

Distribuzione delle varianti $\Delta 32$ e 64I dei geni per il CCR5 e il CCR2 in alcune popolazioni del Mediterraneo

Distribution of $\Delta 32$ and 64I variants of CCR5 and CCR2 genes in some Mediterranean populations

Ignazio Stefano Piras¹, Lucia Vacca¹, Carla Maria Calò¹, Alessandra Falchi^{1,2},
Maria Elena Ghiani¹, Laurent Varesi², Giuseppe Vona¹

¹ Dip. di Biologia Sperimentale, Università di Cagliari (Italia)

² Faculty of Sciences and Techniques, University of Corse (France)

Per la corrispondenza: Ignazio Stefano Piras. Università di Cagliari. Dipartimento di Biologia Sperimentale, Sez. Scienze Antropologiche. SS 554, km 4,500 – 09042 Monserrato (Ca) – Italia. E-mail: ispiras@unica.it

Parole chiave: CCR5, CCR2, HIV-1, popolazioni Mediterranee

Key words: CCR5, CCR2, HIV-1, Mediterranean populations

Riassunto

Le varianti dei geni CCR5 e CCR2 sono state messe in relazione con una differente suscettibilità all'infezione da HIV-1. In particolare, gli individui omozigoti per il CCR5- $\Delta 32$ mostrano una protezione quasi completa all'infezione, mentre gli individui eterozigoti presentano una progressione ritardata della sindrome. Gli individui che possiedono la mutazione CCR2-64I presentano invece una ritardata progressione della sindrome sia nella condizione omozigote che nella condizione eterozigote. In questo studio sono stati analizzati i due polimorfismi in alcune popolazioni del Mediterraneo.

I risultati confermano la presenza di queste varianti nelle popolazioni del Mediterraneo, e sembrano indicare la validità di questi marcatori per l'analisi popolazionistica.

Abstract

Variants of CCR5 and CCR2 genes are related with different susceptibility to HIV-1 infection. Particularly, homozygous subjects for CCR5- $\Delta 32$ mutation show a high protection against infection, while heterozygous subjects show a delayed disease progression. Both homozygous and heterozygous subjects carrying CCR2-64I mutation show delayed disease progression.

In this study we analyse these polymorphisms in some Mediterranean populations. Results confirm the presence of these variants in Mediterranean populations and suggest the validity of these markers for populations genetic analysis.

Introduzione

Alcune varianti dei geni codificanti per i recettori CCR5 e CCR2 sono stati messi in relazione con una diversa suscettibilità all'infezione da HIV-1. I due geni sono situati sul cromosoma 3 in posizione 3p21.3-p24, all'interno di un cluster che include la maggior parte dei geni codificanti per i recettori delle chemochine (Samson *et al.*, 1996). Il CCR5 è espresso sulla superficie della membrana dei monociti, dei macrofagi, delle cellule T della memoria e sulle cellule dendritiche; oltre a legare le beta chemochine RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β il CCR5 è un importante corecettore per l'HIV-1 (Samson *et al.*, 1996; Huang Y *et al.*, 1996).

