

11262  
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS  
SEDE SUR

TITULO DEL PROYECTO

CARACTERIZACION VIROLOGICA E INMUNOLOGICA  
DE INDIVIDUOS MEXICANOS CON INFECCION POR  
EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA  
CON PROGRESION LENTA DE LA ENFERMEDAD

A L U M N A :

**ANGELINA VILLASIS KEEVER**

TUTOR ACADEMICO: DR. GUILLERMO RUIZ-PALACIOS Y SANTOS

CO-TUTOR: DR. LUIS ENRIQUE SOTO RAMIREZ

284059

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

### CARACTERIZACIÓN VIROLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE INDIVIDUOS MEXICANOS CON INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH-1) CON PROGRESIÓN LENTA DE LA ENFERMEDAD

Algunos polimorfismos se han asociado con retraso en la progresión de la enfermedad en personas con VIH. En estos pacientes no se conoce cual es el valor de una sola determinación de carga viral (CV) y células CD4+ para evaluar riesgo de progresión.

**Objetivos.** Evaluar en lentos progresores (LP) y en progresores típicos (PT) la frecuencia de genotipos *CCR5Δ32*, *CCR2b* y *SDF-13'A* y la curva de descenso de linfocitos CD4+ durante un año de seguimiento

**Métodos.** Inclusión. LP:  $\geq 7$  años de diagnóstico, sin tratamiento antirretroviral y  $\geq 400$  CD4+/mL. PT:  $< 5$  años de diagnóstico,  $< 400$  CD4+/mL o disminución  $> 20\%$  en 6 meses. Se extrajo DNA de CMSP de cada paciente y se amplificó por RCP. Se evaluaron los genotipos mediante el uso de las siguientes enzimas de restricción: *MspI* (*SDF-13'A*), *EcoRI* (*CCR5Δ32*) y *BspBI* (*CCR2b64I*). A los pacientes que no recibieron tratamiento se determinó CV y CD4+ cada 6 meses.

**Resultados.** Se evaluaron 15 LP y 20 PT, la frecuencia alélica del genotipo *CCR5Δ32* fue 0.03 en LP y 0.025 en PT, para *CCR2b64I* 0.17 y 0.2 y para *SDF-13'A* 0.12 y 0.16 respectivamente (todos  $p > 0.05$ ). La disminución en CD4+ en LP fue  $-1.7$  y en PT  $-38$  cels/paciente/año.

**Discusión.** La frecuencia de los genotipos estudiados es igual en individuos mexicanos LP y PT, se deben investigar otros factores relacionados. En estos pacientes la CV no predice la disminución de CD4+. En individuos asintomáticos con CD4+  $> 400$ /mL el inicio de tratamiento debe basarse en al menos dos determinaciones de CV y linfocitos CD4+.

## RESUMEN EN INGLÉS

### Virologic and immunologic characterization of HIV-1 infected Mexican slow progressors

Certain genotypes (*CCR5Δ32*, *CCR2b641* and *SDF-13'A*) have been associated with a delay in the progression of the disease in HIV infected slow progressors (SP). There is very little information about the utility of a single viral load (VL) measurement in these patients.

**Objective.** To compare in Mexican SP and typical progressors (TP) the frequency of *CCR5Δ32*, *CCR2b641* and *SDF-13'A* and the decline curve of CD4+ cells during one year of follow-up

**Methods.** Inclusion criteria: SP:  $\geq 7$  years of diagnosis, no previous antiretroviral treatment and  $CD4+ > 400/mm^3$ . TP:  $< 5$  years since diagnosis,  $< 400 CD4+$  or  $> 20\%$  decrease in 6 months. DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and amplified by PCR. The genotypes were determined by the following restriction enzymes: MsP1 (*SDF-13'A*), ECORI (*CCR5Δ32*) BspBI (*CCR2b641*). CD4+ cell count and VL were evaluated every six months in treatment naive patients.

**Results.** 15 SP and 20 TP were evaluated. The allelic frequency of *CCR5Δ32* was 0.03 in SP and 0.025 in TP, for *CCR2b641* 0.17 and 0.2 and for *SDF-13'A* 0.12 y 0.16 respectively (all,  $p > 0.05$ ). The CD4+ cell count diminution was  $-1.7$  in SP and  $-38$  cells/patient/year in TP.

**Discussion.** In Mexican population the frequency of the genotypes evaluated is not different on SP than in TP. In SP plasma VL does not predict CD4+ T cell diminution. In asymptomatic patients with CD4+ cell counts  $> 400 \times 10^6/L$  the selection for treatment should be based on at least two determinations of VL and CD4+T cells.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	4
RESUMEN EN INGLÉS .....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) .....	6
El SIDA en México .....	7
El virus de la inmunodeficiencia humana .....	8
El ciclo viral .....	9
Historia natural de la enfermedad .....	10
Carga viral .....	12
Individuos con resistencia a la infección .....	13
Individuos sin progresión de la enfermedad .....	14
Prevalencia de delección en los genes de los receptores de quimiocinas .....	15
Tratamiento antirretroviral .....	17
JUSTIFICACIÓN .....	20
OBJETIVOS .....	20
OBJETIVO PRINCIPAL .....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
DISEÑO DEL ESTUDIO .....	21
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	22
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	23
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	23

TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	23
Captación de los enfermos.....	24
Escrutinio.....	24
Seguimiento.....	25
MÉTODOS DE LABORATORIO.....	25
RESULTADOS.....	28
Determinación de linfocitos CD4+ y carga viral.....	28
Genotipos.....	29
Curva de linfocitos CD4+.....	32
Curva de linfocitos CD4 en progresores típicos.....	34
Curva de linfocitos CD4 en lentos progresores.....	35
DISCUSIÓN.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## INTRODUCCIÓN

### ***El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)***

Desde la descripción del primer caso de SIDA hace ya más de 15 años, ésta enfermedad se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes en todo el mundo, con afección creciente de países en desarrollo y de poblaciones no privilegiadas en el mundo industrializado. Se estima que en diciembre de 1999 había 34.3 millones de personas infectadas, que desde el inicio de la epidemia habían muerto 18.8 millones debido a la enfermedad, de los cuales 3.8 fueron niños; 2.8 millones de esas muertes ocurrieron en 1999. Se calcula que actualmente existen en promedio 15,000 nuevas infecciones al día.

Durante los primeros 10 años de la epidemia, el mecanismo de transmisión en los casos conocidos era predominantemente por contacto homosexual; actualmente la transmisión por contacto heterosexual se ha incrementado considerablemente aún en países desarrollados en donde además se ha observado un aumento en el número de personas infectadas por uso de drogas intravenosas. En contraste, la transmisión a través de transfusión de productos sanguíneos ha sido prácticamente eliminada en aquellos países en donde se ha instituido como prueba de escrutinio de donadores la detección de anticuerpos en sangre.

## ***El SIDA en México***

México ocupa el decimotercer lugar por el número de casos notificados en el ámbito mundial y el tercero en el continente americano con una tasa de 29.9 casos por 100,000 habitantes.

Los primeros casos de SIDA fueron reportados en 1983. Hasta diciembre de 1999, se habían notificado 38,390 casos de SIDA, considerando el subregistro y la notificación tardía, se estima que han ocurrido 51,000 casos y que actualmente entre 150,000 y 200,000 personas viven con infección asintomática.

De los 20,103 hombres registrados con factor de riesgo conocido, en más del 90% se asoció a transmisión sexual. En cambio de los 3,000 casos de SIDA en mujeres adultas, el 41.9% se debe a transfusión sanguínea y el 55.6% a transmisión heterosexual; éstas dos vías principales de transmisión en mujeres han cambiado a lo largo del tiempo: la transfusional que representaba el 100% de los casos en 1985, ha descendido a sólo una tercera parte, y la heterosexual en 1997 ha representado más del 60% de los casos en mujeres en edad reproductiva.

La mortalidad por SIDA en México tiene un crecimiento exponencial: en 1987 la tasa de muerte era de 3.6 por cada 100,000 habitantes, para 1988 se duplicó y para 1992 fue de 29.4; a partir de entonces, es una de las 20 primeras causas de mortalidad general y, actualmente representa la sexta causa de muerte en hombres de 25 a 44 años con una tasa de 1.3 muertes por cada 1,000 hombres<sup>1</sup>.

### ***El virus de la inmunodeficiencia humana***

En 1984 fue descubierto el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) como el agente causante del SIDA<sup>2,3</sup>. El VIH-1 es un retrovirus, cuya partícula está compuesta por una membrana externa lipídica de dos capas, una nucleocápside y un núcleo denso. Existen 72 proyecciones de la capa externa de la membrana formadas por la proteína de cubierta gp120 unida a la porción transmembranal gp41. La nucleocápside está compuesta por una proteína de matriz externa (Gag), p17 (también llamada antígeno de matriz) rodeando al núcleo que contiene dos bandas completas de RNA. El núcleo tiene una superficie externa compuesta por proteínas p24 y p6.

