

Análise da deleção $\Delta 32$ do receptor de quimiocina CCR5 em descendentes asiáticos em Maringá - Paraná

Analysis of $\Delta 32$ deletion of the CCR5 chemokine receptor in Asian descendants in Maringá - Paraná

Ane Caroline Nunes¹, Michelle Mota Sena², Stephanie Badaró Garcia², Ana Paula Lombardi Pereira², Kleber Paiva Trugilo², Maria Angelica Ehara Watanabe, Karen Brajão de Oliveira^{1,2}

¹ Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Curso de Biomedicina, Maringá – PR, Brasil.

² Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Patológicas, Laboratório de Genética Molecular e Imunologia. Londrina – PR, Brasil.

³ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Patológicas, Laboratório de Estudos e Análises de Polimorfismos. Londrina – PR, Brasil.

Endereço para correspondência:

Karen Brajão de Oliveira

Rodovia Celso Garcia Cid PR445 Km 380 Campus Universitário

Cx Postal: 10.011

CEP: 86.057-970 Londrina-Pr

Fone: (43) 3371-4267

karen.brajao@gmail.com

Resumo

As quimiocinas são citocinas envolvidas no processo de atração de leucócitos aos sítios de inflamação, atuam também no desenvolvimento dos órgãos, na angiogênese, na mobilidade de células tronco, na recirculação dos leucócitos, na regulação e no desenvolvimento imunológico e hematopoiético. Muitos polimorfismos nos genes que codificam as quimiocinas e seus receptores têm sido descritos em diferentes populações, o que poderia interferir na regulação da expressão gênica. Sugerindo desta forma um importante papel destas moléculas na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças infecto-contagiosas. Desta forma o presente estudo teve como objetivo avaliar a incidência do alelo variante do polimorfismo de quimiocina CCR5-D32, em indivíduos saudáveis de ascendência asiática. As amostras utilizadas foram de sangue periférico, das quais foi extraído o DNA para análise molecular do polimorfismo por meio da técnica de PCR. Os dados foram avaliados estatisticamente pelo programa SPSS Statistics 17.0, adotando o nível de significância de $p < 0.05$, onde observou-se que 100% dos indivíduos são selvagens para a deleção de 32 pares de bases, demonstrando a ausência deste polimorfismo em indivíduos brasileiros descendentes de asiáticos. Porém devido ao baixo número de amostras avaliadas são necessários mais estudos para comprovação.

Palavras-chave: CCR5 $\Delta 32$, HIV, epidemiologia.

Abstract

Chemokines are cytokines involved in leukocyte attraction to sites of inflammation, in organs development, in angiogenesis, on the mobility of stem cells, in the recirculation of leukocytes, and in immune and hematopoietic development. Many polymorphisms in the genes encoding chemokines and their receptors have been described in different populations, which could interfere in gene expression regulation, suggesting an important role of these molecules in infectious diseases susceptibility. This study aimed to evaluate the incidence of the variant allele of the chemokine receptor 5 $\Delta 32$ polymorphism, in healthy Asian descents. DNA was extracted from peripheral blood for molecular analysis of CCR5 polymorphism by PCR technique. The data were statistically analyzed using SPSS Statistics 17.0 software, adopting the significance level of $p < 0.05$. It was observed that 100% of all individuals analyzed are wild type for 32bp deletion, demonstrating the absence of this polymorphism in Brazilians Asian. However a small sample number was assessed, so further studies are necessary to corroborate these results.

Key words: CCR5 $\Delta 32$, HIV, epidemiology

INTRODUÇÃO

Quimiocinas são pequenas proteínas que estão entre os maiores mediadores da migração leucocitária para o sítio da inflamação. Elas promovem a migração quimiotática de linfócitos, a partir de sua ligação com receptores específicos presentes na membrana destas células ⁽¹⁾. As funções das quimiocinas são mediadas através de receptores de quimiocinas transmembrana expressos na superfície de várias células. No caso do CCR5, sua expressão é mais comum entre certos tipos celulares, especificamente linfócitos Th1 e macrófagos, levando a resposta imune do tipo Th1 com a produção de interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral beta (TNF- β), e interleucina 2 (IL-2) ⁽²⁾.