I soggetti omozigoti per una delezione di 32 bp ($\Delta 32$) nel segmento del gene CCR5 che codifica per il secondo dominio extracellulare della proteina sono resistenti all'infezione (Aarons *et al.*, 1997; Samson *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Biti *et al.*, 1997; Rana *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1996) anche se tale protezione non è totalmente completa (Biti *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 1997; Theodorou *et al.*, 1997). Gli eterozigoti appaiono parzialmente protetti dall'infezione (Samson M., *et al.*, 1996; Michael *et al.*, 1997) e mostrano un rallentamento nella progressione della sindrome (Huang *et al.*, 1996; Rappaport *et al.*, 1997; Eugen-Olsen *et al.*, 1997; Michael *et al.*, 1997). La distribuzione del CCR5- $\Delta 32$ è limitata prevalentemente all'Europa e al Nord Africa a parte alcune eccezioni (Martinson *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1998; Su *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1997; Barbouche *et al.*, 2001), mostrando un gradiente Nord - Sud, con le maggiori frequenze nelle popolazioni Finlandese e Mordoviniana (16%) e minori in Sardegna (4%) (Libert *et al.*, 1998). Tale distribuzione è stata spiegata con un'origine recente della mutazione nel Nord - Est Europa, datata circa 700 anni fa (con un range compreso tra 275 - 1870 anni) (Stephens *et al.*, 1998; Libert *et al.*, 1998). Il vantaggio selettivo che conferiva nei confronti del vaiolo avrebbe permesso alla mutazione di mantenere elevate frequenze (Galvani *et al.*, 2003), mentre la presenza nel sud - Europa e il gradiente Nord - Sud sono stati spiegati con l'ipotesi di una dispersione dell'allele da parte dei Vichinghi durante i loro spostamenti dal loro luogo d'origine nel nord Europa alle altre regioni (Lucotte, 2003).

Il CCR2 è il recettore per le chemochine MCP-1,2,3,4 e 5 (D'Souza *et al.*, 1996) e anch'esso è un corecettore per l'HIV-1. Una sostituzione $G \rightarrow A$ in posizione 190 determina la sostituzione di una valina con una isoleucina nel primo dominio transmembrana del recettore. Nei portatori di questa mutazione è stata osservato un rallentamento nella progressione della sindrome ma non una protezione dalla trasmissione da HIV-1 (Smith *et al.*, 1997; Michael *et al.*, 1997). Il CCR2-64I possiede un'origine precedente al CCR5- $\Delta 32$ (circa 32000 anni) (Kostrikis and Martinson, 1999), ed è presente in tutti i continenti, raggiungendo le frequenze più elevate (sino al 57%) nelle popolazioni asiatiche (Martinson *et al.*, 2000; Struyf *et al.*, 2000; Su *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2000).

In questo lavoro si è studiata la distribuzione di questi due polimorfismi in quattro popolazioni del bacino del Mediterraneo (Sardegna, Corsica, Isole Baleari e Turchia), data l'importanza che tali marcatori possiedono nella trasmissione dell'HIV-1 e considerato che, soprattutto per il CCR2-64I, non sono presenti molti dati in letteratura relativi a queste popolazioni. Inoltre, attraverso i confronti con i dati rinvenibili in letteratura, si è analizzata la validità di tali marcatori per gli studi popolazionistici.

Materiali e Metodi

È stato esaminato un campione di 315 individui sani non imparentati tra loro provenienti da diverse aree del Mediterraneo (Sardegna, Corsica, Turchia e Baleari). Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero con la metodica del fenolo - cloroformio e successivamente è stato amplificato mediante PCR secondo le condizioni descritte da altri autori (de Roda Husman *et al.*, 1997; Struyf *et al.*, 1999). Per il CCR5 la determinazione dei genotipi è stata effettuata su gel di agarosio al 4%. Per l'allele mutato il frammento ottenuto era di 161 bp mentre per l'allele selvatico era di 193 bp. Per il CCR2 dopo la PCR è stato necessario eseguire una digestione con l'enzima di restrizione BstF5 I (4 ore a 65° C) e una elettroforesi su gel di agarosio al 4%. I frammenti ottenuti dopo la digestione erano: 360 bp, 203 bp e 102 bp per il genotipo wt/wt; 360, 203, 160 e 102 bp per il genotipo wt/64I; 203, 160 e 102 bp per il genotipo 64I/64I.