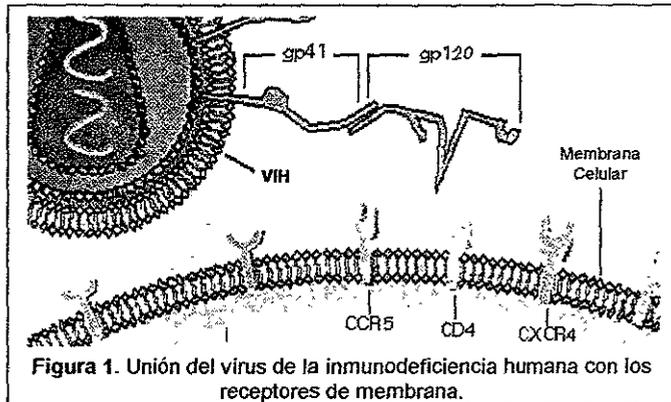
El DNA proviral del VIH-1 tiene una longitud de 9.7 kilobases. En los extremos terminales del DNA proviral se encuentran secuencias idénticas repetidas que contienen fragmentos que son importantes en la regulación de la transcripción y son los sitios críticos que determinan la integración del virus, éstos sitios son llamados "secuencias repetidas" (LTR "long terminal repeats").

La diversidad genética del VIH-1 es secundaria a dos eventos: mutación y recombinación. Las mutaciones son consecuencia de función inadecuada de la TR, la enzima que replica el material genómico del virus. Se produce aproximadamente una mutación por cada ciclo viral. La recombinación involucra intercambio de algunas regiones entre diferentes virus, esto origina variantes de virus muy diferentes en un ciclo único.

## El ciclo viral

El ciclo de replicación viral consta de varias fases: entrada, transcripción inversa del genoma viral, integración, expresión del gen, ensamblaje, salida y maduración.

La replicación inicia con la unión del VIH-1 a su receptor de mayor afinidad, la molécula CD4 que se encuentra en la superficie de las células susceptibles,



que son principalmente linfocitos y macrófagos (figura 1). Otras moléculas de la superficie celular participan como correceptores en la entrada de VIH-1 a las células: CXCR4 (antes fusina) y CCR5 (receptor-5 de quimiocinas)<sup>5-10</sup>. Ambos sirven como receptores para quimiocinas, una familia de agentes polipeptídicos que fisiológicamente modulan la función quimiotáctica y fagocítica de las células T<sup>5,9</sup>. Otros dos receptores de quimiocinas, CCR-2B y CCR-3 son utilizados por una minoría de virus, pero la frecuencia con la que cada uno de éstos correceptores es utilizado *in vivo* no se conoce<sup>6,8</sup>.

La unión a la molécula celular CD4 se lleva a cabo a través de la proteína de cubierta viral gp120, ésta unión produce cambios conformacionales en gp120 y en CD4 que exponen epítopes de la cubierta (V1/V2 y V3) favoreciendo la unión al

receptor CCR5 en macrófagos. Años después de mutación constante se puede alterar el gen para gp120 de manera que ocurre un cambio en la afinidad del virus a su segundo receptor. Así, éste cambio genético ocasiona que la región que identifica a CCR5 se una de manera más eficiente al receptor CXCR4<sup>10</sup>, que se encuentra en los linfocitos T. A partir de entonces, en la población de VIH-1 predomina la variante T-trópico. Después de la unión del virus a CCR5 o CXCR4, la región gp41 de cubierta interactúa con un dominio en la membrana celular, que permite la fusión del virus a la membrana depositando el núcleo en el citoplasma. Una vez en la célula, el retrovirus inserta sus genes en el cromosoma del huésped, de ésta manera, se producen nuevas partículas virales y se asegura que la información de los genes virales pase a cada nueva generación de células, cada vez que la célula se replica.

### ***Historia natural de la enfermedad***

La historia natural de la infección por el VIH-1 es compleja y depende de la interacción de factores virales y del huésped. Ciertas características del virus condicionan diferencias en la virulencia; mientras que algunos factores del huésped se traducen en una susceptibilidad variable a la infección<sup>12-14</sup>.

El curso típico de la infección por VIH-1 inicia con una enfermedad aguda, de gravedad variable, que produce una respuesta inmune temprana tanto humoral como celular que invariablemente reduce la replicación viral, logrando que disminuya el virus en sangre, pero sin eliminarlo completamente del organismo<sup>15,16</sup>, se produce después un período prolongado de latencia clínica durante el cual

existe replicación viral persistente<sup>17-20</sup> y disminución progresiva del número de células T CD4+<sup>21</sup>, lo cual lleva a la fase final de la infección por VIH, el desarrollo de SIDA, que es la manifestación más grave de la enfermedad. A partir de la presencia de SIDA los enfermos tienen una expectativa de vida promedio de un año.

La duración del período de latencia clínica varía ampliamente:

- 1) Progresores típicos. Constituyen el 80% de las personas infectadas por VIH en ellos la progresión a SIDA ocurre en una mediana de tiempo de 7 a 10 años<sup>22-24</sup>.
- 2) Progresores rápidos (10-15%). Estos enfermos desarrollan SIDA en los primeros 2 a 3 años de la infección, y
- 3) Progresores lentos o no progresores. Aproximadamente el 5% de los casos permanecen infectados y sin síntomas durante períodos de 10 a 12 años o mayores<sup>25</sup>.

La causa de desarrollo de SIDA es la inducción de inmunodeficiencia por el VIH-1, que ocasiona alteraciones en el número y en la función de las células CD4+. La disminución en el número de células CD4+ es el mejor parámetro de laboratorio para evaluar el deterioro del sistema inmune. Una caída por debajo de 200 CD4+/ $\mu$ l es un criterio definitorio de SIDA, debido a que se asocia con un riesgo muy elevado de desarrollo infecciones oportunistas y neoplasias.

## **Carga viral**

Durante el período de latencia clínica la producción de partículas virales es enorme, en promedio de 100,000,000 a 1,000,000,000 por día<sup>20,26,27</sup>.

La cuantificación de la carga viral en plasma por ensayos cuantitativos de RNA de VIH-1 permite evaluar el estadio de la enfermedad, la progresión, el riesgo de transmisión y la respuesta a antirretrovirales<sup>29,32</sup>.

Los resultados de CV y CD4+ dan información muy importante acerca del estado virológico e inmunológico del paciente y del riesgo de progresión de la enfermedad.

La carga viral en plasma ha mostrado ser un buen marcador pronóstico en todos los estadios de la infección. Los estudios de ACTG (AIDS Clinical Trials Group), que incluyeron pacientes con cuentas de linfocitos CD4+ entre 0 y 500 cel/mL han mostrado que el riesgo de progresión asociado con altos niveles de CV es independiente de la cuenta de linfocitos CD4+ y del fenotipo viral.

Un estudio retrospectivo de pacientes en fase de seroconversión en el estudio MACS mostró los pacientes con niveles plasmáticos de CV >100,000 copias/mL en los 6 meses de seroconversión tenían 10 veces más probabilidades de progresar a SIDA en 5 años que los pacientes con niveles menores. En otro estudio se evaluó el riesgo de progresión en 181 pacientes sanos seropositivos que fueron estratificados de acuerdo a los niveles basales de CV<sup>46</sup> (figura 2). Los pacientes en el cuartil más alto (CV >36,270 copias/mL) tenían una mediana de tiempo de progresión a SIDA de 3.5 años y una mediana de supervivencia de 5.3 años. Menos de la mitad de los pacientes en el cuartil más bajo (CV <4,500 copias/mL)

progresaron a SIDA o murieron después de 10 años (mediana de supervivencia >10 años). En contraste no se encontró diferencia en las tasas de progresión cuando se estratificaron los pacientes de acuerdo a la cuenta basal de linfocitos CD4+. En pacientes con >500 CD4+/mL (mediana 780 cels/mL) más del 70% de quienes tenían una CV >10,200 copias/mL progresaron a SIDA y murieron en 10 años comparado con menos del 30% de quienes tenían <10,200 copias/mL.

En un estudio de seguimiento de 1,600 de estos pacientes se evaluaron los pacientes en 5 categorías basándose en los niveles plasmáticos de CV. Se encontraron diferencias significativas en la tasa de progresión a SIDA y muerte. Cuando se incorporaron al análisis de manera conjunta CV y CD4+ la estimación fue aún mejor<sup>44</sup>. El seguimiento a largo plazo de 330 pacientes del estudio SEROCO en Francia mostró un claro incremento en los niveles de CV con el tiempo, este incremento fue mayor en los pacientes que desarrollaron SIDA<sup>47</sup>.

### ***Individuos con resistencia a la infección.***

En raras ocasiones se han descrito personas que permanecen sin infección a pesar de tener historia de múltiples exposiciones de riesgo<sup>9,33</sup>. Las células CD4+ de éstos individuos aunque resistentes a la infección por virus macrófago-trópico (por incapacidad del virus de unirse al receptor CCR-5), son infectadas por cepas T-trópico.