Os receptores de quimiocinas CCR5 são expressos em células T ativadas e estas têm perfil de citocina tipo Th1 ⁽²⁾. Entretanto as quimiocinas são muito menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores com sete α -hélices transmembrana acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos ⁽¹⁾. O gene que codifica o CCR5 está localizado na região p21.3 do cromossomo 3 humano. Outros genes de receptores de quimiocinas estão próximos desta região. CCR5 é um dos receptores da família de quimiocinas CC (o qual se liga às quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5) presente principalmente em células do sistema imune como linfócitos e macrófagos. Tem a função de encaminhar estas células ao sítio de inflamação ⁽²⁾.

Alguns estudos mostram que os indivíduos homocigotos para o alelo com a deleção são resistentes a infecções que tem tropismo por macrófagos. O HIV utiliza receptores de quimiocinas como seus co-receptores obrigatórios para sua entrada nas células; uma vez que sua gp120 liga-se ao CD4, provocando uma mudança conformacional, o que permite que haja uma interação subsequente com o receptor de quimiocina e conseqüente fusão de suas membranas. O CXCR4 é um co-receptor para cepas do HIV tipo 1 (HIV-1) que infecta linhagem de células T (cepas T-trópicas), e o CCR5 é um co-receptor para HIV-1 que infectam macrófagos e células T ativadas (cepas M-trópicas). RANTES (quimiocina que regula expressão e secreção por linfócitos T) e MIP-1 α e MIP-1 β (proteínas inflamatórias de macrófagos -1 α e 1 β), os quais são ligantes para CCR5, e o CXCL12 um ligante para CXCR4, bloqueiam a entrada do HIV M-trópico e T-trópico respectivamente, nas células ^(3;4;5).

Em uma rápida sucessão de estudos epidemiológicos, identifica-se a existência de um alelo mutante para o gene CCR5, que carrega uma deleção de 32 pares de bases ($\Delta 32$), sendo denominado CCR5 $\Delta 32$ ⁽⁶⁾. Esta variante resulta em uma forma não funcional de receptor, impedindo a sua interação com suas quimiocinas ligantes ^(7;8;9).

Em descendentes asiáticos a deleção do CCR5 $\Delta 32$ é pouco frequente, entretanto como o Brasil é um país que apresenta grande diversidade étnica devido às imigrações, e levando em consideração a grande importância da deleção na resistência do indivíduo à infecção pelo HIV, o presente trabalho avalia a incidência da deleção entre descendentes asiáticos na região de Maringá – PR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos

Este trabalho foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) e aprovado de acordo com parecer nº088/2011 o qual se encontra de acordo com os princípios éticos na Experimentação Humana adotada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) pela Resolução MS/CNS nº196/96 do Ministério da Saúde (MS).

A pesquisa da deleção foi realizada em 15 indivíduos saudáveis, descendentes asiáticos, em ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, que se propuseram a participar voluntariamente deste estudo após convite, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os sujeitos foram abordados na Instituição de ensino superior, ou mesmo em outros ambientes de convívio social, onde foram convidados a participar da pesquisa como colaboradores, foram informados sobre os objetivos da pesquisa e sobre a coleta de 5mL sangue periférico e também sobre a não necessidade de estar em jejum para a coleta do material.

Local

A coleta das amostras de sangue periférico foi realizada no Centro Universitário de Maringá, no laboratório de análises clínicas. E o processo de identificação genética no laboratório de biologia molecular da referida instituição de ensino superior.

Procedimento

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de sangue periférico dos pacientes em estudo. A técnica utilizada consistiu basicamente no rompimento enzimático de membranas celulares, eliminação de proteínas e ácidos graxos por ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol ^(10;11) com algumas modificações. A integridade do DNA foi analisada rotineiramente por uma eletroforese a 100V, em gel de agarose 1%.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os iniciadores para CCR5 utilizados para a amplificação do DNA foram sintetizados de acordo com a sequência *GenBank* AF009962. *Primer sense*: 5' ACC AGA TCT CAA AAA GAA 3', *Primer anti-sense*: 5' CAT GAT GGT GAA GAT AAG CCT CA 3'.

A condição da reação de amplificação foi realizada em ciclos no termociclador "PCR Sprint-ThermoHybaid" que consiste em temperatura inicial de desnaturação, 94 °C

por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de um minuto a 94 °C, para desnaturação, um minuto a 58°C, temperatura de anelamento, e um minuto a 72 °C para extensão das fitas, com extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Todas as reações efetuadas tiveram um controle negativo (ausência de DNA) a fim de assegurar a ausência de contaminação.

