genotype performed after excluding the 57 individuals who were heterozygotes for *CCR5Δ32* (homozygotes were not detected) did not significantly alter these results (detailed data not shown but available on request).

CCL2 Gene Polymorphisms

Genotype distribution and allele frequencies in the *CCL2* gene at the position -2518 for the control group and the various patient categories are shown in Table 2. The genotype distribution in control subjects fits the expected Hardy-Weinberg equilibrium. Genotype-wise analysis showed that homozygous genotypes containing the variant G allele were significantly overrepresented in HIV-1-infected patients with respect to EUs ($P = 0.02$). Allele-wise analysis failed to confirm such an association, however, and showed nonsignificant differences in the distribution of the variant G allele between these 2 groups ($P = 0.96$). Among the infected patients, genotype-wise and allele-wise analysis showed no significant differences between UPs and LTNPs ($P = 0.35$ and $P = 0.15$, respectively). When we analyzed the LTNP subset of patients and compared elite controllers with those with DVL, we found no significant differences in *CCL2-2518A > G* genotype or allele distribution. Further analysis of the *CCL2* genotype or allele distribution performed only in the 261 individuals with the wild-type *CCR5* genotype did not

significantly alter the results obtained in the whole cohort (detailed data not shown but available on request).

CCR2 and CCL2 Genotypes and Haplotypes

Analysis of the extended genotypes of the 2 *CCR2* and *CCL2* polymorphisms showed the existence of 7 different genotypes among the 9 possible genotypes. Common genotype 1 was composed of the homozygous wild-type *CCR2 GG* and *CCL2 AA*. Common genotype 2 was composed of *CCR2 GG* and *CCL2 AG*. The remaining 5 uncommon observed combinations of genotypes were grouped and called "uncommon genotype." When we compared HIV-1-infected and EU individuals, the former had a marginal but significantly increased frequency of the uncommon genotype (which included the *CCL2 GG* genotype; $P = 0.048$). Conversely, analysis of the distribution of the observed haplotypes failed to reveal significant differences between groups ($P = 0.68$). The results and analyses were the same when the individuals who carried the *CCR5Δ32* allele were excluded (detailed data not shown but available on request).

CCR5Δ32 Allele

There were no significant differences in *CCR5* genotype or allelic distributions among the different groups (see Table 2). Homozygosity for the *CCR5Δ32* allele was not observed.

DISCUSSION

In this study, we have observed that carriage of the homozygote *CCL2-2518G/G* genotype is associated with an increased risk of HIV-1 infection in a cohort of white Spaniards. Conversely, once infection is established, carriage of this variant genotype and allele does not modulate the LTNP state. No relation could be established between the *CCR2-V64I* SNP and the risk of infection or disease progression at least 16 years after the onset of infection. Nevertheless, unless time-dependent

analyses are performed, we cannot exclude a time-dependent effect of the *CCR2-V64I* SNP at early stages of infection.²⁵ Our results were independent of the presence or absence of the *CCR5Δ32* allele. Further analysis of extended genotypes that included *CCR2* and *CCL2* genetic variants together showed a modulatory effect of *CCL2-2518A > G* SNP on the risk of HIV-1 infection but not on disease progression.

The CC chemokine receptor *CCR2* has been shown to bind HIV-1 *in vitro*,³⁸ although its efficiency as an HIV-1 coreceptor *in vivo* seems limited. The *CCR2* gene is polymorphic, and the *CCR2-64I* variant allele affects receptor functionality.³⁹ Several reports have assessed how *CCR2* genetic polymorphism modulates the natural history of HIV-1. Some reports have shown that carriage of the variant *64I* allele confers some protection against infection,¹⁸ but that was not confirmed in others.^{21,22,40} In this respect, our data do not support a major role of the *CCR2-64I* allelic variant for the risk of infection, because genotype-wise and allele-wise analyses showed no differences between HIV-1-infected subjects and EU subjects. These results are in contrast to data from some researchers who have pointed out that genotypes containing the homozygous *64I* variant allele modulate the risk of infection;¹⁸ however, this should be interpreted with great caution, because in that report, individuals from the control group had no reported risk practices for acquiring HIV-1 infection. In this respect, the data presented here include the analysis of a cohort of extremely high-risk exposed but uninfected individuals. Although the cohort was small, our results provide a consistent argument against any influence of *CCR2* allelic variants on the risk of HIV-1 infection.

With regard to disease progression once infected, available information is also inconsistent. Some studies^{19,20,41} and a meta-analysis⁹ reported that carriage of the variant allele was associated with delayed disease progression, whereas others failed to find such an effect.^{21,42,43} Our data suggest that carriage of the *CCR2-64I* variant genotype or allele has no modulator effect on disease progression and that individuals with the extreme LTNP phenotype do not have a different genotype or allele distribution from that of UPs. We studied this particular extreme phenotype to distinguish clearly between the two categories of HIV-1-infected patients and to avoid overlapping of patients between groups. We acknowledge that the cross-sectional nature of the present study does not allow the dissection of time-dependent genetic effects, so we cannot exclude the *CCR2-64I*-attributed early delay in disease progression.²⁴⁻²⁶ Also, our small sample size makes our study underpowered to find the modest expected effects of *CCR2-64I* and *CCR5Δ32*.²⁵

CCL2, also known as MCP-1, is the prototype of a group of chemotactic cytokines known as CC chemokines.⁴⁵ *CCL2* is a key mediator of monocyte trafficking and plays a critical role in inflammation⁴⁶ and atherosclerosis in HIV-1-infected^{47,48} and -uninfected subjects.^{49,50} The ligand encoded by the *CCL2* gene exerts its functions by binding to *CCR2*. *CCL2* is a polymorphic gene. A functional SNP (*A > G*) located at position -2518 (called -2578 by others³⁰) in the distal regulatory region of the gene has been shown to influence *CCL2* expression²⁹ and production^{51,52} because of modifications in the transcriptional activity of the gene. Unlike

what occurs with *CCR2*, few data are available on the effects of *CCL2* genetic variants on the natural history of HIV-1 infection. A seminal study from Gonzalez et al³⁰ showed that the homozygous -2518GG variant genotype protected against HIV-1 infection; however, once infection was established, it was associated with rapid progression and neurologic impairment. This modulator effect was observed in adults but not in children. Conversely, in a study of genetic variants within the cluster made by *MCP1-MCP3-eotaxin* genes in 5 adult cohorts, some haplotypes containing the promoter *CCL2-2136T*, intron 1 *CCL2 767G*, and promoter *eotaxin-1385A* variant alleles influenced HIV-1 transmission, but no effect was attributed to haplotypes that contained the *CCL2-2518A* variant allele.³¹ A recent report in children confirmed a lack of association between carriage of the *CCL2-2518G* variant allele and risk of infection or disease progression and neurologic impairment,³² which confirms that the modulatory effects of *CCL2* genetic variants are limited to adults. Our data in adults and with respect to the risk of infection suggest that carriage of the homozygous *CCL2-2518GG* variant genotype confers an increased risk of HIV-1 infection. We acknowledge, however, that these new findings should be interpreted with caution because we have observed the *CCL2* effects only in the genotype-wise analysis but not in the allele-wise analysis, and, as shown empirically, the associations that are based on a single genetic contrast are far less likely to be replicated by subsequent studies.⁵³ Conversely and in relation to disease progression, genotype-wise and allele-wise analyses showed that the *CCL2* genetic variant studied did not modulate disease progression in our cohort. A question arises as to what are the reasons for the different findings in our study compared with those previously reported. In the report from Gonzalez et al,³⁰ the comparator group for the risk of infection was made up of healthy blood donors with unknown information on HIV-1 exposure status, whereas we have used EU individuals. With respect to disease progression, they studied HIV-1-infected patients with a mean of approximately 6 years' duration of infection, whereas we have assessed this issue by analyzing an extreme non-progressor phenotype (>16 years of infection). As mentioned previously, our design does not permit us to discard an early time-dependent effect of the *CCL2-2518 G* genetic variant on HIV-1 disease progression, such as has been assessed for other genes.²⁵ With respect to the study by Modi et al,³¹ the effects of *CCL2* genetic variants were assessed within a haplotype combination rather than alone. Differences in study design and type of controls and patients recruited thus seem to be the most plausible explanation for the different findings between our study and those reported previously.⁵⁴ Genuine racial diversity can provide an additional explanation.⁵⁵