Hasta el 20% de los individuos expuestos no infectados tienen un defecto homocigoto en el gen del receptor de quimiocinas CCR-5<sup>7</sup>, una delección de 32 pares de bases en la región que corresponde a la segunda asa extracelular, que

ocasiona que se produzca una molécula incompleta que no es capaz de llegar a la superficie celular. Esta delección no parece tener una condición clínica en los individuos afectados, pero trae como resultado, que las células sean resistentes a la infección por virus macrófago-trópico. Al parecer, el defecto en CCR-5 es el responsable primario de que éstos individuos permanezcan sin infección a pesar de exposición repetida al VIH-1. Sin embargo, se han reportado algunos casos de individuos homocigotos para la delección del gen CCR-5 que fueron infectados con el VIH-1 a través de contacto sexual, al parecer por cepas T-trópico altamente virulentas, que generalmente se encuentran solo en estadios tardíos de la infección<sup>34</sup>. Lo anterior pone de manifiesto que el receptor aunque importante, no es esencial para la transmisión de la enfermedad.

### ***Individuos sin progresión de la enfermedad***

Los individuos no progresores o progresores lentos, representan un grupo heterogéneo de pacientes en quienes el estado de no-progresión de la enfermedad resulta probablemente de una muy buena respuesta inmune contra el VIH, de pobre replicación viral o de ambas<sup>37</sup>.

*Carga viral.* La replicación del VIH-1 es de 4 a 20 veces menor en las células mononucleares de sangre periférica y en tejido linfoide de éstos pacientes que en personas con progresión típica de la enfermedad<sup>28</sup>.

*Polimorfismo de genes que codifican receptores de quimiocinas.* Estos individuos tienen mayor probabilidad de ser heterocigotos para  $\Delta 32CCR5$  que la población general. Las células heterocigotas para  $\Delta 32CCR5$  tienen una capacidad

4-10 veces menor de infectarse con VIH-1, y aunque estos individuos no son resistentes a la exposición de VIH-1, el periodo de latencia clínica, así como el tiempo en el cual las células T CD4+ caen por debajo de  $200/\text{mm}^3$  es en promedio dos o tres años más largo. Se han identificado alteraciones genéticas puntuales que también confieren disminución en la capacidad infectante de células blanco *in vitro*: en el nucleótido 303 (T-A) de CCR-5 y en los genes de otros receptores: la mutación *CCR2b64I* del receptor CCR2b, y del ligando de CXCR4, *SDF-3'UTR-801G-A*, éste último al parecer se asocia con protección en estadios avanzados de la infección.

### ***Prevalencia de delección en los genes de los receptores de quimiocinas***

La delección del gen *CCR5* no se distribuye de manera homogénea en la población mundial: se encuentra prácticamente ausente en África, Asia y en nativos de América; es rara en Afro-Americanos (frecuencia alélica 0,0289) e hispanoamericanos (0.037), y tiene una prevalencia variable en caucásicos: en Europa se ha observado un gradiente (0.092 – 0.149), es mayor en el norte y disminuye progresivamente hasta ser indetectable en Arabia Saudita (cuadro 1). En población abierta mexicana no se han encontrado individuos con delección homocigota, pero se ha demostrado una frecuencia de 2.7% de heterocigotos con una frecuencia alélica de 0.014, que no parece estar determinada por la presencia de ancestros caucásicos. La delección *CCR2b64I* tiene una frecuencia alélica de 0.098 en caucásicos, 0.17 en hispanos, 0.25 en asiáticos, 0.151 en afro-

**Cuadro 1.** Prevalencia de la delección *CCR5* $\Delta$ 32<sup>34-36</sup>

Población	Genotipo <i>CCR5</i> (%)		
	2 copias de alelo estándar (W/W)	2 copias alelo mutante ( $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32)	1 alelo estándar y 1 alelo mutante (W/ $\Delta$ 32)
<b>Caucásicos (Europa)</b>	73.0-82.0	1.0-3.0	16.0-24.0
Población general	78.0	0-0.002	22.0
Alto riesgo (VIH+)	74.0	6	20.0
Alto riesgo (VIH-)			
<b>Caucásicos (EUA)</b>			
Población general	79-85	0-1.4	13.3-21
Alto Riesgo(VIH+)	77-80	0	20-22
Alto Riesgo(VIH-)	74-80	3.6-20	0-21
<b>Afro-Americanos</b>			
Población general	94-96.6	0	3.3-6.0
Alto riesgo (VIH+)	97.7	0	2.3
Alto riesgo (VIH-)	50	0.25	0
<b>Hispanos (EUA)</b>			
Población general	93	0.3	6.9
Alto riesgo (VIH+)	93	0	6.7
Alto riesgo(VIH-)	91.7	0	8.3
<b>Otros</b>			
Venezolanos, Africanos, Este de Asia	100.0	0.0	0.0

### Tratamiento antirretroviral

El tratamiento antirretroviral cambió dramáticamente en 1996. Con la disponibilidad de nuevos medicamentos, particularmente los inhibidores de proteasa, ha habido una franca disminución de la morbilidad y mortalidad relacionada con esta infección.

Con el tiempo ha sido evidente que existen problemas con el tratamiento antirretroviral: efectos colaterales e interacciones medicamentosas que dificultan el apego, y que tienen un impacto negativo en la calidad de vida. Se observa con

frecuencia complicaciones metabólicas a largo plazo<sup>48,49</sup>. Ocurre falla al tratamiento en una elevada proporción de pacientes, con reportes de algunas cohortes clínicas con tasas de falla de 50% o más<sup>50,51</sup>. Aún en pacientes con CV indetectable por años, se puede detectar evidencia de replicación viral persistente<sup>52</sup>. Finalmente, debido a los reservorios celulares de vida media larga (linfocitos CD4+ de memoria), la erradicación viral hoy en día parece menos probable que en 1996.

Hasta el momento no se ha demostrado beneficio clínico a largo plazo con tratamiento antirretroviral en los pacientes con CD4+ mayor a 500 células/mL. Los factores que favorecen inicio temprano incluyen lograr el control de la replicación y mutación, prevenir la progresión de la inmunodeficiencia, retrasar la progresión a SIDA, prolongar la sobrevida, y disminuir el riesgo de transmisión viral.

Actualmente se recomienda que la decisión de iniciar tratamiento antirretroviral en fases tempranas de la enfermedad debe realizarse de manera individualizada y ser resultado del balance de los posibles riesgos y beneficios. Uno de los factores que deben considerarse para la decisión de inicio temprano de tratamiento incluye la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad, el mejor parámetro con que contamos actualmente para esta evaluación es la determinación de carga viral en plasma.

Los niveles de CV y de células CD4+ se utilizan para decidir inicio de tratamiento

Debido a lo complejo del tratamiento antirretroviral existen algunos grupos de expertos que han publicado recomendaciones de tratamiento (cuadro 2)<sup>42,54</sup>. En

pacientes con cuentas de CD4+ por arriba de 500/mL y CV entre 5,000 y 30,000 copias/mL se recomienda considerar tratamiento basado en el riesgo de progresión que se ha observado en pacientes con niveles más altos de CV<sup>44</sup>.

Se considera que los pacientes con >500 CD4+/mL y CV <50,000 copias tienen bajo riesgo de progresión. Debido a la complejidad del tratamiento, se considera diferir el inicio del mismo pero continuar su monitorización<sup>45</sup>.

**Cuadro 2. Recomendaciones actuales para iniciar tratamiento<sup>42</sup>**

CD4+/mL	RNA VIH en plasma copias/mL		
	<5,000	5,000-30,000	>30,000
<350	Recomendar	Recomendar	Recomendar
350-500	Considerar	<b>Recomendar</b>	<b>Recomendar</b>
>500	Diferir	<b>Considerar</b>	<b>Recomendar</b>

Estas recomendaciones se basan en la observación de la utilidad de los niveles de CV en los primeros meses de seroconversión para predecir progresión a corto plazo

En la práctica clínica es difícil conocer la fecha de seroconversión. Hasta el momento no se ha evaluado cual es el valor a corto o mediano plazo de una determinación de CV en pacientes asintomáticos con infección crónica y niveles de CD4+ elevados.

El avance en el conocimiento de la infección por VIH-1 ha resaltado la importancia de la interacción de las características del virus y las propias del huésped en la evolución de la enfermedad, con diferencias importantes en el pronóstico e incluso en la respuesta a las medidas terapéuticas desarrolladas hasta la actualidad. De ahí que el conocimiento de estos aspectos en los

individuos afectados de nuestro medio, es primordial para realizar un mejor manejo, en términos medidas de prevención y de tratamiento.