RESULTADOS

Neste trabalho foram avaliadas as amostras de 15 indivíduos descendentes asiáticos, saudáveis, com idade entre 18-79 anos, de ambos os sexos (Tabela 1), para a análise de seus genótipos. A idade média dos indivíduos foi de 46,4 ± 23,12 anos de idade com um valor de mediana de 43 anos.

A maioria dos indivíduos envolvidos neste estudo pertencem a terceira geração de descendentes asiáticos correspondendo a 46,7% (7/15) dos indivíduos. E apenas um indivíduo (6,66%) relatou apresentar hábito tabagista.

Tabela 1. Características demográficas da população.

		n	%
SEXO	F	7	46,66
	M	8	53,33
GERAÇÃO	1	4	26,7
	2	3	20,0
	3	7	46,7
	4	1	6,7
TABACO	N	14	93,33
	S	01	6,66

Os possíveis genótipos, para o gene CCR5, avaliados neste estudo são CCR5/CCR5 (selvagem), CCR5/Δ32 (heterozigoto), e Δ32/Δ32 (homozigoto). Sendo que neste trabalho os 15 indivíduos avaliados não apresentaram a deleção o genótipo, sendo então representativos apenas em CCR5/CCR5 (selvagens).

A distribuição genotípica foi avaliada pela técnica de PCR seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, na qual foram observados fragmentos

eletroforéticos de 225pb para o genótipo selvagem, caso algum indivíduo tivesse apresentado o genótipo CCR5/ Δ 32 este teria apresentado um fragmento de 225pb e outro de 193pb e o indivíduo Δ 32/ Δ 32 teria apresentado um único fragmento de 193pb (Figura 1).

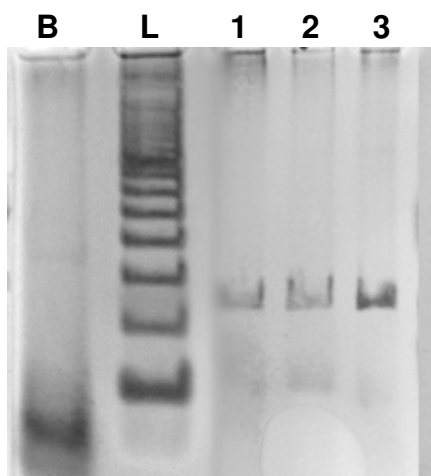


FIGURA 1. Perfil Eletroforético dos fragmentos do gene CCR5 analisados. (B) Branco, (L) Ladder 100pb, (1, 2 e 3) produtos do PCR CCR5/CCR5. Gel de Poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata.

DISCUSSÃO

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas, que tem a função de mensageiros intracelulares, as quais carregam sinais regulatórios de células para célula. São produzidas por vários tipos celulares e estão presentes principalmente em processos inflamatórios, onde a presença de leucócitos é essencial na resposta do hospedeiro durante a infecção⁽¹²⁾. Foram inicialmente identificadas como citocinas quimioatrentes no contexto do tráfico de leucócitos para locais de inflamação, mas o seu papel biológico não é limitado a quimiotaxia. Quimiocinas mostraram-se envolvidas em outras funções biológicas, na angiogênese, hematopoiese, desenvolvimento embrionário e metástase. Receptores de quimiocinas como CCR5 tem o papel preponderante para a entrada viral e replicação das células, isso pela resistência a infecção pelo HIV-1 de indivíduos que falta CCR5 devido a uma deleção de 32 pares de bases no gene CCR5⁽¹³⁾.

O alelo CCR5 Δ 32 é comum entre Europeus caucasóides (frequência alélica 0,05 - 0,15), porém raro ou ausente na maioria dos outros grupos étnicos, como nativos africanos e ameríndios⁽¹⁴⁻¹⁹⁾. A ausência desta variante também foi relatada na população nativa da América do Sul, em populações nativas da Amazônia Brasileira^(18;20) e também em Asiáticos^(21;22;23).