In summary, our results suggest that *CCL2-2518 A > G* SNP may partly explain the diversity of HIV-1 vulnerability in white Spaniards. Given the small number of individuals presented here, these data need further validation in larger cohorts.

ACKNOWLEDGMENTS

The constructive comments and criticisms of the 2 anonymous reviewers are highly appreciated.

REFERENCES

1. Paxton WA, Martin SR, Tse D, et al. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med*. 1996;2:412–417.
2. Rutherford GW, Lifson AR, Hessel NA, et al. Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11-year follow-up study. *BMJ*. 1990;301:1183–1188.
3. Phair J, Jacobson L, Detels R, et al. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with HIV type 1: the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1992;5:490–496.
4. Petrucci A, Dorrucchi M, Alliegro MB, et al. How many HIV-infected individuals may be defined as long-term nonprogressors? A report from the Italian Seroconversion Study. Italian Seroconversion Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1997;14:243–248.
5. Mikhail M, Wang B, Saksena NK. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev*. 2003;5:230–244.
6. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard PF, et al. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet*. 1998;352:866–870.
7. Cohen OJ, Paolucci S, Bende SM, et al. CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5-Delta32. *J Virol*. 1998;72:6215–6217.
8. Anastassopoulou CG, Kostrikis LG. The impact of human allelic variation on HIV-1 disease. *Current HIV Research*. 2003;1:185–203.
9. Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, et al. Effects of CCR5-Delta 32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles of HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med*. 2001;135:782–795.
10. Tang J, Kaslow RA. The impact of host genetics on HIV infection and disease progression in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2003;17(Suppl 4):S51–S60.
11. Nolan D, Gaudieri S, John M, et al. Impact of host genetics on HIV disease progression and treatment: new conflicts of an ancient battleground. *AIDS*. 2004;18:1231–1240.
12. Vidal F, Peraire J, Domingo P, et al. Polymorphism of RANTES chemokine gene promoter is not associated with long-term nonprogressive HIV-1 infection of more than 16 years. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;41:17–22.
13. Peraire J, Broch M, Domingo P, et al. Absence of CXCR4 C-terminal polymorphisms in HIV-1-infected and uninfected Spaniards. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;42:382–383.
14. Vidal F, Peraire J, Domingo P, et al. Lack of association of SDF-1 3'A variant allele with long-term nonprogressive HIV-1 infection is extended beyond 16 years. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40:276–279.
15. Vidal F, Viladés C, Domingo P, et al. Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the CX3CR1 249I variant allele. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;40:527–531.
16. Frade JM, Llorente M, Mellado M, et al. The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as a coreceptor for HIV-1 infection. *J Clin Invest*. 1997;100:497–502.
17. Smith MW, Dean M, Carrington M, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science*. 1997;277:959–965.
18. Shrestha S, Strathdee SA, Galai N, et al. Behavioral risk exposure and host genetics of susceptibility to HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2006;193:16–26.
19. Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, et al. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med*. 1998;4:350–353.
20. Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med*. 1998;4:786–793.
21. Eugen-Olsen J, Iversen AK, Benfield TL, et al. Chemokine receptor CCR2b 64I polymorphism and its relation to CD4 T-cell counts and disease progression in a Danish cohort of HIV-infected individuals. Copenhagen AIDS Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1998;18:110–116.
22. Kostrikis LG, Neumann AU, Thomson 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. *J Virol*. 1999;73:10264–10271.
23. Winkler CA, Hendel H, Carrington M, et al. Dominant effects of CCR2-CCR5 haplotypes in HIV-1 disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;37:1534–1538.
24. Hendel H, Hénon N, Lebuane H, et al. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1998;19:381–386.
25. Mulherin SA, O'Brien TR, Ioannidis JP, et al. Effects of CCR5-Delta 32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. *AIDS*. 2003;17:377–387.
26. Ioannidis JP, Cantopoulos-Ioannidis DG, Rosenberg PS, et al. Effects of CCR5-Delta 32 and CCR2-64I alleles on disease progression of perinatally HIV-1-infected children: an international meta-analysis. *AIDS*. 2003;17:1631–1638.
27. Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999;10:61–86.
28. Sozzani S, Introna M, Bernasconi S, et al. MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression. *J Leukoc Biol*. 1997;62:30–33.
29. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259:344–348.
30. Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, et al. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:13795–13800.
31. Modi WS, Goedert JJ, Strathdee S, et al. MCP-1-MCP-3-Eotaxin gene cluster influences HIV-1 transmission. *AIDS*. 2003;17:2357–2365.
32. Singh KK, Hugues MD, Chen J, et al. Impact of MCP-1-2518-G allele on the HIV-1 disease of children in the United States. *AIDS*. 2006;20:475–478.
33. Bailey JR, Lassen KG, Yang HC, et al. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2006;80:4758–4770.
34. Castro KG, Ward JW, Slutsker L, et al. CDC 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1992;41:1–20.
35. McDermott DH, Beecroft MJ, Kleeberger CA, et al. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2000;14:2671–2678.
36. Soriano A, Martinez C, Garcia F, et al. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *J Infect Dis*. 2002;186:922–931.
37. Soriano A, Lozano F, Oliva H, et al. Polymorphisms in the interleukin-4 receptor α chain gene influence susceptibility to HIV-1 infection and its progression to AIDS. *Immunogenetics*. 2005;57:644–654.
38. Ayeheunie S, Garcia-Zepeda EA, Hoxie JA, et al. Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXCR chemokine receptors. *Blood*. 1997;90:1379–1386.
39. Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, et al. A CCR2 V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS*. 2004;26:729–738.
40. Liu H, Hwangbo Y, Holte S, et al. Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES and dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. *J Infect Dis*. 2004;190:1055–1058.
41. Fang G, Kuiken C, Weiser B, et al. Long-term survivors in Nairobi: complete HIV-1 RNA sequences and immunogenetic associations. *J Infect Dis*. 2004;190:697–701.
42. Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, et al. Genetic influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1

- (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2003;188:1461-1472.
43. Philpott S, Burger H, Tarwater PM, et al. CCR2 genotype and disease progression in a treated population of HIV type-1-infected women. *Clin Infect Dis.* 2004;39:861-865.
 44. Deleted in Proof.
 45. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol.* 1999;72:7-29.
 46. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610-621.
 47. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation.* 2004;110:2204-2209.
 48. Joven J, Coll B, Tous M, et al. The influence of HIV infection on the correlation between plasma concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and carotid atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2006;368:114-119.
 49. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 2004;95:858-866.
 50. Boisvert BA. Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:161-165.
 51. Letendre S, Marquie-Beck J, Singh KK, et al. The monocyte chemotactic protein-1-2578G allele is associated with elevated MCP-1 concentrations in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol.* 2004;157:193-196.
 52. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, et al. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2005;112:1113-1120.
 53. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, et al. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet.* 2001;29:306-309.
 54. Theodorou I, Capoulade C, Combadiere C, et al. Genetic control of HIV disease. *Trends Microbiol.* 2003;11:392-397.
 55. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA. "Racial" differences in genetic effects for complex diseases. *Nat Genet.* 2004;36:1312-1318.