## **JUSTIFICACIÓN**

La evolución de la infección por VIH es responsable de la compleja interacción entre el propio virus (VIH-1) y el huésped. Las características que determinan el pronóstico parecen variar de acuerdo a la región geográfica y ser consecuencia de diferencias étnicas del huésped y de las características virales.

Los pacientes con infección por VIH-1 definidos como no progresores (LP) son la población ideal para el estudio de los parámetros epidemiológicos, virológicos e inmunológicos que pueden ser responsables del pronóstico de la enfermedad.

Hasta el momento no existen estudios en enfermos mexicanos que evalúen estas características, y su conocimiento permitiría mejorar el abordaje terapéutico ante un mejor entendimiento de esta compleja enfermedad.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Determinar algunas de las características genotípicas de individuos mexicanos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 que cursen con infección prolongada sin progresión de la enfermedad (LP) y compararlas con las características de individuos infectados con VIH-1 que tengan progresión típica (PT) de la enfermedad.

individuos afectados de nuestro medio, es primordial para realizar un mejor manejo, en términos medidas de prevención y de tratamiento.

## **JUSTIFICACIÓN**

La evolución de la infección por VIH es responsable de la compleja interacción entre el propio virus (VIH-1) y el huésped. Las características que determinan el pronóstico parecen variar de acuerdo a la región geográfica y ser consecuencia de diferencias étnicas del huésped y de las características virales.

Los pacientes con infección por VIH-1 definidos como no progresores (LP) son la población ideal para el estudio de los parámetros epidemiológicos, virológicos e inmunológicos que pueden ser responsables del pronóstico de la enfermedad.

Hasta el momento no existen estudios en enfermos mexicanos que evalúen estas características, y su conocimiento permitiría mejorar el abordaje terapéutico ante un mejor entendimiento de esta compleja enfermedad.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Determinar algunas de las características genóticas de individuos mexicanos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 que cursen con infección prolongada sin progresión de la enfermedad (LP) y compararlas con las características de individuos infectados con VIH-1 que tengan progresión típica (PT) de la enfermedad.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Objetivo 1.** Evaluar en individuos LP y PT la frecuencia de los genotipos *CCR-5Δ32*, *CCR2b* y *SDF-13'A* (ligando de CXCR4),

**Hipótesis 1.** El 60% de los individuos LP y menos del 10% de los progresores típicos serán heterocigotos para *CCR5Δ32*, y no habrá diferencias en los polimorfismos de *CCR2b64l* y *SDF-13'A*.

**Objetivo 2.** Evaluar la curva de descenso de linfocitos CD4+ durante un año de seguimiento en individuos LP y en PT.

**Hipótesis 2.** La curva de descenso de los linfocitos CD4+ será menos pronunciada en los individuos LP, independientemente de los niveles basales de carga viral en plasma. El descenso promedio de células CD4+ en un año será 50% menor que el de los individuos PT.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio prolectivo, descriptivo y comparativo, que constó de dos fases: una transversal y otra longitudinal. El objetivo 1 se evaluará en la fase transversal y sólo aquellos pacientes que no reciban tratamiento antirretroviral continuarán en la fase longitudinal para cumplir con el objetivo 2.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Objetivo 1.** Evaluar en individuos LP y PT la frecuencia de los genotipos *CCR-5Δ32*, *CCR2b* y *SDF-13'A* (ligando de CXCR4),

**Hipótesis 1.** El 60% de los individuos LP y menos del 10% de los progresores típicos serán heterocigotos para *CCR5Δ32*, y no habrá diferencias en los polimorfismos de *CCR2b64I* y *SDF-13'A*.

**Objetivo 2.** Evaluar la curva de descenso de linfocitos CD4+ durante un año de seguimiento en individuos LP y en PT.

**Hipótesis 2.** La curva de descenso de los linfocitos CD4+ será menos pronunciada en los individuos LP, independientemente de los niveles basales de carga viral en plasma. El descenso promedio de células CD4+ en un año será 50% menor que el de los individuos PT.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio prolectivo, descriptivo y comparativo, que constó de dos fases: una transversal y otra longitudinal. El objetivo 1 se evaluará en la fase transversal y sólo aquellos pacientes que no reciban tratamiento antirretroviral continuarán en la fase longitudinal para cumplir con el objetivo 2.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

### ***No progresores***

- Infección por VIH de  $\geq 7$  años de diagnóstico.
- Linfocitos CD4+  $\geq 450$  células/mL.
- Sin antecedente de ingesta de antirretrovirales o con historia de ingesta una sola droga.

### ***Grupo Control (Progresión típica)***

- Infección por VIH de menos de 5 años de diagnóstico.
- Linfocitos CD4+  $< 450$  células/mL o disminución  $> 20\%$  en 6 meses.

## **FASE LONGITUDINAL**

### ***No progresores***

- Infección por VIH de  $\geq 7$  años de diagnóstico.
- Linfocitos CD4+  $\geq 450$  células/mL.
- Que no reciban tratamiento antirretroviral.

### ***Grupo Control (Progresión típica)***

- Infección por VIH de menos de 5 años de diagnóstico.
- Linfocitos CD4+  $< 450$  células/mL o disminución  $> 20\%$  en 6 meses.
- Que no reciba tratamiento antirretroviral.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

### ***No progresores***

- Que se encuentre dentro de los primeros 2 años de tratamiento con monoterapia antirretroviral.
- Síntomas actuales asociados a infección por VIH.
- Que no acepten participar en el estudio.

### ***Grupo control (Progresión típica)***

- Que no acepten participar en el estudio.

## **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Pérdida del seguimiento.
- Que inicien o cambien tratamiento con antirretrovirales.

## **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

En éste estudio se pretende determinar las diferencias en la frecuencia de algunas de las características del huésped en individuos con infección con VIH LP y con PT de la enfermedad.

El cálculo del tamaño de muestra se basó en las diferentes frecuencias de la delección *CCR5Δ32* reportadas en la literatura. En los LP la frecuencia de la delección es de 60% y menos de 10% en los progresores típicos. De esta forma

utilizando la fórmula de proporciones, con un error  $\alpha$  de 0.05 a dos colas, con un poder de .80 y estimando un 20% de pérdidas:

$$n = \frac{2(PQ)(Z\alpha + Z\beta)^2}{\Delta^2}$$

Se requieren 7 individuos en cada grupo.

### ***Captación de los enfermos***

Se buscaron a los pacientes que llenaran los criterios de inclusión mediante la revisión de los expedientes de la Clínica de SIDA del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. La cohorte de enfermos con infección por VIH data de 1984 y la han formado un total aproximado de 1,400 pacientes.

Se buscaron también candidatos en otras instituciones de la ciudad dedicadas a la atención de enfermos infectados por VIH-1.

Se localizarán a los pacientes para invitarlos a participar y a formar parte de una cohorte que iniciará a partir de éste estudio.

### ***Escrutinio***

A los enfermos que de acuerdo a su expediente clínico se consideraron como candidatos y que aceptaron participar en ingresar al estudio, se les realizó:

- a) Un cuestionario para evaluar la historia de síntomas relacionados con infección por VIH y de ingesta de antirretrovirales;

b) Determinación de linfocitos CD4+ y carga viral, para lo cual se tomó una muestra de 10 mL de sangre.

La determinación de carga viral se realizó cuando los pacientes se encontraban asintomáticos, sin haberse realizado recientemente prueba de tuberculina, y cuando hubieran pasado al menos dos meses de alguna inmunización ya que estas situaciones producen elevaciones transitorias en la carga viral.

### ***Seguimiento***

A los enfermos que llenaron los criterios de inclusión se realizó los exámenes de laboratorio encaminados a cumplir los objetivos del estudio (ver métodos de laboratorio). Cada 6 meses después de la fecha de escrutinio, se tomaron muestras de 10 mL de sangre a cada uno de los pacientes que no habían recibido tratamiento, para nueva determinación de linfocitos CD4+ y de carga viral.

### **MÉTODOS DE LABORATORIO**

De cada sujeto se obtuvo una muestra de por lo menos 10 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante (EDTA). De dichas muestras se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante un gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque. El plasma recuperado de ésta separación así como dos alícuotas de CMSP fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y en nitrógeno líquido. Aproximadamente 2,000,000 células fueron destinadas para extracción de DNA

- b) Determinación de linfocitos CD4+ y carga viral, para lo cual se tomó una muestra de 10 mL de sangre.

La determinación de carga viral se realizó cuando los pacientes se encontraban asintomáticos, sin haberse realizado recientemente prueba de tuberculina, y cuando hubieran pasado al menos dos meses de alguna inmunización ya que estas situaciones producen elevaciones transitorias en la carga viral.

### **Seguimiento**

A los enfermos que llenaron los criterios de inclusión se realizó los exámenes de laboratorio encaminados a cumplir los objetivos del estudio (ver métodos de laboratorio). Cada 6 meses después de la fecha de escrutinio, se tomaron muestras de 10 mL de sangre a cada uno de los pacientes que no habían recibido tratamiento, para nueva determinación de linfocitos CD4+ y de carga viral.