Dai dati ottenuti sono state calcolate le frequenze alleliche, genotipiche, il test di Fisher basato sulle frequenze genotipiche con il programma Genepop 1.2 (Raymond and Rousset 1995); per valutare se il campione fosse in equilibrio di Hardy Weinberg è stato applicato il test statistico della catena di Markov (Guo e Thompson 1992), mentre le frequenze aplotipiche sono state stimate con la procedura Maximum-Likelihood usando l'algoritmo expectation-maximization (EM) (Excoffier and Slatkin, 1995). È stata testata l'esistenza di un Linkage Disequilibrium tra i due loci ed è stato effettuato il Test di Differenziazione di Fisher basato sulle frequenze aplotipiche. Questi parametri sono stati calcolati con il software Arlequin 2000 (Schneider *et al.*, 2000). Per valutare l'eventuale causa del Linkage Disequilibrium è stato effettuato il Test di Ohta (Ohta *et al.*, 1969) con il programma Genetix v 4.03 (Belkhir *et al.*, 2002).

Utilizzando i dati disponibili in letteratura e con l'ausilio del software R-Matrix (Harpending and Jenkins 1973) sono stati effettuati dei confronti con le altre popolazioni.

Nel tentativo di spiegare la differenziazione delle popolazioni tenendo conto della loro localizzazione geografica è stato utilizzato l'indice di autocorrelazione spaziale I di Moran. Il calcolo del coefficiente viene effettuato raggruppando le popolazioni in classi di distanze geograficamente arbitrarie. L'Indice di Moran varia tra +1 e -1. Il suo valore atteso in assenza di autocorrelazione si approssima a zero. Un valore positivo indica similarità genetica nella classe di distanze analizzate, un valore negativo indica una dissimilarità nelle frequenze dell'allele. Il correlogramma, che riporta i coefficienti di autocorrelazione rispetto alle distanze, descrive l'andamento nello spazio della variazione genetica mostrata per ciascun allele. I correlogrammi sono riconducibili ad alcuni andamenti tipici, ognuno dei quali descrive l'affinità o la diversità genetica delle popolazioni in funzione della localizzazione geografica. L'analisi è stata effettuata con il programma SAAP 4.3

Risultati

Le frequenze alleliche, genotipiche e aplotipiche sono mostrate in tabella 1. I risultati indicano per il CCR5-Δ32 dei valori compresi tra 8,9% delle Isole Baleari e l'1,6% della Sardegna, mentre per il CCR2 64I abbiamo dei valori compresi tra l'11% della Turchia e il 6,8% della Sardegna.

Per quanto riguarda le frequenze genotipiche, per il locus CCR5 si può evidenziare la presenza del genotipo Δ32/Δ32 solamente nel campione delle Isole Baleari. Per il locus CCR2 si può notare l'assenza in tutte le popolazioni del genotipo 64I/64I. Per tutti e due i loci il genotipo più frequente è il genotipo selvatico wt/wt.

Sono stati individuati tutti gli aplotipi possibili e in tutte le popolazioni l'aplotipo più frequente è quello costituito dai due alleli selvatici (wt/wt), mentre il meno frequente è quello costituito dai due alleli mutati Δ32/64I. Questo aplotipo è presente nella Turchia e nelle Isole Baleari rispettivamente con 1,9% e 0,2%, risultando assente nel campione della Sardegna e della Corsica.

	Frequenze alleliche				Frequenze genotipiche						Frequenze aplotipiche			
	CCR5		CCR2		CCR5			CCR2			wt/		Δ32/	
	wt	Δ32	wt	64I	wt/wt	wt/Δ32	Δ32/Δ32	wt/wt	wt/64I	64I/64I	wt/wt	wt/64I	Δ32/wt	Δ32/64I
Cor	94,8	5,2	92,8	7,2	89,6	10,4	0,0	87,2	12,8	0,0	87,6	7,2	5,2	0,0
Sar	98,4	1,6	93,2	6,8	96,8	3,2	0,0	86,3	13,7	0,0	91,6	6,8	1,6	0,0
Tur	97,0	3,0	89,0	11,0	94,0	6,0	0,0	78,0	22,0	0,0	87,9	9,1	1,1	1,9
Bal	91,1	8,9	91,1	8,9	84,5	13,3	0,0	82,2	17,8	0,0	82,4	8,7	8,7	0,2

Tabella 1. Frequenze alleliche, genotipiche e aplotipiche per le popolazioni studiate.