APPENDIX

The members of the Chemokines and Long-Term Nonprogressors Study Group and coauthors of the paper are as follows: Francesc Vidal, Consuelo Viladés, Joaquim Peraire, Montserrat Broch, Cristina Gutiérrez, Sergi Veloso, Maria Saumoy, Teresa Auguet, Miguel López-Dupla, Joan Josep Sirvent, Montserrat Olona, Carmen Aguilar, Eva González, and Cristóbal Richart (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili); Montserrat Plana, Anna López, Felipe Garcia, Teresa Gallart, Oriol Coll, Anna Suy, and Josep M^a Gatell (Hospital Clinic and Universitat de Barcelona); Pere Domingo, M^a Antonia Sambeat, Àngels Fontanet, Josep Cadafalch, and Montserrat Fuster (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona); Blai Coll, Sandra Parra, Carlos Alonso-Villaverde, and Lluís Masana (Hospital Universitari de Sant Joan de Reus and Universitat Rovira i Virgili); Enric Pedrol and Elisabeth Deig (Unitat d'Infeccions-VIH, Hospital General de Granollers, Observatori de la Salut Dr. Carles Vallbona); David Dalmau and Mireia Cairó (Unitat VIH, Servei de Medicina Interna, Unitat de Recerca, Hospital Mútua de Terrassa, Universitat de Barcelona); Hernando Knobel, Milagros Montero, and Ana Guelar (Hospital del Mar de Barcelona); Jorge del Romero (Centro Sandoval, Madrid); Jose Ignacio Lorenzo (Hospital la Fe, Valencia); and Judit González (Pius Hospital de Valls).

6-DISCUSIÓN

ESTUDIO 1:

Los pacientes españoles infectados por el VIH-1 no progresores en más de 15 años tienen una frecuencia aumentada de la variante alélica 249I del CX3CR1

CX3CR1, receptor de la quimioquina fractalkina, puede ser utilizado por algunos aislados del VIH-1 como correceptor para su entrada en la célula. En el gen de este quimiorreceptor se han descrito 2 SNPs⁵⁹, una sustitución del nucleótido G por A en la posición 249, que traduce por isoleucina donde debiera ir una valina (V249I) y una sustitución del nucleótido C por T en la posición 280 que traduce metionina por treonina (T280M). Se han presentado estudios sobre el impacto de estos SNPs en la historia natural de la infección por el VIH, pero con resultados contradictorios^{139-141,160-163}.

En este estudio evaluamos si las variantes genéticas debidas a la presencia de los SNPs V249I y T280M en el gen CX3CR1 están asociadas con la condición de LTNP en una cohorte de españoles LTNP con infección por el VIH-1 de más de 15 años de evolución.

Observamos que los pacientes españoles infectados por el VIH-1 que entran dentro de la categoría de no progresores a largo plazo tienen una frecuencia aumentada de la variante alélica CX3CR1 249I al compararlos con los progresores típicos. No se encuentra relación entre la variante alélica 280M y el estado de LTNP. También encontramos una asociación significativa entre el haplotipo 249I280T y la no progresión a largo término. Todos estos resultados no se modifican cuando se estudia la presencia o no del alelo CCR5Δ32. Ninguna de las dos variantes alélicas influyen en el riesgo de infección por el VIH-1 ya que no existen diferencias significativas entre los pacientes

infectados por el VIH-1 y los controles sanos. Además, nuestros datos confirman un cerrado desequilibrio de ligamiento entre 249I y 280M, de forma que la mutación 280M va siempre junto con la variante alélica 249I, mientras que la esta última puede presentarse como un polimorfismo aislado. Estos datos, por lo tanto, sugieren que el alelo CX3CR1 249I tiene un efecto modulador sobre la evolución de la enfermedad, la mayor prevalencia de esta variante alélica en los LTNP representaría un factor protector sobre la progresión de la enfermedad ya que se detectó un deterioro inmunológico más rápido en los pacientes UPs, en los que esta variante alélica estaba infrarrepresentada.

Estos hallazgos contrastan con algunas publicaciones previas. Faure et al⁵⁹. presentan una cohorte francesa en la que encuentran que los pacientes homocigotos para el haplotipo 249I280M tienden a una más rápida progresión a SIDA y muerte que los heterocigotos o *wild-type*. Estos resultados no se han confirmado en un estudio⁶⁰ posterior realizado en tres cohortes norteamericanas de serconvertidores, en las que no encuentran diferencias significativas entre pacientes expuestos no infectados e infectados por el VIH-1, ni en la evolución de la infección en ninguna de las cohortes. Otros estudios^{160,161} tampoco encuentran asociación entre las variantes genéticas estudiadas y el riesgo de infección y/o progresión de la enfermedad.

Estas discrepancias en los resultados se pueden explicar dadas las diferentes características de las cohortes analizadas. En nuestra cohorte encontramos diferencias en la distribución genotípica de CX3CR1 V249I comparada con la cohorte que presentan Faure et al⁵⁹ que también corresponde a una población blanca y que se explicaría por la diversidad genética debida a los patrones de migración y ocupación histórica en España. Nuestra cohorte también difiere de las anteriores en que la media de la infección en los

pacientes LTNP es de más de 16 años. Por otro lado, Hendel et al¹⁶⁰, que no encuentra diferencias significativas, enfatiza sobre la necesidad de una muestra significativa para poder detectar los efectos genéticos de estas variaciones.

ESTUDIO 2:

Polimorfismos en la región 3' no traducida del gen de la fractalkina (CX3CL1) y riesgo de infección por VIH-1 y progresión de la enfermedad.

El receptor de quimioquinas CX3CR1 es utilizado *in vitro* como correceptor de entrada a las células diana por algunas cepas del VIH-1¹⁵⁹⁻¹⁶⁴. Algunos estudios han mostrado que el ser portador de alguna variante alélicas de CX3CR1 puede modular la historia natural de la infección por VIH-1, aunque los datos son inconsistentes^{59,60,141,160,161,165,166}. La fractalkina (CX3CL1), también conocida como neurotactina, es el único ligando natural de CX3CR1^{167,169}. Además, existen datos que apoyan un potente efecto de esta quimioquina como factor bloqueante de la infección por el VIH-1¹⁵⁹.

Hasta la actualidad no se ha estudiado la presencia de polimorfismos en el gen CX3CL1. En una búsqueda en la base de datos del National Center for Biotechnology Information se identifican 2 sitios polimórficos en la región 3' no traducida del gen (UTR), uno consiste en una transición de T a C en la posición 2999 y otra, en una transición de T a C en la posición 3042. Estos polimorfismos están localizados en la región 3' no traducida del gen, región crítica para la estabilidad del ARNm y la traducción a proteínas.