### **MÉTODOS DE LABORATORIO**

De cada sujeto se obtuvo una muestra de por lo menos 10 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante (EDTA). De dichas muestras se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante un gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque. El plasma recuperado de ésta separación así como dos alícuotas de CMSP fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y en nitrógeno líquido. Aproximadamente 2,000,000 células fueron destinadas para extracción de DNA.

Las muestras obtenidas se utilizaron de la siguiente manera:

*Determinación del genotipo CCR-5Δ32.* El genotipo se determinó en CMSP mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RPC) de la región que codifica para el receptor CCR-5. De acuerdo con el diseño de los iniciadores (cuadro 3), esta reacción amplifica un producto de 735 pares de bases (pb). Este producto fue digerido con la enzima de restricción EcoRI, de acuerdo al patrón de digestión, se clasificó como: W/W (2 copias del alelo estándar), Δ32/Δ32 (2 copias del alelo mutante) y W/Δ32 (1 copia del alelo estándar y una copia del alelo mutante).

*Mutación puntual CCR-2b64I.* Se amplificó un fragmento de 183 pb (cuadro 3), que se digirió con BsaBI obteniéndose dos fragmentos de 165 y 18 pb en caso de genotipo homocigoto, tres fragmentos en los casos de mutación heterocigota y una sola banda, obviamente de 183 pb, en el caso del gen silvestre.

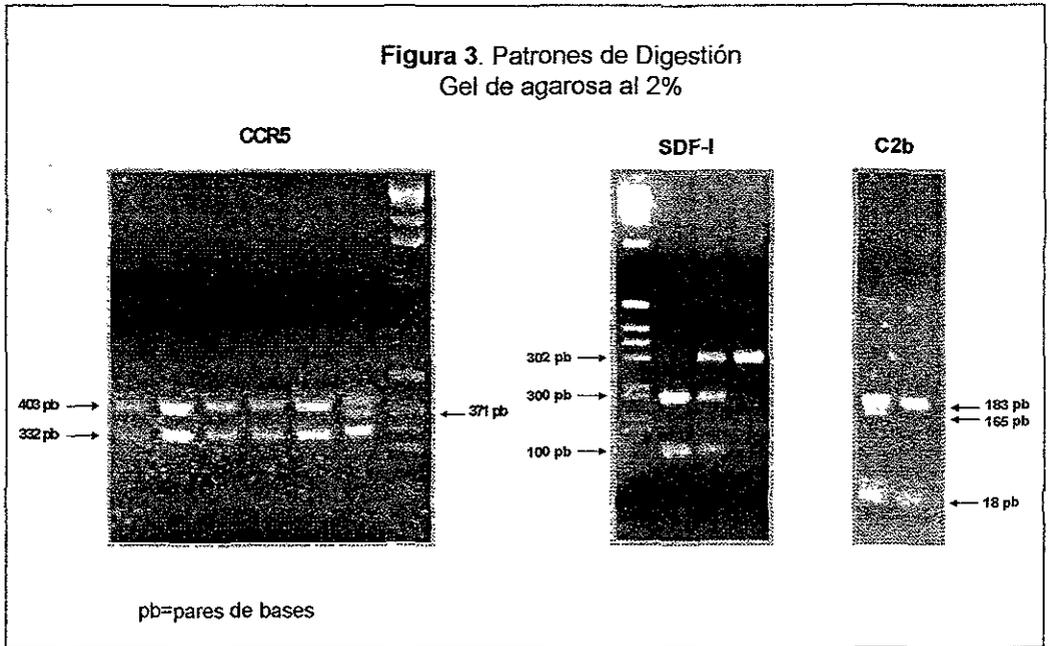
**Cuadro 3. Metodología molecular para la determinación de los genotipos**

Producto RPC	Iniciadores	Enzimas de Restricción	Patrón de digestión (pb)		
			W/W	W/X	X/X
CCR5 735pb	5' CCT-GGC-TGT-CGT-CCA-TGC-TG-3'	EcoRI	403	403	373
	5' CGT-ATC-TAG-AGC-CAT- GTG-CAC-AAC-T-3'		332	371 332	332
CCR2b 183pb	5' TTG-TGG-GCA-ACA-TGA-TGG 3'	BsaBI	183	183	165
	5' CTG-TGA-ATA-ATT-TGC-ACA-TTG-C 3'			165 18	18
SDF-1 302pb	5' CAG-TCA-ACC-TGG-GCA-AAG-CC 3'	MspI		302	302
	5' AGC-TTT-GGT-CCT-GAG-AGT-CC 3'		202 100	202 100	

*Mutación puntual del ligando de CXCR4: SDF-1-3'UTR-801G-A.* Se amplificó un fragmento de 302 pb (cuadro 3), que se digirió con la enzima Msp1.

Todos los fragmentos digeridos se visualizaron en gel de agarosa al 2%, y se clasificaron los genotipos de acuerdo al patrón de digestión (figura 3).

Para corroborar el origen de los productos de la digestión, estos fueron transferidos a una membrana de nylon e hibridizados con una sonda de digoxigenina 11-dUTP que contenía los fragmentos complementarios, la membrana se visualizó por una reacción colorimétrica.



## RESULTADOS

Se evaluaron 38 pacientes (cuadro 4), 15 con progresión lenta de la enfermedad y 23 con progresión típica, con una edad promedio de  $36.6 \pm 9.7$  años (22-61); 5 (14.3%) mujeres y 30 (80%) hombres. En ninguno de los pacientes se conoció la fecha de seroconversión. La mediana de tiempo a partir del diagnóstico de infección por VIH fue de 122 meses (84-161) en el grupo de lentos progresores (LP) y de 8.8 meses (0.1-74 meses) en el grupo de progresores típicos (PT) ( $p < 0.001$ ). Los factores de riesgo de infección fueron homosexualidad en 17 pacientes (48.5%), relaciones heterosexuales en 16 (45.7%), y uso de drogas intravenosas en 2 pacientes (5.7%).

### **Determinación de linfocitos CD4+ y carga viral**

Los niveles de células CD4+ al momento de ingresar al estudio fueron de  $729.9 \pm 344$  (545-1501) células/mL en el grupo LP y de  $347.3 \pm 260$  (24-605) en el de PT ( $p < 0.001$ ). (Cuadro 4)

**Cuadro 4.** Características generales de los pacientes

	Lentos Progresores n=15	Progresores Típicos n=20	p
Edad en años (Md)	38.6 (36)	35.05 (33)	0.2
Mujeres/hombres	2/13	3/17	1.0*
Factor de riesgo de Infección n(%)			
Homosexual	8 (53.3)	9 (55)	0.3
Heterosexual	5 (33.3)	11 (55)	0.8
Drogas intravenosas	2(13.3)	0 (0)	0.17*
Tiempo de evolución meses (DE)	126.2 ± 28	15.6 ± 19	<0.001
CD4+ (DE) cel/mm <sup>3</sup>	729.9 ± 344	347.3 ± 260	0.002

\*prueba exacta de Fisher

## Genotipos

**CCR5Δ32.** De los 38 pacientes evaluados se encontró el genotipo heterocigoto en 2 casos, uno en cada grupo para una frecuencia alélica de .03 (IC 95% 0.0008 - 0.17) en el grupo de LP y de .025 (IC 95% 0.0006 - .13) en el grupo de PT ( $p>0.05$ ).

**CCR2b64I.** En 6 (30%) pacientes del grupo de PT y en 5 (30%) del grupo de LP se encontró el genotipo *CCR2b64I*. Un paciente en cada grupo fue

homocigoto para una frecuencia alélica de 0.17 (IC 95% 0.073-0.32) en PT y de 0.2 (IC95% 0.07-0.38) en LP ( $p>0.05$ ).

**SDF-13'A.** En 9 pacientes se encontró en genotipo *SDF-13'A*, 5 (30%) del grupo de LP y 4 (20%) en PT, uno de este grupo fue homocigoto. La frecuencia alélica observada fue de 0.12 (IC95% 0.04-0.26) en PT y de 0.16 (IC 95% 0.05 – 0.34) en LP ( $p>0.05$ ).

**Cuadro 5.** Mutaciones de los genotipos de receptores de citocinas en el estudio.

Grupo	Genotipo					
	<u>CCR5 <math>\Delta</math>32</u> n(%)	Frecuencia Alélica	<u>CCR2b64I</u> n(%)	Frecuencia Alélica	<u>SDF-13'A</u> n(%)	Frecuencia Alélica
Lentos Progresores	1/15 (6.6)	0.03	5/15 (30)	0.17	5/15(30)	0.12
Progresores Típicos	1/20 (5)	0.025	6/20 (30)	0.2	4/20(20)	0.16
<b>p</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS

### Progresores Típicos

Cuando se analizaron el número total de mutaciones en cada paciente (cuadro 6), se observó que 8 (40%) pacientes PT tuvieron alguno de los tres genotipos. En un caso se encontró el genotipo *W/ $\Delta$ 32 3'A/3'A* y en otro paciente *W/64I W/3'A*.