Table 1. Allele, genotype and haplotype frequencies for the studied populations.

Per valutare la differenziazione tra le popolazioni è stato applicato il Test esatto di Fisher, sia sulle frequenze genotipiche sia su quelle aplotipiche.

Le popolazioni in base al test esatto di Fisher appaiono differenziate tra di loro a livello genotipico solamente per il locus CCR5 ($P = 0,02772 \pm 0,00329$) e non per il CCR2 ($P = 0,05604 \pm 0,01201$). Effettuando il confronto a coppie tra popolazioni per ogni locus l'unico valore significativo riscontrato è stato quello tra la Sardegna e le Baleari per il locus CCR5 ($P = 0,0054 \pm 0,00062$)

A livello aplotipico le popolazioni non risultano differenziate né a livello complessivo ($P = 0,0637 \pm 0,04357$) né nei confronti a coppie.

È stato riscontrato un valore significativo di Linkage Disequilibrium per il campione proveniente dalla Turchia ($P = 0,01173 \pm 0,00304$). Il test di Ohta suggerisce la deriva genica come causa del Linkage.

Per verificare l'esistenza di una correlazione spaziale per gli alleli analizzati tra le popolazioni prese in esame e quelle studiate da altri autori per gli stessi loci, è stato calcolato l'Indice di Moran (I). Tale indice è risultato significativo per il locus CCR2 il cui correlogramma (figura 1) costruito sui coefficienti di correlazione mostra un andamento assimilabile a un gradiente.

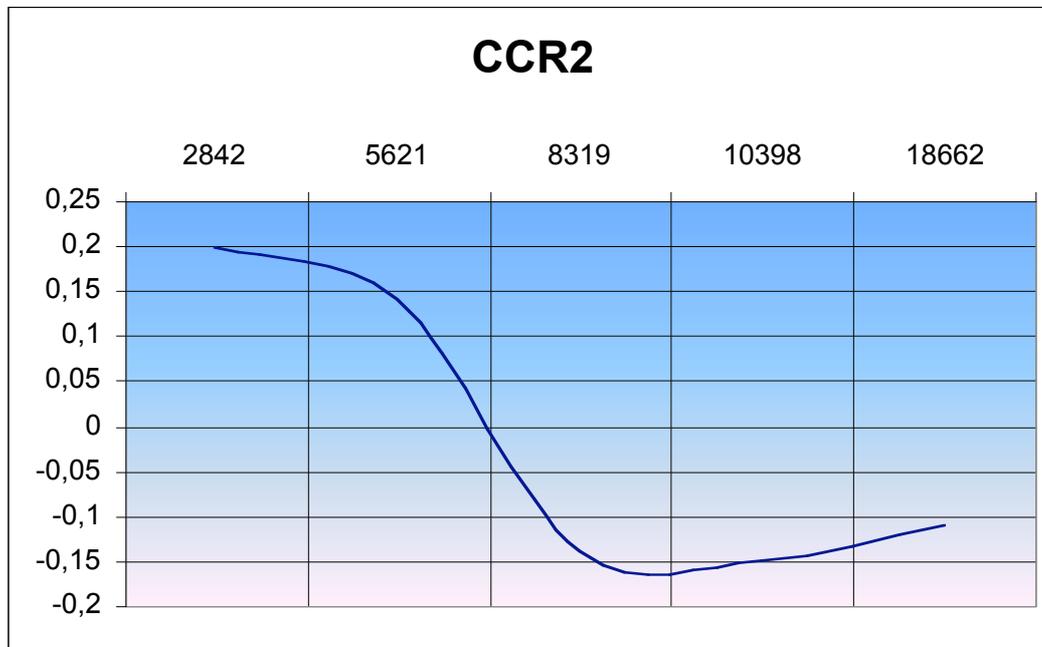


Figura 1. Correlogramma per il locus CCR2.
Figure 1. Correlogram for CCR2 locus.