Na patofisiologia do HIV os receptores de quimiocinas são importantes que se tornaram aparentes quando se descobriu um polimorfismo para CCR5, o qual poderia explicar porque certos pacientes com alto risco para infecção por HIV-1 permanecem não infectados^(24;6). Pessoas que são homozigotas para a deleção de 32 pares de bases no gene para o CCR5 não têm a síntese de proteínas CCR5 funcionais, e as mesmas não são encontradas dentre os pacientes HIV positivos. Além disso, células de pessoas com esta mutação podem conferir resistência à infecção por HIV-1 "in vitro"⁽²⁵⁾.

Foi observado também que pessoas heterozigotas para tal deleção apresentam uma progressão mais lenta na infecção pelo HIV-1 do que os indivíduos onde não há constatação desta mutação. Este fato pode ocorrer devido à existência de uma associação entre a gp120 e o CD4 e o receptor para quimiocina antes do HIV infectar as células, apesar do mecanismo molecular implicado na fusão celular com o vírus não estar totalmente elucidado ^(26;27;28;29).

Na população brasileira, caracterizada por uma intensa miscigenação, a frequência de indivíduos com o genótipo selvagem, CCR5/CCR5, foi de 93% e a de indivíduos heterozigotos, CCR5/ Δ 32, de 7% ⁽³⁰⁾.

Investigou-se o alelo CCR5 Δ 32 em 18 populações européias. A população de maior frequência foi a da Finlândia (16%) e a de menor foi a da Sardenha (4%) ⁽³¹⁾. Esses alelos foram encontrados, respectivamente, em somente 2 e 1,5% dos cromossomos que carregavam o alelo selvagem (CCR5/CCR5). A partir desses dados, concluiu-se que muitos e não todos os alelos CCR5 Δ 32 originaram-se de uma mutação simples e que este evento provavelmente teve origem recente (~1000 anos atrás) no Nordeste Europeu.

O alelo CCR5 possui uma frequência de 0,092 em populações caucasianas, mas está ausente em populações negras da Europa Ocidental, África Central e em populações Japonesas ⁽³²⁾. A frequência do alelo mutante varia entre os caucasianos europeus, revelando um declínio desde o Norte até o Sul, alcançando níveis imperceptíveis na Arábia Saudita ⁽³³⁾. Para o estudo da mutação na Índia, estudaram 100 indivíduos normais e identificaram um indivíduo heterozigoto para a deleção ⁽³⁴⁾.

Em um estudo com 1.438 indivíduos pertencentes a 40 grupos étnicos da Índia, verificou-se que o alelo CCR5 Δ 32 foi ausente em muitos grupos, mas estava presente em algumas populações do norte e do oeste ⁽³⁵⁾. Os autores sugeriram que o alelo poderia ter sido introduzido pela herança caucasiana, consistente com o fato histórico de que imigrantes caucásios da Ásia Central e da Europa Ocidental que teriam entrado na Índia.

Desta forma, os dados encontrados no presente estudo estão em concordância com os dados apresentados por diversos autores, como Samson et al. (1996) que relataram a ausência deste polimorfismo na população japonesa ⁽³²⁾ e também com Husain et al (1998) e Majumder e Dey (2001) que observaram baixíssima incidência do alelo variante na população do sudeste asiático ^(34;35). Assim, como com os dados apresentados por Tan et al. (2010) que observaram uma frequência do alelo variante de 0,03, relatando uma incidência de 93,3% (222/238) de indivíduos selvagens 6,3% de heterozigotos (15/238) e 0,4% (1/238) de homozigotos ⁽³⁶⁾.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a deleção Δ 32 do gene CCR5 foi ausente em indivíduos brasileiros descendentes de asiáticos da região norte do Paraná. Contudo o número de amostras avaliadas foi baixo, necessitando, portanto de mais estudos para corroborar os dados encontrados no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Int Med*, 250: 91-104, 2001.
2. Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, 22; 391(6665):344-5. 1998.
3. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1(α), and MIP-1 (β) as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, 270:1811-1815, 1995.
4. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382: 829-833, 1996.
5. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382: 833-835, 1996.
6. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86: 367-377, 1996.
7. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV infection and disease progression. *Science*, 277: 959-965, 1997.
8. Yang X, Ahmad T, Gogus F, Wallace GR, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR, Fortune F, Jewell DP, Marshall SE. Analysis of the CC chemokine receptor (CCR5) Delta32 polymorphism in Behcet's disease. *Eur J Immunogenet*, 31(1):11-14, 2004.
9. Sidoti A, D'Angelo R, Rinaldi C, De Luca G, Pino F, Salpietro C, Giunta DE, Saltalamacchia F, Amato A. Distribution of the mutated delta32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. *Int J Immunogenet*, 32(3): 193-198, 2005.
10. Kirby LT. DNA fingerprinting: an introduction. New York: Stocton Press. 1990.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid Res*, 16:1215, 1988.
12. de Oliveira KB, Oda JM, Voltarelli JC, Nasser TF, Ono MA, Fujita TC, Matsuo T, Watanabe MA. CXCL12 rs1801157 Polymorphism in Patients with Breast Cancer, Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Lab Anal*, 23: 387-393, 2009.
13. Opperman M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal* 16: 1201–1210, 2004.