**Cuadro 6. Progresores Típicos  
Genotipos**

	<b>CCR5 <i>Δ32</i></b>	<b>CCR2b <i>64I</i></b>	<b>SDF-1 <i>3'A</i></b>	<b>Mutaciones n</b>
PT1	W/W	W/W	W/W	0
PT2	W/W	W/W	W/W	0
<b>PT3</b>	W/W	<b>64I/64I</b>	W/W	<b>1</b>
PT4	W/W	W/W	W/W	0
<b>PT5</b>	W/W	W/W	<b>W/3'A</b>	<b>1</b>
PT6	W/W	W/W	W/W	0
PT7	W/W	W/W	W/W	0
<b>PT8</b>	<b>W/ <i>Δ32</i></b>	W/W	<b>3'A/3'A</b>	<b>2</b>
PT9	W/W	<b>W/64I</b>	W/W	<b>1</b>
PT10	W/W	W/W	W/W	0
<b>PT11</b>	W/W	<b>W/64I</b>	<b>W/3'A</b>	<b>2</b>
<b>PT12</b>	W/W	<b>W/64I</b>	W/W	<b>1</b>
PT13	W/W	W/W	W/W	0
<b>PT14</b>	W/W	W/W	<b>W/3'A</b>	<b>1</b>
<b>PT15</b>	W/W	<b>W/64I</b>	W/W	<b>1</b>
PT16	W/W	W/W	W/W	0
PT17	W/W	W/W	W/W	0
PT18	W/W	W/W	W/W	0
<b>PT19</b>	W/W	<b>W/64I</b>	W/W	<b>1</b>
PT20	W/W	W/W	W/W	0
<b>(8/20)</b> <b>40%</b>	<b>(1/20)</b> <b>5%</b>	<b>(6/20)</b> <b>30%</b>	<b>(4/20)</b> <b>20%</b>	<b>11/60</b> <b>18.3%</b>

### Lentos Progresores

Siete (46%) pacientes LP tuvieron alguno de los 3 genotipos que evaluamos. En un caso se encontró el genotipo *W/Δ32 W/3'A* y en otro caso *W/64I W/3'A*.

**Cuadro 7. Lentos Progresores  
Genotipos**

	<b>CCR5 Δ32</b>	<b>CCR2b 64I</b>	<b>SDF-1 3'A</b>	<b>Mutaciones n</b>
NP1	W/W	W/W	W/W	0
<b>NP2</b>	W/W	<b>64I/64I</b>	W/W	1
NP3	W/W	W/W	W/W	0
<b>NP4</b>	<b>W/Δ 32</b>	W/W	<b>W/3'A</b>	2
NP5	W/W	W/W	W/W	0
<b>NP6</b>	W/W	W/W	<b>W/3'A</b>	1
NP7	W/W	W/W	W/W	0
<b>NP8</b>	W/W	<b>W/64I</b>	W/W	1
<b>NP9</b>	W/W	W/W	<b>W/3'A</b>	1
NP10	W/W	W/W	W/W	0
NP11	W/W	W/W	W/W	0
NP12	W/W	W/W	<b>W/3'A</b>	1
NP13	W/W	<b>W/64I</b>	W/W	1
<b>NP14</b>	W/W	<b>W/64I</b>	W/W	1
<b>NP15</b>	W/W	<b>W/64I</b>	<b>W/3'A</b>	2
	<b>(7/15)</b>	<b>(1/15)</b>	<b>(5/15)</b>	<b>(5/15)</b>
	<b>46%</b>	<b>6.6%</b>	<b>30%</b>	<b>30%</b>
				<b>24.4%</b>

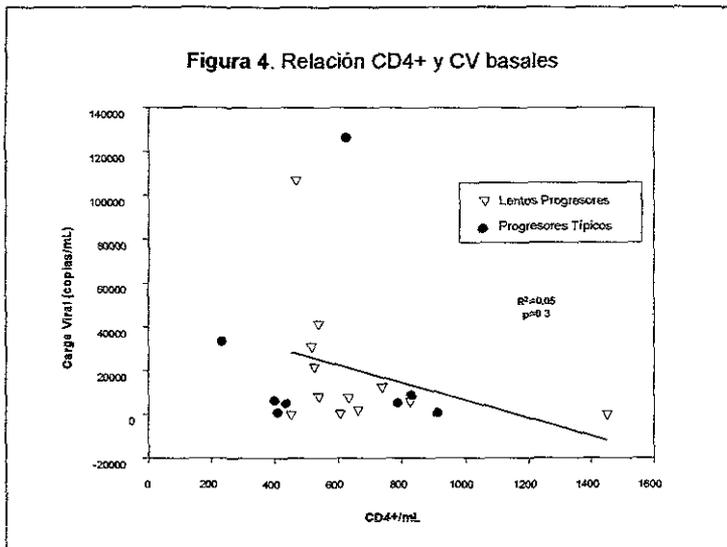
### Curva de linfocitos CD4+

Tres pacientes en el grupo LP fueron eliminados por haber recibido tratamiento antirretroviral en un caso, y por pérdida del seguimiento en dos casos. En el grupo de PT se eliminaron 12 pacientes porque recibieron tratamiento antirretroviral. El promedio de células CD4+ y de carga viral basal de los pacientes que continuaron el seguimiento fue semejante en los dos grupos (cuadro 6). No se observó correlación entre los niveles basales de CV y la cuenta de células CD4+ ( $r^2=0.05$ ,  $p=0.3$ ) (figura 4).

**Cuadro 6.** Características basales de los pacientes en seguimiento

	Lentos Progresores n=12	Progresores Típicos n=8	p
Edad años (Md)	36.3 (35)	33.6 (29)	0.2*
Tiempo de evolución	121.7 (± 28)	23.1 (± 23)	<0.001
CD4+ cél/mL (± DE)	691.5 (± 271.5)	579 (± 244)	0.48
Carga Viral cél/mL Md (intervalo)	8,107 (50-106,976)	5,836 (454-126,391)	0.9*

\*U-Mann-Whitney



El promedio de tiempo de seguimiento fue de  $8.4 \pm 2.9$  meses en el grupo de PT y de  $14.8 \pm 8.7$  meses en los LP ( $p=0.13$ ).

### Curva de linfocitos CD4 en progresores típicos

Los estudios de seguimiento del grupo de PT se muestran en el cuadro 7 y en la figura. El 55% (5/9) de los pacientes tuvieron CV por arriba de 30,000 copias/mL en al menos una determinación durante el tiempo de estudio. En este grupo de pacientes se observó una clara disminución en la cuenta de linfocitos CD4+ con un decremento de  $-38$  células/paciente/año (intervalo  $-629$  a  $-45$ ). En todos estos pacientes se decidió iniciar tratamiento y por lo tanto se eliminaron de un seguimiento posterior.

**Cuadro 7.** Evolución de la carga viral y células CD4. Progresores típicos.

	PROGRESORES TIPICOS					
	Meses de seguimiento					
	0		6		12	
	CD4+	CV	CD4+	CV	CD4+	CV
PT1	786	5,234	430	7,488		
PT3	626	<u>126,391</u>	494	<u>56,742</u>		
PT4	831	8,547	605	522		
PT5	435	5,123	267	<u>29,592</u>		
PT6	911	454	443	1,641	282	8,023
PT7	234	<u>33,239</u>	189	<u>58,188</u>		
PT8	410	970	331	4,556	241	6,069
PT11	398	6,439	298	<u>34,600</u>		

El promedio de tiempo de seguimiento fue de  $8.4 \pm 2.9$  meses en el grupo de PT y de  $14.8 \pm 8.7$  meses en los LP ( $p=0.13$ ).

### Curva de linfocitos CD4 en progresores típicos

Los estudios de seguimiento del grupo de PT se muestran en el cuadro 7 y en la figura. El 55% (5/9) de los pacientes tuvieron CV por arriba de 30,000 copias/mL en al menos una determinación durante el tiempo de estudio. En este grupo de pacientes se observó una clara disminución en la cuenta de linfocitos CD4+ con un decremento de  $-38$  células/paciente/año (intervalo  $-629$  a  $-45$ ). En todos estos pacientes se decidió iniciar tratamiento y por lo tanto se eliminaron de un seguimiento posterior.