I nostri dati sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura (tabella 2; figura 2). Per quanto riguarda l'Europa e il Mediterraneo dalla figura 2 si può notare che il range di variazione degli alleli dei loci esaminati sono: per il CCR5-Δ32 le frequenze sono comprese tra il 14% (Polonia) e l'1,6% (Sardegna); per il CCR2-64I le frequenze variano tra il 18% (Polonia) e il 6,8% (Sardegna). Si è poi operato un confronto con le popolazioni di altri continenti utilizzando le frequenze alleliche mediante l'analisi dell'R-matrix (Harpending and Jenkins 1973). Dal grafico costruito utilizzando le prime due componenti (figura 3) si può notare che la prima componente, che rappresenta il 68% della variabilità totale, separa le popolazioni europee (che hanno valori positivi) dalle altre popolazioni. La seconda componente (32% di variabilità) separa invece le popolazioni nord europee da quelle del sud Europa, e quelle asiatiche da quelle africane, che clusterizzano entrambe in un quadrante a parte. La popolazione che ha contribuito maggiormente alla variabilità riscontrata è la Polonia, mentre quella che ha contribuito in minor misura è l'Italia.

Europa	D32	64I	Rif. Bibliografici
Corsica	5,2	7,2	Presente studio
Sardegna	1,6	6,8	Presente studio
Turchia	3,0	11,0	Presente studio
Baleari	8,9	8,9	Presente studio
Italia	3,0	13,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Nord Europa	9,0	16,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Germania	7,0	13,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Spagna	2,0	8,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Polonia	14,0	18,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Belgio	11,9	7,4	Struyf <i>et al.</i> , 2000
Grecia	5,2	14,6	Papa <i>et al.</i> , 2000
Africa	D32	64I	
Pigmei Biaka	0,0	11,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Pigmei Mbuti	0,0	10,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Lissongo	0,0	14,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Benin	0,0	11,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Sudan	0,0	19,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Nigeria	0,0	12,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Tunisia	1,0	19,3	Barbouche <i>et al.</i> , 2001
America	D32	64I	
Karitiana	0,0	7,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Surui	0,0	3,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Mayan	0,0	33,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Nativi Americani	0,0	31,1	Iyer <i>et al.</i> , 2001
Asia - Oceania	D32	64I	
Aborigeni Australiani	0,0	10,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Nuova Guinea	0,0	14,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Nord Cina	0,0	20,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Est Cina	0,0	19,2	Su <i>et al.</i> , 2000
Tibet	2,0	28,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Nord Est Thailandia	0,0	17,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Malesia	0,0	22,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Giava	0,0	10,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Cambogia	1,0	18,5	Su <i>et al.</i> , 2000
Corea	0,0	26,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Giappone	0,0	17,5	Su <i>et al.</i> , 2000
Buryat	0,0	57,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Assam caste	0,0	22,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Rajasthani	5,0	5,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Ahom	0,0	19,0	Su <i>et al.</i> , 2000
Sud Iran	1,5	12,2	Gharagozloo <i>et al.</i> , 2005
Emirati Arabi	0,0	6,0	Su <i>et al.</i> , 2000

Tabella 2. Frequenze alleliche dei marcatori analizzati in popolazioni provenienti dai diversi continenti.
Table 2. Allele frequencies for the used genetic markers in populations from different continents.