En este estudio evaluamos si las 2 variantes genéticas de CX3CL1 mencionadas, tienen influencia en el riesgo de infección por el VIH-1 o en la progresión de la enfermedad en una cohorte de españoles blancos y adultos que no presentan la delección CCR5 Δ 32. Los resultados mostraron que las variantes alélicas CX3CL1 2999C y 3042C eran más frecuentes en los pacientes infectados por el VIH-1 que en los no infectados. Los análisis de los genotipos combinados y haplotipos de CX3CL1 2999 y 3042 mostraron que los que contenían la variante alélica C también eran más frecuentes en los pacientes infectados por el VIH-1. Estas diferencias eran significativas sólo cuando se comparaban los pacientes infectados con los controles sanos, mientras que cuando se comparaban pacientes infectados con expuestos no infectados sólo se encontró una tendencia significativa. Ninguna de estas variantes alélicas tenían influencia sobre la progresión de la enfermedad ya que estaban igualmente representadas entre LTNPs y UPs.

Estos datos deben valorarse con precaución ya que las asociaciones se encontraron al hacer comparación de las distribuciones alélicas, pero no en la comparación de las distribuciones genotípicas. Por otro lado, encontramos asociaciones significativas al comparar pacientes infectados con controles sanos, pero solo tendencia no significativa cuando los comparábamos con expuestos no infectados, esta discrepancia podría deberse al bajo número de ENIs disponibles en este estudio, ya que la distribución genotípica y la frecuencia alélicas de CX3CL1 2999 y 3042 en controles sanos y ENIs está estrechamente relacionada. Por lo tanto nuestro análisis no tendría el suficiente poder para detectar diferencias significativas entre ENIs y pacientes infectados.

Se han estudiado 2 SNPs localizados en la región 3'UTR del gen CX3CL1 y aunque se trata de una región no codificante del gen, estos SNPs pueden afectar su función al

alterar la estructura secundaria del ARN y la eficiencia de la traducción, o por afectar motivos en el ARN que unen proteínas que regulan la degradación del ARN^{170,171}. El resultado puede ser una producción alterada de la quimioquina CX3CL1 que como consecuencia puede modificar la disponibilidad del quimiorreceptor CX3CR1 para la unión del VIH-1, bien sea por inhibición competitiva o por internalización del receptor. A este respecto, los estudios se están dirigiendo a aclarar si estas variantes alélicas afectan la función de traducción a proteínas y por tanto modifican la expresión y producción de CX3CL1.

El motivo para estudiar la quimioquina CX3CL1 es que el complejo quimioquina - receptor de quimioquina debe considerarse como una unidad funcional y, por lo tanto, la capacidad y disponibilidad de un determinado correceptor de unirse al VIH-1 puede estar mediada por la quimioquina que se encuentre unida. A este respecto, nuestros resultados sugieren que las variantes alélicas CX3CL1 2999C y 3042C pueden tener un efecto modulador en la enfermedad y la mayor prevalencia de estas variantes en los pacientes infectados por el VIH-1 puede suponer un factor predisponente a la infección. Estos hallazgos resaltan que el eje CX3CR1/CX3CL1 puede tener influencia importante en la transmisión del VIH-1, como ha sido sugerido por el hallazgo de una expresión aumentada de CX3CL1 en diferentes tipos de células en las áreas de células T de los ganglios linfáticos de pacientes infectados por el VIH-1¹⁷⁰. Otros dos hechos apoyan este papel de CX3CL1 en la patogenia del VIH-1. Primero, estudios in vitro han demostrado que CX3CL1 bloquea de manera eficiente la actividad del correceptor del VIH-1 CX3CR1¹⁵⁹. En segundo lugar, CX3CL1 tiene tanto actividad quimioatrayente como de adhesión¹⁷³, así cuando queda anclada en la membrana puede jugar un importante papel en la respuesta inmune al facilitar el contacto celular. Además, CX3CL1 se

considera una quimioquina Th1^{174,175}, como el interferón (IFN) gamma, interleuquina (IL)-1 y factor de necrosis tumoral (TNF) alfa. Por tanto, CX3CL1 desempeña un importante papel en la respuesta inmune tipo Th1. Dado el papel menor in vivo de CX3CR1 en las fases iniciales de la infección por el VIH-1, parece plausible que los efectos de CX3CL1 en la transmisión del VIH-1 sean debido a sus propiedades inmunes más que al efecto del bloqueo sobre CX3CR1.

En resumen, nuestros resultados sugieren que los SNPs CX3CL1 T2999C y T3042C pueden tener influencia sobre el riesgo de infección por el VIH-1. Debido al bajo número de individuos estudiados, serán necesarios posteriores estudios con mayores cohortes de pacientes infectados por el VIH-1 y ENIs para valorar la reproducción de nuestros resultados.

ESTUDIO 3:

Efecto de las variantes genéticas de CCR2 y CCL2 en la historia natural de la infección por VIH-1. *CCL2-2518GG está sobrerrepresentado en una cohorte de pacientes españoles infectados por el VIH-1.*

CCR2 es un receptor de quimioquinas que puede actuar como correceptor del VIH-1¹⁷⁶. El gen de CCR2 es polimórfico y se ha descrito un SNP en la posición 64 que traduce una valina por isoleucina (V64I) que afecta a la funcionalidad del receptor^{177,178}. El efecto de esta variante alélica (CCR2 V64I) en el curso de la historia natural de la infección por el VIH-1 ha sido motivo de múltiples estudios con resultados contradictorios^{55,179-184}.

Así mismo, el gen de *CCL2*, quimioquina también conocida como MCP-1 y que es el ligando único de *CCR2*, es también polimórfico y se han descrito variantes. Entre ellas un SNP funcional en la región reguladora, en posición -2518 (A > G), que ha demostrado tener influencia sobre la expresión¹⁸⁵ y producción^{186,187}. Al contrario que con *CCR2*, hay pocos estudios que evalúen el efecto de esta variante alélica en el curso de la infección por el VIH-1¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

En este estudio evaluamos si las variantes alélicas *CCR2* V64I y *CCL2*-2518 (A>G) tienen influencia en el riesgo de infección por VIH-1 y en la progresión de la enfermedad en una cohorte de españoles blancos infectados por el VIH-1 que comprende pacientes LTNP de más de 16 años de evolución, pacientes con progresión típica de la infección, personas repetidamente expuestas no infectados por el VIH-1 y un grupo control.

Como resultados observamos en la cohorte estudiada que ser portador homocigoto del genotipo *CCL2*-2518G/G está asociado con un aumento del riesgo de infección por el VIH-1. Sin embargo, una vez que la infección por el VIH-1 está establecida, ser portador de esta variante genotípica y alélica no modula el estado de LTNP. Por otro lado, no se encuentra relación entre el SNP *CCR2*-V64I y el riesgo de infección o de progresión de la enfermedad al menos 16 años después del inicio de la infección. No obstante, no se puede excluir un efecto tiempo-dependiente del SNP *CCR2*-V64I en estadios precoces de la infección (véase más adelante). Tampoco se observa ninguna relación entre estos SNP y la carga viral y recuento de linfocitos CD4+. Estas observaciones son independientes de la presencia del alelo *CCR5*Δ32.