**Cuadro 7.** Evolución de la carga viral y células CD4. Progresores típicos.

	PROGRESORES TIPICOS					
	Meses de seguimiento					
	0		6		12	
	CD4+	CV	CD4+	CV	CD4+	CV
PT1	786	5,234	430	7,488		
PT3	626	<u>126,391</u>	494	<u>56,742</u>		
PT4	831	8,547	605	522		
PT5	435	5,123	267	<u>29,592</u>		
PT6	911	454	443	1,641	282	8,023
PT7	234	<u>33,239</u>	189	<u>58,188</u>		
PT8	410	970	331	4,556	241	6,089
PT11	398	6,439	298	<u>34,600</u>		

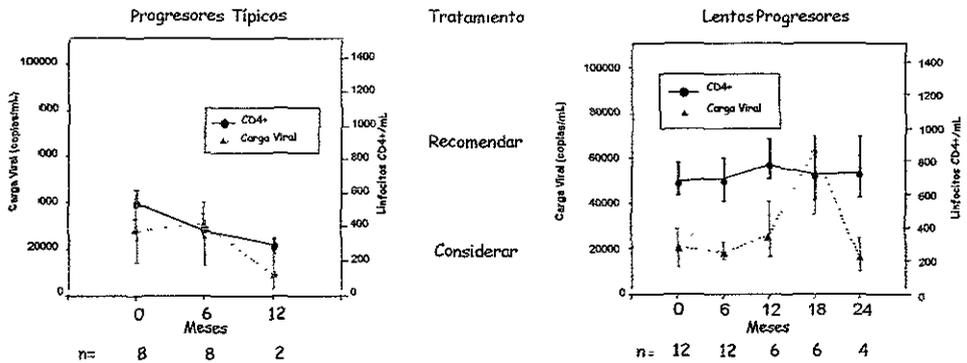
### Curva de linfocitos CD4 en lentos progresores

Los resultados de los estudios de seguimiento en el grupo de LP se muestran en el cuadro 8 y en la figura 5. El 42% (5/12) de los pacientes de este grupo tuvieron CV mayor de 30,000 copias/mL por lo menos en una de las determinaciones realizadas durante su estudio. El decremento de linfocitos CD4+ fue de  $-1.71$  células/paciente/año (intervalo  $-359$  a  $+602$ ). En dos de ellos se observó una clara disminución de las cifras de células CD4+, correspondiendo a una progresión tardía. Por otro lado en los otros tres pacientes que tuvieron cargas virales elevadas durante el seguimiento no se observó que se reflejara en disminución en la cifra de células CD4+.

**Cuadro 8.** Evolución de la carga viral y células CD4 en lentos progresores.

	LENTOS PROGRESORES									
	Meses de seguimiento									
	0		6		12		18		24	
	CD4+	CV	CD4+	CV	CD4+	CV	CD4+	CV	CD4+	CV
NP1	607	504	783	52						
NP2	526	21,738	515.9	19,140	606	25,723	515	<u>37,266</u>	678	19,300
NP4	539	<u>41,304</u>	511.9	<u>32,718</u>	720.7	<u>79,401</u>	611	<u>88,541</u>	567	22,200
NP5	740	12,699	558.4	<u>59,104</u>	521.8	<u>36,929</u>	498	<u>68,091</u>	381	20,435
NP6	827	5,978	527.2	9,945						
NP7	540	8,316	600	29,966	823.7	4,255	674	113		
NP8	1452	50	1918	50	1,448.5	50	1,683	50	1,261	50
NP9	470	<u>106,976</u>	256	17,200						
NP10	633	7,899	454	87						
NP11	663	2,051	730	50						
NP13	518	<u>31,030</u>	488	<u>38,434</u>	512	2,100	321.7	<u>185,000</u>		
NP15	453	50	1055	50						

**Figura 5. Efecto de la carga viral en el decremento de linfocitos CD4+**



ΔCD4+ células/mL					
Mes de seguimiento	6	12	18	24	Total
<b>Lentos Progresores</b>	$44.3 \pm 277$	$30.7 \pm 266$	$-4.7 \pm 164$	$186 \pm 164$	$-23.4 \pm 270$
n	12	6	6	4	
<b>Progresores Típicos</b>	$-196 \pm 147$	$-125 \pm 50.2$			$-378 \pm 540$
n	8	2			
p	0.03				0.05

Durante todo el estudio, el promedio de carga viral de los pacientes de ambos grupos se encontró en niveles con los cuales se recomienda actualmente considerar tratamiento antirretroviral (figura 4).

El decremento de linfocitos CD4+ en los primeros 6 meses de seguimiento fue de  $44.3 \pm 277$  células en el grupo de LP y de  $-196 \pm 147$  células en PT ( $p=0.03$ )

## DISCUSIÓN

### **Genotipos**

En este estudio de pacientes mexicanos por infección por VIH, no encontramos diferencia en los polimorfismos *CCR5Δ32*, *CCR2b64I* y *SDF13'A* entre quienes tienen progresión lenta de la enfermedad y quienes tienen progresión típica, a diferencia de lo reportado en la literatura, en donde se ha observado una mayor frecuencia de los genotipos *CCR5Δ32*<sup>35,56-59</sup>, *CCR2b64I*<sup>60</sup>, y *SDF13'A*<sup>62,63</sup> en individuos con progresión lenta de la enfermedad.

El genotipo más ampliamente estudiado es *CCR5Δ32*, se ha calculado que su presencia retrasa la progresión a SIDA en 2 a 4 años en individuos heterocigotos, con una frecuencia alélica mayor en individuos con progresión lenta de la enfermedad. Sin embargo, este genotipo frecuente en población caucásica (0.1-0.15) es muy raro en otras poblaciones, ahora sabemos que en población mexicana tiene una frecuencia de sólo 4%, lo cual explica los hallazgos en nuestro grupo de pacientes donde observamos una frecuencia alélica de 0.025 en PT y de 0.3 en LP.

Se ha calculado que el genotipo *CCR2b64I* pospone el desarrollo de SIDA en 2 a 4 años, a diferencia del alelo *CCR5*, no se encuentra confinado a caucásicos, se encuentra en Afro-americanos, hispanos y asiáticos con una frecuencia alélica de 0.10 a 0.24. En la literatura se ha reportado una frecuencia del alelo *CCR2b64I* 30 a 80% mayor en pacientes lentos progresores<sup>60</sup>. Esto no parece suceder en población mexicana, nuestros datos muestran una frecuencia

alélica semejante entre individuos infectados con progresión lenta y aquellos con progresión típica de la enfermedad, datos que concuerdan con el estudio de Michael et al<sup>61</sup> en donde estudiaron una cohorte de 20 LP predominantemente por transmisión homosexual, pero contrasta con lo encontrado en población africana en donde la prevalencia del genotipo 64I es semejante a lo reportado en población mexicana y sin embargo se ha calculado que entre 21 y 46% de los casos de mujeres que no han desarrollado SIDA por más de 12 años de infección se pueden atribuir a la presencia del genotipo 64I<sup>62</sup>.

No se ha encontrado co-ocurrencia de los genotipos 432 y 64I, se ha estimado que en conjunto, estos dos alelos pueden explicar la sobrevivencia del 25-30% de los pacientes con progresión lenta de la enfermedad.

Aun en estas poblaciones estas alteraciones genéticas no explican el 80% de los individuos expuestos no infectados ni más del 60% de quienes tienen progresión lenta de la enfermedad.

El genotipo *SDF-13'A* parece tener un efecto aditivo con los genotipos CCR, los pacientes que tienen ambos genotipos tardan más tiempo en desarrollar SIDA que quienes tienen solo uno de ellos, sin embargo el efecto protector del alelo *SDF-1* parece ser más evidente en etapas avanzadas de la enfermedad<sup>63</sup>, y es probable que eso explique que no hayamos encontrado asociación de este genotipo y la progresión lenta de la enfermedad ya que todos los pacientes NP se encontraban en una fase muy temprana de la infección, y aunque la frecuencia alélica es semejante en ambos grupos, si la presencia del genotipo tiene un efecto protector será evidente durante el seguimiento de estos enfermos.

Las alteraciones genéticas que evaluamos no explican el retraso en la progresión de la enfermedad en estos individuos. Es difícil de interpretar la discrepancia que existe en los resultados de los diferentes estudios que evalúan la influencia de los polimorfismos de los genes de receptores de quimiocinas en la evolución de la enfermedad. La relación VIH-huésped es muy compleja y seguramente incluye múltiples factores de resistencia como variantes de HLA, respuestas inmunes citotóxicas, estado nutricional y heterogeneidad viral, todos estos factores pueden estar distribuidos de manera diferente en las cohortes e incluso ser importantes en diferentes etapas de la enfermedad, lo cual hace aún más difícil comparar las diferentes cohortes e interpretar los resultados contradictorios.

Por otro lado es muy importante la investigación de la resistencia innata a la infección y las características propias de cada grupo étnico, por lo cual continuaremos el estudio de este grupo de pacientes en busca de otros factores que pudieran asociarse a lenta progresión de la enfermedad como son polimorfismos en el promotor del gen *CCR5*, la función de los linfocitos T citotóxicos de estos pacientes así como características propias del virus.