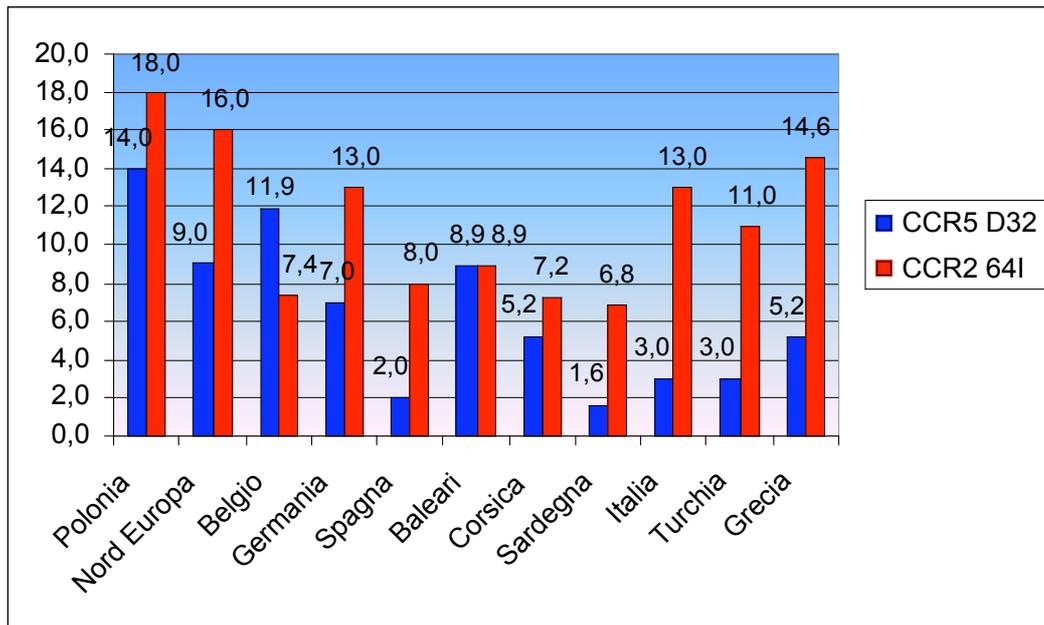


Figura 2. Distribuzione del CCR5-Δ32 e del CCR2 64I in Europa.
Figure 2. CCR5-Δ32 and CCR2-64I distribution in Europe.

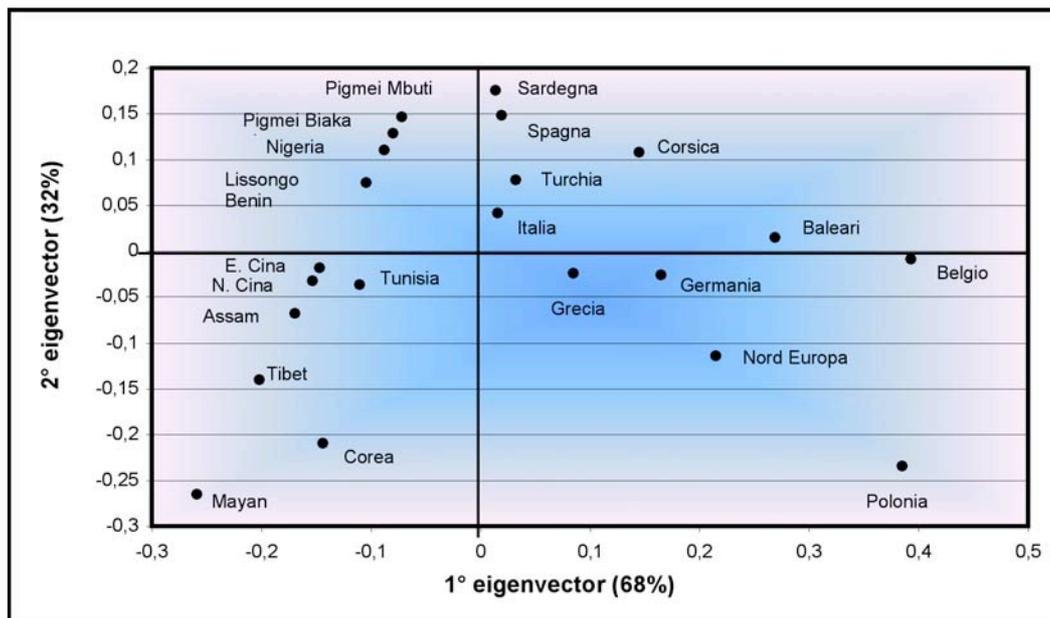


Figura 3. Analisi dell'r-matrix: plot dei primi due eigenvectors.
Figure 3. R-matrix analysis: plot of the first two eigenvectors.