En relación a la influencia de estas variantes genotípicas en el riesgo de infección por el VIH-1 algunos estudios¹⁸¹ han mostrado que ser portador de la variante alélica CCR2-V64I confiere protección frente a la infección, pero estos resultados no han sido confirmados en otros estudios¹⁸²⁻¹⁸⁴. En el estudio que presentamos, nuestros datos no apoyan que la variante alélica CCR2-64I juegue un papel en el riesgo de infección ya que no encontramos diferencias en los análisis genotípicos y alélicos entre los pacientes infectados por el VIH-1 y los pacientes expuestos no infectados. Cabe destacar que a diferencia del estudio que demuestra la influencia de esta variante alélica en la protección frente a la infección por el VIH-1, donde los investigadores no reportan la existencia o no, ni el tipo de exposición de riesgo a la infección en el grupo control, nuestra cohorte incluye un grupo de sujetos no infectados con exposiciones repetidas de alto riesgo para la infección. Aunque esta cohorte de expuestos no infectados es pequeña, y por tanto con un poder estadístico bajo para detectar algún tipo de efecto que pueda tener significado clínico, proporciona un argumento consistente en contra de la influencia de las variantes alélicas de CCR2 en el riesgo de infección por VIH-1.

En relación a la influencia de esta variante genotípica en la progresión de la enfermedad en pacientes infectados por el VIH-1 también encontramos resultados contradictorios. Algunos estudios^{57,183,191} y un meta-análisis⁵⁵ reportan que el ser portador de la variante alélica está asociado con retraso en la progresión de la enfermedad, mientras que otros estudios no encuentran esta asociación^{182,192,193}. Nuestros datos sugieren que ser portador de la variante alélica CCR2-64I no tiene ningún efecto modulador sobre la progresión de la enfermedad ya que no encontramos ninguna diferencia en el genotipo ni la distribución alélica entre los pacientes LTNP que denominamos controladores de élite y UP. No podemos excluir que esta variante alélica

podría tener una influencia en los estadios precoces de la infección, como observan en un meta-análisis Mulherin et al⁵⁸, ya que los pacientes LTNP de esta nuestra cohorte llevan más de 16 años de evolución de la infección.

Hasta el momento se han realizado pocos estudios de los efectos de las variantes genéticas de *CCL2* en la historia natural de la infección por el VIH-1 y los resultados son también contradictorios. Gonzalez et al¹⁹⁴ muestran que la variante genotípica homocigota -2518GG protege frente a la infección por el VIH-1, aunque una vez que la infección está establecida, se asocia con una rápida progresión y deterioro neurológico. Este efecto se observó en adultos pero no en niños. Por el contrario, en otro estudio que comprende 5 cohortes de pacientes adultos, no se encuentra ninguna asociación entre la variante alélica -2518G y el riesgo de infección por el VIH-1¹⁹⁵. En un estudio reciente realizado en niños, se confirma esta falta de asociación entre esta variante alélica y el riesgo de infección y progresión de la enfermedad¹⁹², quedando de esta forma este efecto modulador limitado a adultos. Nuestros datos en adultos con respecto al riesgo de infección sugieren que ser portador homocigoto de la variante genotípica *CCL2*-2518G/G confiere un aumento del riesgo de infección por el VIH-1. Aunque reconocemos que estos datos deben ser interpretados cautamente ya que el efecto solo se ha demostrado en un análisis genotípico pero no se ha confirmado en el análisis alélico.

En relación a la progresión de la enfermedad no encontramos influencia de esta variante alélica en nuestra cohorte.

Las diferencias entre los datos obtenidos en este estudio y las publicadas con anterioridad deben ser atribuidas a diferencias en los diseños de los estudios, en el tipo

de cohorte estudiada y probablemente a la diversidad racial existente, pero cabe destacar que la cohorte que presentamos comprende grupos muy bien caracterizados, destacando entre ellos los LTNP de más de 16 años de evolución y diferenciando entre estos un subgrupo de controladores de élite, así mismo, también comprende un grupo de pacientes repetidamente expuestos a la infección pero no infectados.

7-CONCLUSIONES

Los pacientes españoles infectados por el VIH-1 no progresores en más de 15 años tienen una frecuencia aumentada de la variante alélica 249I del CX3CR1.

- La variante alélica CX3CR1 249I tiene una frecuencia significativamente aumentada entre los pacientes LTNP. La mayor prevalencia de esta variante representaría un factor protector en la progresión de la enfermedad.
- El haplotipo 249I280T también se asocia con el estado de LTNP.
- La variante alélica CX3CR1 280M no se relaciona con la evolución de la enfermedad.
- Ninguna de las dos variantes alélicas influye en el riesgo de infección por el VIH-1.
- Se confirma el desequilibrio de ligamiento entre 249I y 280M.
- Los resultados no se modifican cuando se corrigen por la presencia o no del alelo CCR5 Δ 32.

Polimorfismos en la región 3' no traducida del gen de la fractalkina (CX3CL1) y riesgo de infección por VIH-1 y progresión de la enfermedad.

- Las variantes alélicas CX3CL1 2999C y 3042C son más frecuentes en los pacientes infectados por el VIH-1 que en los no infectados. La diferencia era significativa al comparar los pacientes infectados con los controles sanos.
- Los análisis de los genotipos combinados y haplotipos CX3CL1 2999 y 3042 mostraron que los que contenían la variante alélica C eran más frecuentes en los pacientes infectados. Esta diferencia era significativa al comparar los pacientes infectados con los controles sanos.
- Los análisis en que se comparaban pacientes infectados con expuestos no infectados sólo mostraban tendencia no significativa.
- Ninguna de estas variantes alélicas tiene influencia sobre la progresión de la enfermedad.

Efecto de las variantes genéticas de CCR2 y CCL2 en la historia natural de la infección por VIH-1. *CCL2-2518GG está sobrerrepresentado en una cohorte de pacientes españoles infectados por el VIH-1.*

- En la cohorte estudiada ser portador homocigoto del genotipo *CCL2-2518G/G* está asociado con un aumento del riesgo de infección por VIH-1.
- Ser portador homocigoto del genotipo *CCL2-2518G/G* no influye en la evolución de la enfermedad
- No existe ninguna relación entre el polimorfismo *CCR2-V64I* y el riesgo de infección o la evolución de la enfermedad.
- La presencia de los polimorfismos *CCL2-2518G/G* y/o *CCR2-V64I* no tienen relación con la carga viral plasmática ni con el recuento de linfocitos CD4+.
- Estas observaciones son independientes de la presencia del alelo *CCR5Δ32*

8-BIBLIOGRAFÍA

- 1- Murfhy F, Fauquet C, Dishop D, et al. Virus Taxonomy: Sixth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Nueva York: Springer Verlag 1995.
- 2- Gao F, Bailes E, Robertson DL, et al. Origin of HIV-1 in chimpanzee Pan troglodytes. Nature 1999;397:436-441.
- 3- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. Science 2000;288:1789-1796.
- 4- Hymes KB, Greene JB, Marcus A, et al. Kaposi's sarcoma in homosexual men: A report of eight cases. Lancet 1981;2:598-600.
- 5- CDC. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia among Homosexual Men- New York City and California. MMWR 1981;4:305-308.
- 6- CDC. Pneumocystis Pneumonia- Los Angeles. MMWR 1981;30:250-252.
- 7- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1981;305:1425-1431.
- 8- Masur H, Michelis MA, Greene JB, et al. An Outbreak of community acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. N Engl J Med 1981;305:1431-1438.