### ***Curva de descenso de linfocitos CD4+***

El pronóstico de los pacientes con infección por VIH es variable, la gran mayoría progresan a SIDA en un período de 10 años, sin embargo aproximadamente 5% progresarán en menos de 5 años y el 10% tardarán 20 años o más<sup>64</sup>. La determinación de CV en el período de seroconversión<sup>28</sup> y en pacientes

en quienes no se conoce la fecha de infección<sup>46</sup> es un buen predictor del riesgo de progresión a SIDA o muerte. En fases tempranas de la enfermedad se puede evaluar la progresión mediante la cuenta de linfocitos CD4+, cuya disminución en determinaciones seriadas es un marcador mas temprano de progresión que la presencia de manifestaciones clínicas las cuales sólo son evidentes cuando existe un estado de inmunosupresión grave.

En este estudio la disminución en el número de células CD4+ durante los primeros 6 meses fue mayor en el grupo de PT  $196 \pm 147$  cel/mL, comparado con el de LP donde la disminución fue  $44 \pm 277$  cel/mL. Sin embargo, a contrario a lo reportado en la literatura, la diferencia en disminución de células CD4+ no se asoció a diferencias en los niveles basales de CV, los cuales fueron semejantes en ambos grupos. Durante el tiempo de seguimiento cinco de los pacientes en el grupo de LP (30%) tuvieron CV elevadas, en niveles en los cuales se recomienda actualmente iniciar tratamiento independientemente de los niveles de CD4+<sup>42</sup>. Por decisión del paciente y su médico tratante, ninguno de estos pacientes recibió tratamiento a pesar de la CV elevada y contamos por ello al menos con un estudio de CV y CD4+ posterior. En tres de estos pacientes, no existió descenso en las cifras de CD4+, dos de ellos tienen ya dos años de seguimiento. Se trata de la evaluación de un pequeño grupo de pacientes que se habían comportado previamente como progresores lentos, sin embargo refleja la gran variabilidad que existe en la evolución de la infección por el VIH, y las limitaciones de los marcadores de progresión con que contamos en la actualidad.

Actualmente ha mejorado notablemente la morbilidad y mortalidad asociadas a esta infección como resultado del tratamiento antirretroviral. Sin embargo no se ha demostrado la utilidad en fases tempranas de la enfermedad como corresponde al grupo de pacientes que estudiamos. Por otro lado hay cada vez mas evidencia de la toxicidad a largo plazo de los medicamentos con los que contamos, además de la dificultad en apego, la posibilidad de emergencia de resistencia, y el costo elevado. Todos estos factores hacen que la decisión de iniciar tratamiento en fases tempranas de la enfermedad sea con la mejor evidencia de que el paciente se encuentra en riesgo de progresión de la enfermedad. Actualmente se recomienda que la decisión se base en los resultados de una sola determinación de CD4+ y CV. Consideramos que en el subgrupo de pacientes asintomáticos con cuentas de CD4+ mayores de 400 cel/mL, la decisión de iniciar tratamiento antirretroviral debe basarse en al menos dos determinaciones de CV y CD4+ con 4 a 6 meses de diferencia con lo cual se puede tener mejor evidencia de progresión de la enfermedad sin mayor riesgo para el enfermo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdespino-Gómez JL, García-García ML, et al. Epidemiología del SIDA/VIH en México; de 1983 a marzo de 1995. *Salud Pública Mex* 1995;37:556-71.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-70.
3. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984;224:497-500
4. Louwagie J, Janssens W, Mascola J, et al. Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. *J Virol*, 1995;69:263.
5. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CCR5: a RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955-8
6. Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The  $\beta$ -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135-48
7. Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-6
8. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the  $\beta$ -chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149-58

9. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-73
10. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE and Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-7
11. Gartner S, Markovits P, Markovits DM, Kaplan MH, Gallo RC, and Popovic M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 1986;233:215-9.
12. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Cohen OJ, Vaccarezza M, Gantt K, et al. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev.* 1994;140:105-30.
13. Schragar LK, Fauce AS. Human immunodeficiency virus. Trapped but still dangerous. *Nature* 1995;377:680-1.
14. Graziosi C, Pantaleo G, Gantt KR, Fortin JP, Demarest JF, Cohen OJ, et al. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV infected individuals. *Science* 1994;265:248-52.
15. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al: High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med*;1991;324:954.
16. Daar ES, Moudgil T, Meyer RK, et al: Transient high levels of viraemia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*;1991;324:961.

17. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1993;328:327-35.
18. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993;362:355-8.
19. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Hohnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus tipe 1 infection. *Nature.*1996;373:117-22.
20. Ho DD, Newmann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M, et al., Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV.1 infection. *Nature* 1995;373:123-6.
21. Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science.*1993;262:1011-8.
22. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, et al: Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994; 8:1123.
23. Lifson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, Mawie AC, Wilber JC, Stanley M, et al. Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis.* 1991;163:959-65.
24. Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, et al: Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1991;114:678

25. Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, et al: The characterization of non-progressors: Long term HIV infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS* 1993;7:1159
26. Landesman SH, Burns D: Quantifying HIV. *JAMA* 1996;275:640
27. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al: Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117
28. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, et al: Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122:573.
29. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF. Studies in subjects with long-term no Progressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995;332:209-16.
30. Hogervors E, Jurrians S, deWolf F, et al: Predictor for non- and slow progression in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection: Low viral RNA copy number in serum and maintenance of high HIV-1 p24 specific but not V3-specific antibody levels. *J Infect Dis* 1995;171:811.
31. Mellors JW, Kingsley LA, Gupta P, Rinaldo C, Phair J, Saah A, Detels R, Schragar L, Margolick J, Giorgi J: Prognostic value of plasma HIV-1 RNA quantification in seropositive adult men. *Xlth. International Conference on AIDS.* 1996; 2:26.
32. Saksela K, Stevens CE, Rubinstein P, et al: HIV-1 messenger RNA in peripheral blood mononuclear cells as an early marker of risk for progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1995;123:641

33. 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; 2:412-7.
34. Biti R, French R, Young J, Bennetts and Stewart G. HIV-1 infection in an individual homozygous for the *CCR5* deletion allele. *Nat Med* 1997; 3:252-3.
35. Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic Restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural Gene. *Science* 1996;273:1856-62
36. Liu R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.
37. Kirchhoff, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact *nef* sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 1995;228-32.
38. Poli G, Kinter AL, Fauci AS. Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1 cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:108-12.
39. Folks TM, Justement J, Kinter A, Dinarello CA, Fauci AS. Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promocyte cell line. *Science.* 1987;238:800-2
40. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332 201-8.

41. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, et al. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte count and the risk of progression to AIDS. *N Engl J Med* 1996;334:426.
42. Carpenter CC, Cooper DA, Fischl MA, Gatell JM, et al. Antiretroviral Therapy in Adults: Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2000;283:381-390
43. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med.* 1995;122:573-579.
44. Mellors J, Munoz AM, Giorgi JV. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 1997;126:946-954.
45. Lyles R, Muñoz A, Bazmi H, et al. Natural History of HIV-1 viremia after seroconversion in the Multicenter AIDS Cohort Study. From: 6<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; January 31-February 4, 1999; Chicago, Ill. Abstract 273.
46. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis of HIV-1 infection predicted by quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-1170
47. 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. *AIDS* 2000;14:123-131.
48. Brinkman K, Smeitink JA, Romijn J, Reiss P. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse transcriptase inhibitors is a key factor in the

- pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* 1999; 354:1112-1115.
49. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, et al. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999; 353:2093-2099.
50. Deeks SG, Hecht FM, Swanson M, et al. Virologic outcomes with protease inhibitor therapy in an urban AIDS clinic: relationship between baseline characteristics and response to both initial and salvage therapy. *AIDS* 1999;13:F35-F44.
51. Lucas GM, Chaisson RE, Moore RD. Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic: risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. *Ann Intern Med.* 1999;131:81-87.
52. Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 1999;21:1605-1613.
53. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med.* 1999; 5:512-525.
54. Gazzard B, Moyle M, on behalf of the BHIVA Guidelines Writing Committee. 1998 revision to the British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV seropositive individuals. *Lancet* 1998; 352:314-316.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

55. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, et al. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997;3:1160-62
56. Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, et al. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997;3:23-36
57. Michael NL, Chang G, Louie LG, et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997;3:338-40
58. Eugen-Olsen J, Iversen AKN, Garred P, et al. Heterozygosity for a deletion in the CCR-5 gene leads to prolonged AIDS free survival and slower CD4Tcell fall in a cohort followed for 11 years. *AIDS* 1997;11:305-10
59. de Roda Husman AM, Koot M, Cornelissen M, et al. Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997;127:882-90
60. Smith MW, Dean M, Carrington M, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 1997;277:959-65
61. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, et al. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997; 3:1160-62

62. Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, et al. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. *Lancet* 1998;351:1632-33
63. Winkler Ch, Modi W, Smith MW, et al. Genetic restriction of AIDS Pathogenesis by an SDF-1 Chemokine Gene Variant. *Science* 1998;279:389-93
64. Muñoz A, Wang MC, Bass S, Taylor JM, et al. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am J Epidemiol* 1989;130:530-39