14. McNicholl JM, Smith DK, Qari SH, Hodge T. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis.* 3(3): 261-271, 1997.
15. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat. Genet.* 16: 100-103, 1997.
16. Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet.* 351(9116): 1632-1633, 1998.
17. Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M. Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet.* 62(6):1507-1515, 1998.
18. Lebouté APM, Carvalho MWP, Simões AL. Absence of the DCCR5 mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon. *Hum Genet.* 105: 442-443, 1999.
19. Martinson et al. Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS.* 14(5):483-9, 2000.
20. Chies JA, Hutz MH. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res.* 36 (1):71-75, 2003.
21. O'Brien SJ, Moore JP. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev.* 177: 99-111, 2000.
22. Wang FS, Hong WG, Cao Y, Liu MX, Jin L, Hu LP, Wang Z, Feng TJ, Hou J, Zhang B, Shi M, Xu DP, Lei ZY, Wang B, Liu ZD, Ye JJ, Peng L, Qiu Y, Winkler C. Population survey of CCR5 delta32, CCR5 m303, CCR2b 64I, and SDF1 3'A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 32(2):124-130, 2003.
23. Chang HY, Ahn SH, Kim DY, Shin JS, Kim YS, Hong SP, Chung HJ, Kim SO, Yoo WD, Han KH. Association between CCR5 Promoter Polymorphisms and Hepatitis B Virus Infection. *Korean J Hepatol.* 11(2):116-124, 2005.
24. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by deletion of the CCR5 structural gene: Hemophilia Growth and

Development Study Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*, 273: 1856-1862, 1996.

25. Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA. Relative resistance to HIV-1 of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high risk sexual exposure. *Nat Med*, 2:412-417, 1996.

26. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. CD-4- induced interaction of primary HIV-1 gp 120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR5. *Nature* 384:184-187, 1996.

27. Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP. CD-4 dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its correceptor CCR-5. *Nature*, 384:184-187, 1996.

28. Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS, Golding H. Evidence of cell-surface association between fusion and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science*, 274:602-605, 1996.

29. Dettin M, Scarinci C, Pasquato A, Di Bello C. Synthetic peptides for study of human immunodeficiency virus infection. *Appl Biochem Biotechnol*, 102-103 (1-6):41-48, 2002.

30. Passos GA Jr, Picanço VP. Frequency of the delta ccr5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immunol Lett*, 61 (2-3): 205-207, 1998.

31. Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, de la Rúa C, Ferrari M, Ferrec C, Glover G, Grinde B, Güran S, Kucinskask V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar Laszlo, Beckman L, Parmentier M. The Δ ccr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet*, 7: 399-406, 1998.

32. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyltermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 332: 722-725, 1996.

33. O'brien SJ, Dean M. Genes que oponen resistencia al sida. *Investigación y ciencia*, 6-14, 1997.

34. Husain S, Goila R, Shahi S, Banerjea AC. First report of a healthy indian heterozygous for Δ 32 mutant of HIV-1 co-receptor-CCR5 gene. *Gene*, 207: 141-147, 1998.

35. Majumder PP, Dey B. Absence of the HIV-1 protective del-*ccr5* allele in most ethnic populations of India. *Europ. J. Hum. Genet*, 9: 794-796, 2001.

36. Tan XH, Zhang JY, Di CH, Hu AR, Yang L, Qu S, Zhao RL, Yang PR, Guo SX. Distribution of CCR5-D32, CCR5m303A, CCR2-64I and SDF1-30A in HIV-1 infected and uninfected high-risk Uighurs in Xinjiang, China. *Infect Genet Evol*, 10, (1): 260-272, 2010.