- 9- Du Bois RM, Brantwaite MA, Mikhail JR et al. Primary Pneumocystis Carinii and Cytomegalovirus Infections. Lancet 1981;2:1339.
- 10- Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM. Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. J Infect Dis 1983;148:339-345.
- 11- Direction Generale De La Sante. Syndrome d'immune-depression acquise. Bull Epid 1982Hebd., no. 50 (1982b).
- 12- CDC. Current trends prevention of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS): Report of Inter-Agency Recommendations. MMWR 1983;32:101-103.
- 13- Barre-Sinoussi F., Chermann J., Rey F, et al. Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Science 1983;220:868-871.
- 14- Korber B, Muldoon M, Theiler T, et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. Science 2000, 288:1789-1796.
- 15- Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. FASEB J 1991 5:2349-60.

- 16- Pavlakis GN, Felber BK. Regulation of expression of human immunodeficiency virus. *New Biol* 1990;2:20-31.
- 17- Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, et al. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* 2004;9:2388-2413.
- 18- ONUSIDA. Informe sobre la epidemia mundial de SIDA 2008. www.unaids.org
- 19- Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia epidemiológica del SIDA en España. Actualización a 30 de Junio de 2008. www.cne.isciii.es
- 20- CEESCAT. Informe del sistema integrado de vigilancia epidemiológica sobre el SIDA y las enfermedades de transmisión sexual en Cataluña (SIVES 2008). www.ceescat.org
- 21- Overbaugh J, Miller A Eiden M. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphostidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:371- 389.
- 22- Brelot A, Alizon M. HIV-1 entry and how to block it. *AIDS* 2001;15:3-11.
- 23- Broder CC, Collman RG. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc Biol* 1997;62:20-29.

- 24- Daar ES, Kesler KL, Petropoulos CJ, et al. Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clin Infect Dis* 2007;45:643-649.
- 25- Ganesh L, Burstein E, Guba-Niyogi A et al. The gene product Murr-1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature* 2003;426:853-857.
- 26- Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF et al. Cellular APOBC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 2005;435:108-114.
- 27- Alcamí J, Lain de Lera T, Folgueira L, et al. Absolute dependence on κ B responsive elements for initiation and tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J* 1995;14:1552-1560
- 28- Bermejo M, Sanchez-Palomino S, Usán L, Alcamí J. Dynamics of HIV replication in lymphocytes and consequences in the efficacy of protease inhibitors. *J Med Virol* 2004;73:502-507
- 29- Liang C, Wainberg M. The rol of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor?. *AIDS Rev* 2002;4:41-49.
- 30- Emmerman M, Malin MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unravelling viral and host cell biology. *Science* 1998;280:1880-1884.
- 31- Cullen BR. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 1998; 93:685-692.

- 32- Marin M, Rose K, Kozak S, et al. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 2003;9:1398-1403.
- 33- Sheedy A, Gaddis N, Malim N. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 2003;9:1404-1407.
- 34- Kaplan A. Assembly of the HIV-1 core particle. *AIDS Rev* 2002; 10: 203- 205.
- 35- Freed E. Viral late domains. *J Virol* 2002;76:4679-4687.
- 36- Van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:697-709.
- 37- Vázquez-Guillén JM, Garcia-Jacobo PJ, Zapata-Benavides P, et al. Expression of DC-SIGN in peripheral blood dendritic cells of patients with typical, slow, and rapid progression to AIDS. *Arch Med Res* 2009;40:132-135.
- 38- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266:1395-1399.
- 39- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-644.

- 40- Amatruda TT, Gerard NP, Gerard C, et al. Specific interactions of chemoattractant receptors with G-proteins. *J Biol Chem* 1993;268:10139-10144.
- 41- Baldwin JM. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:180-190.
- 42- Hamm HE, Gilchrist A. Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:189-196.
- 43- Devalaraja MN,, Richmond A. Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy?. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:151-156.
- 44- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-568.
- 45- Walker CM, Moody DJ, Stites DP, et al. CD8+ lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication. *Science* 1986;234:1563-1566.
- 46- Cocchi F, De Vico AL, Garzino-Demo A, et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811-1815.

- 47-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;272-282.
- 48-Chesebro B, Nishio J, Perryman S, et al. Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry in CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, macrophages. *J Virol* 1991;65:5782-5789.
- 49-Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Small amino acid changes in V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type-1. *Natl Acad Sci. USA* 1992;89:9434-9438.
- 50-Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-377.
- 51- Galli M. HIV-1 Long-Term- non-progression: More open questions than answers. *AIDS Rev* 1999;174-179.
- 52-Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction to HIV-1 infection and progression to AIDS by deletion allele of the CCR5 structural gene. *Nature* 1996; 382:722-725.

- 53- Stewart GJ, Asthon LJ, Biti RA, et al. Increased frequency of CCR5 delta 32 heterozgotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-term Non Progressors Study Group. AIDS 1997;11:1833-1838.
- 54- Cohen OJ, Paolucci S, Bende SM, et al. CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5-Delta 32. J Virol 1998;72:6215-6217.
- 55- Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, et al. Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles of HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. Ann Intern Med 2001;135:782-795.
- 56- Martin MP, Dean M, Smith MW, et al. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. Science 1998;282:1907-1911.
- 57- Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. Nat Med 1998;4:786-793.
- 58- Mulherin SA, O'Brien TR, Ioannidis JP, et al. effects of CCR5-Delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. AIDS 2003;17:377-387.

- 59- Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* 2000;287:2274-2277.
- 60- McDermott DH, Colla JS, Kleeberger CA, et al. Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease. *Science* 2000;290:2031.
- 61- Kwa D, Boese-Nunnink B, Schuitemaker H. Lack of evidence for an association between a polymorphism in CX3CR1 and the clinical course of HIV infection or virus phenotype evolution. *AIDS* 2003;17:759-761.
- 62- Chabot DJ, Broder CC. Substitutions in a homologous region of extracellular loop 2 of CXCR4 and CCR5 alter coreceptor activities for HIV-1 membrane fusion and virus entry. *J Biol Chem* 2000;275:23774-23782.
- 63- Martin MP, Carrington M, Dean M, et al. CXCR4 polymorphisms and HIV-1 pathogenesis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1998;19:430.
- 64- Alvarez V, Lopez-Larrea C, Coto E. Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users. *Hum Genet* 1998;102:483-486.
- 65- Winkler C, Modi W, Smith MW, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science* 1998;279:389-393.

- 66-Piguet V, Sattentau Q. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* 2004; 114:605-610.
- 67-McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001; 410:974-979.
- 68-Bermejo M, Gil J, and Alcamí J. HIV and apoptosis: a complex interaction between death and virus survival. *Prog Mol Subcell Biol* 2004;36:117-149.
- 69-Hazenbergh M, Hamann D, Schuitemaker H, et al. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol* 2000;1:285-289.
- 70-Nabel GJ, Sullivan J. Antibodies and Resistance to Natural HIV Infection. *N Engl J Med* 2000;343:307-312
- 71- Davey RT, Miedema F. The T cell in HIV infection and disease. *Current Opinion in HIV and AIDS* 2006;1:3-39
- 72-Cao Y, Quin L, Safrit J, et al. Virologic and immunologic characterization of the long term survivors of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:210-208.
- 73-Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K et al. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nature Med* 1995;1:59-64.

- 74- Wei X, Decker JM, Wag S et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;42:307-312.
- 75- Davey RT, Miedema F. The cell in HIV infection and disease. *Current opinion in HIV and AIDS* 2006;1:3-39.
- 76- Lane TE (ed.). *Chemokines and viral infection*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. 2006.
- 77- Ho DD, Neumann AU, Perelson AD, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123-126.
- 78- Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004;200:761-770.
- 79- Haase AT, Henry K, Zupancic M, et al. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 1996;274:985-989.
- 80- Lassen K, Han Y, Kiefler T et al. The multifactorial nature of HIV-1 latency. *Trend Mol Med* 2004;10:525-531.
- 81- Speelman EC, Livingston-Rosanoff D, Li SS, et al. Genetic association of the antiviral restriction factor TRIM5alpha with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2006;80:2463-2471.

- 82- Johnson WE, Sawyer SL. Molecular evolution of the antiretroviral *TRIM5* gene. *Immunogenetics* 2009;61:163-176.
- 83- Goila-Gaur R, Strebel K. HIV-1, Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 2008;5:51.
- 84- Von Schwedlwe U, Song J, Aiken C, et al. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* 1993;67:4945-4955.
- 85- Schacker T, Collier AC, Hughes J, et al. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1996;125:257-26.
- 86- Hennrad DR, Daar E, Frazadegan H, et al. Virologic and immunologic characterization of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995;9:305-310.
- 87- Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993;259:1749-1754.
- 88- Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, et al. T-cell subsets that harbour human immunodeficiency virus (VIH) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 2004;78:1160-1168.

- 89-Pantaleo G, Graciosi C, Demarest JT et al. HIV infection is a active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993;362:355-358.
- 90-Hecht FM, Busch MP, Rawal B, et al. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* 2002;24:1119-1129.
- 91- Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-1170.
- 92-Patterson BK, Till M, Otto P et al. Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR-driven in situ hybridation and flow cytometry. *Science* 1993; 260:976-979.
- 93-Rutherford G, Lifson AR, Hessel NA, et al. Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men:an 11 years follow up study. *BMJ* 1990;301:1183-1188.
- 94-Mikhail M, Wang B, Sasena NK. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev* 2003;5:230-244.
- 95-Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995;332: 209-216.

- 96- Goudsmit J. Naturally HIV-1 seroconverter with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. *AIDS* 2002;16:791-793.
- 97- Rodes B, Toro C, Paxinos E, et al. Differences in disease progression in a cohort of log-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS* 2004;18:1109-1116.
- 98- Saksena NK, Rodes B, Wang B, et al. Elite HIV controllers: myth or reality?. *AIDS Rev.* 2007;9:195-207.
- 99- Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 2007;27:406-416.
- 100- Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* 2005;41:1053-1056
- 101- Hubert JB, Burgard M, Dussaix E, et al. Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *AIDS* 2000;14:123-131.
- 102- Baker BM, Block BL, Rothchild AC, et al. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:55-69.

- 103- Phair J, Jacobson L, Detels R, et al. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with human immunodeficiency virus type-1: The Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5:490-496.
- 104- Ward JW, Bush TJ, Perkins HA, et al. The natural history of transfusion-associated infection with human immunodeficiency virus. Factors influencing the rate of progression to disease. *N Engl J Med* 1989;321:947-952.
- 105- Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994;169:968-974.
- 106- Learmont JC, Gezy AF, Mills J, et al. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* 1999;340:1715-1722.
- 107- Churchill MJ, Rhodes DI, Learmont JC, et al. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef/long terminal repeat sequences in a cohort of long-term survivors infected from a single source. *J Virol* 2006;80:1047-1052.
- 108- Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, et al. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* 2007;74:4361-4376.

- 109- Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, et al. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest* 2003;111:1547-1554.
- 110- Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 1997;3:212-217.
- 111- Mologni D, Citterio P, Menzaghi B, et al. Vpr and HIV-1 disease progresión: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *AIDS* 2006;20:567-574.
- 112- Fisher A, Lejczak C, Lambert C, et al. Is the Vpr R77Q mutation associated with long-term non-progression of HIV infection?. *AIDS* 2004;18:1346-1347.
- 113- Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, et al. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol* 2007;81:2508-2518.
- 114- Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* 2008;197:563-571.

- 115- Miura T, Brockman M, Brumme AJ, et al. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: Lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *J Virol* 2008;82:8422-8430
- 116- Casoli C, Pilotti E, Bertazzoni U. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact of AIDS progression. *AIDS Rev* 2007;9:140-149.
- 117- Tillman HL, Heiken H, Knapik-Botor A, et al. Infection with GB virus C and reduces mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2001;345:715-724.
- 118- Xiang J, George SL, Wünschmann S, et al. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet* 2004;363:2040-2046.
- 119- Pomerantz RJ, Nunnari G. HIV and GB virus C- Can two viruses be better than one?. *N Eng J Med* 2004;350:963-965.
- 120- Belike MA, Theall KP, O'Brien M, et al. Clinical outcomes and disease progression among patients coinfecting with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin Infect Dis* 2004;39:256-263.

- 121- Turci M, Pilotti E, Ronzi P, et al. Coinfection with HIV-1 and human T-lymphotropic virus type II in intravenous drugs users is associated with delayed progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:100-106.
- 122- Pilotti E, Elviri L, Vicenzi E, et al. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 infection. *Blood* 2007;109:1850-1856.
- 123- Greub G, Ledegerber B, Battegay M, et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 2000;356:1800-1805.
- 124- Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:921-929.
- 125- Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, et al. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57: elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med* 2006;203:1357-1369.
- 126- Migueles S, Sabbaghian MS, Shupert WL, et al. HLA-B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2709-2714.

- 127- Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebeanec H, et al. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* 1999;162:6942-6946.
- 128- Klein MR, Van der Burg SH, Hovenkamp E, et al. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Gen Virol* 1998;79:2191-2201.
- 129- Keet IP, Tang J, Klein MR, et al. Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1999;180:299-309.
- 130- Hütter G, Nowak D, Mossner M, et al. Long-Term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell transplantation. *N Engl J Med* 2009;360:692-698.
- 131- Levy J. Not an HIV cure, but encouraging new directions. *N Engl J Med* 2009;360:724-725
- 132- Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 1997;16:100-103.
- 133- Martin MP, Dean M, Smith MW, et al. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 1998;282:19907-19011.

- 134- Salkowitz JR, Bruse SE, Meyerson H, et al. CCR5 promoter polymorphism determines macrophage CCR5 density and magnitude of HIV-1 propagation in vitro. *Clin Immunol* 2003;198:234-240.
- 135- Hladik F, Liu H, Speelman E, et al. Combined effect of CCR5-Δ32 heterozygosity and the CCR5 promoter polymorphism -2459A/G on CCR5 expression and resistance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Virol* 2005; 79:11677-11684.
- 136- Péraire J, Broch M, Domingo P, et al. Absence of CXCR4 C-terminal polymorphisms in HIV-1 infected and uninfected Spaniards. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42:382-383.
- 137- Louisirirochanakui SL, Roongpisuthpong A, Nakayama EE, et al. Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: Association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1 negative status. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29:314-315.
- 138- Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, et al. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med* 1998;4:350-353.
- 139- Anzala AO, Ball TB, Rostron T, et al. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. *Lancet* 1998;351:1632-1633.

- 140- Mulherin SA, O'Brien TR, Ioannidis JP, et al. Effects of CCR5-Delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: The protection varies with duration of infection. *AIDS* 2003;17:377-387.
- 141- Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* 2000;287:2274-2277.
- 142- McDermott DH, Colla JS, Leeberg CA, et al. Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease. *Science* 2000;290:2031a.
- 143- Faure S, Meyer L, Genin E, et al. Deleterious genetic influence of CX3CR1 genotypes in HIV disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;32:335-337.
- 144- Winkler C, Modi W, Smith M, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE study. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* 1998;279:389-393.
- 145- McDermott DH, Beecroft MJ, Kleeburger CA, et al. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2000;14:2671-2678.

- 146- Liu H, Chao D, Nakayama EE, et al. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4581-4585.
- 147- Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 2004;4:868-877.
- 148- Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, et al. APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* 2004;305:645.
- 149- Martin MP, Gao X, Lee Jh, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002;31:429-434.
- 150- Martin MO, Qi Y, Gao X, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 2007;39:733-740.
- 151- Carrington M, Martin MP, Van Bergen J. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends Microbiol* 2008;16:620-627.
- 152- Boulet S, Kleyman M, Kim JY, et al. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS* 2008;31:1487-1491.

- 153- Williams PL, Currier JS, Swindells S. Joint effects of HIV₁ RNA levels and CD4 lymphocyte cells on the risk of specific opportunistic infections. *AIDS* 1999;13: 1035-1044.
- 154- Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, et al. HIV-specific CD8⁺ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 2002;3:1061-1068.
- 155- Betts MR, Nason MC, West SM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T clls. *Blood* 2006;107:4781-4789.
- 156- Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:7239-7244.
- 157- Emu B, Sinclair E, Favre D, et al. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol* 2005; 79:14169-14178.
- 158- Boaz MJ, Waters A, Murad S, et al. Presence oh HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2⁺ and CD28+IL-2⁺ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* 2002;169:6376-63-85.

- 159- Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, et al. Identification of CX3CR1: a chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV. *J Biol Chem* 1998;273:23799-23804.
- 160- Hendel H, Winkler C, An P, et al. Validation of genetic case-control studies in AIDS and application to the CX3CR2 polymorphism. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26:507-511.
- 161- Kwa D, Boesser-Nunnink B, Schuitemaker H. Lack of evidence for an association between a polymorphism in CX3CR1 and the clinical course of HIV infection or virus phenotype evolution. *AIDS* 2003;17:759-761.
- 162- Liu MX, Wang FS, Hong WG, et al. Distribution of HIV-1 coreceptor CX3CR1 allelic polymorphisms in general population, HIV-1 high-risk group and HIV carriers of Chinese indigenous Han and Uygur people. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2003;24:595-598.
- 163- Puissant B, Abbal M., Blancher A. polymorphism of human and primate RANTES, CX3CR1, CCR2 and CXCR4 genes with regard to HIV/SIV infection. *Immunogenetics* 2003;55:275-283.
- 164- Garin A, Tarantino N, Faure S, et al. Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors. *J Immunol* 2003;171:5305-5312.

- 165- Vidal F, Viladés C, Domingo P, et al. Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the *CX3CR1*Δ249I variant allele. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:527-531
- 166- Suresh P, Wanchu A, Sachdewa RK, Bhatnagar A. Gene polymorphism oin *CCR5*, *CCR2*, *CX3CR1*, *SDF-1* and *RANTES* in exposed but uninfected partners of HIV-1 infected individuals in North India. *J Clin Immunol* 2006;26:476-478.
- 167- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a *CX3C* motif. *Nature* 1997;385:640-644.
- 168- Pan Y, Lloyd C, Dolich S, et al. Neurotactin, a membrane anchored chemokine upregulated in brian inflammation. *Nature* 1997;387:611-617.
- 169- Rossi DL, Hardinam G, Copeland zng, et al. Cloning and characterization of a new type of mouse chemokine. *Genomics* 1998;47:163-170.
- 170- Hesketh J. 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochem Soc Translat* 2004; 32:990-993.
- 171- Kozak M. How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs?. *Gene* 2004;343:41-54.

- 172- Foussat A, Bouchet-Deelbos L, Berrebi D, et al. deregulation of the expression of the fractalkina/fractalkina receptor complex in HIV-1-infected patients. *Blood* 2001; 98:1678-1686
- 173- Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic control. *J Exp Med* 1998;188:1413-1419.
- 174- Fraticelli PP, Sironi M, Bianchi G, et al. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest* 2001;107:1173-1181.
- 175- Zeng Y, Jiang J, Huerbner N, et al. Fractalkine gene therapy for neuroblastoma is more effective in combination with targeted IL-2. *Cancer Letters* 2005;228:187-193.
- 176- Frade JM, Llorente M, Mellado, et al. The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as a coreceptor for HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1997; 100:497-502.
- 177- Smith MW, Dean M, Carrington M, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Haemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 1997;277:959-965.

- 178- Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, et al. A CCR2 V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS* 2004;26:729-738.
- 179- Shrestha S, Strathdee SA, Galai N, et al. Behavioral risk exposure and host genetics of susceptibility to HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2006;193:16-26.
- 180- Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* 1998;4:350-353.
- 181- Shrestha S, Strathdee SA, Galai N, et al. Behavioral risk exposure and host genetics of susceptibility to HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2006;193:16-26.
- 182- Eugen-Olsen J, Iversen AK, Benfield TL, et al. Chemokine receptor CCR2b 64I polymorphism and its relation to CD4 T-cell counts and disease progression in a Danish cohort of HIV-infected individuals. *Copenhagen AIDS Cohort. J Acquir Immune Defic Syndr* 1998;18:110-116.
- 183- Kostrikis LG, Neumann AU, Thomson 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. *J Virol* 1999; 73:10264-10271.

- 184- Liu H, Hwangbo CF, Huges MD, et al. Genetic influences of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2003;188:1461-1472.
- 185- Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:344-348.
- 186- Letendre S, Marquie-Beck J, Shing KK, et al. The monocyte chemotactic protein-1 -2518G allele is associated with elevated MCP-1 concentrations in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 2004;14:161-165.
- 187- Mc Dermott DH, Yang Q, Kathiresan S, et al. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005;112:1113-1120.
- 188- Tang J, Kaslow RA. The impact of host genetics on HIV infection and disease progression in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003;17(Suppl 4):S51-S60.
- 189- Modi WS, Goedert JJ, Strathdee S, et al. MCP-1-MCP-3-Eotaxin gene cluster influences HIV-1 transmission. *AIDS* 2003;17:2357-2365.

- 190- Shing KK, Hugues MD, Chen J, et al. Impact of MCP-1-2518-G allele on the HIV-1 disease of children in United States. *AIDS* 2006;20:475-478.
- 191- Fang G, Kuiken C, Weiser B, et al. Long-term survivors in Nairobi: complete HIV-1 RNA sequences and immunogenetic associations. *J Infect Dis* 2004;190:697-701.
- 192- Sing KK, Barroga CF, Hughes MD, et al. Genetic influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1(HIV-1) related disease progression and neurological impairment in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2003;188:1461-1472.
- 193- Philpott S, Burger H, Tarwater PM, et al. CCR2 genotype and disease progression in a treated population of IV type-1-infected women. *Clin Infect Dis* 2004;39:861-865.
- 194- Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, et al. Infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13795-13800.
- 195- Modi WS, Goedert JJ, Strathdee S, et al. MCP-1-MCP-3-Eotaxin gene cluster influences HIV-1 transmission. *AIDS* 2003;17:2357-2365.