Discussione

In questo lavoro è stata studiata la distribuzione dei polimorfismi CCR5-Δ32 e CCR2-64I in alcune popolazioni provenienti dalle principali isole del Mediterraneo (Isole Baleari, Sardegna e Corsica) e dalla Turchia. I risultati mostrano che le frequenze alleliche del CCR5-Δ32 hanno dei valori che vanno dal 8,9% delle Isole Baleari all'1,6% della Sardegna. Il valore riscontrato per la Sardegna si è inferiore a quello riportato da Libert *et al.* (1998), che riportano un 4%, mentre si discosta poco dalle frequenze indicate da Battiloro *et al.* (2000) (2,1%). Per la Corsica (Ajaccio)

Lucotte and Mercier (1998) riportano un 0,9%, contro un 5,2% del nostro campione. Tale differenza può essere dovuta al motivo che il campione da noi esaminato proveniva da diverse aree isolate della Corsica come Corte e Balagna. La Turchia nella nostra analisi mostra un valore del 3%, simile a quello riportato da Degerli *et al.* 2005 (2,18%) e inferiore a quello riportato da Libert *et al.*, 1998 (6,3%). Per quanto riguarda le Isole Baleari è stato osservato un valore del $\Delta 32$ del 8,9%. In generale le frequenze riportate nel nostro lavoro hanno dei valori nell'ordine di quelli osservati da altri autori per le popolazioni dell'Europa, dove è presente un gradiente Nord – Sud, con i valori inferiori presenti nelle regioni meridionali (Libert *et al.*, 1998). Solo le Isole Baleari sembrano possedere una frequenza più elevata, come riportato da Alvarez *et al.* (1998) per altre popolazioni iberiche, le quali mostrano frequenze del $\Delta 32$ che arrivano sino al 9,6%.

Per quanto riguarda il CCR2-64I, la Sardegna e la Corsica sono caratterizzate da valori che si posizionano fra i più bassi rispetto a quelli sinora riportati per le popolazioni europee. La frequenza è paragonabile solo a quella del Belgio, con un 7,4% (Struyf *et al.*, 1999).

In generale la distribuzione del CCR5- $\Delta 32$ è limitata all'Europa e al Nord Africa a parte alcune eccezioni, che riguardano il Tibet con un 2% e il Rajasthan con il 5% (Martinson *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1998; Su *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1997; Barbouche *et al.*, 2001) (tabella 2).

Il CCR2-64I possiede un'origine più antica del CCR5- $\Delta 32$ risalendo a circa 32000 anni (Kostrikis and Martinson, 1999), ciò è testimoniato dalla sua presenza in tutti i continenti. In particolare le frequenze più elevate sono state riscontrate tra i Buriati (popolazione che vive nella Siberia orientale, al confine con la Mongolia), dove è stata osservata una frequenza del 57% e tra alcune popolazioni native americane come i Mayan (33%). Tra le altre popolazioni asiatiche la frequenza del 64I è compresa tra il 28% e il 6%. Nel continente africano i valori sono compresi tra il 19,3% e il 10% mentre in Europa sono compresi tra il 18% e il 6,8% (Martinson *et al.*, 2000; Struyf *et al.*, 2000; Su *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2000; Barbouche *et al.*, 2001).

L'analisi dell'R-matrix rivela una separazione abbastanza puntuale tra le popolazioni dei tre continenti Africa, Asia ed Europa. Il grafico ricavato dall'analisi dell'R-matrix (figura 3) raggruppa nel quadrante con i valori positivi dei due eigenvector alcune popolazioni dell'area mediterranea che hanno avuto relazioni più o meno strette tra loro. Manca in questo cluster la Grecia che ha avuto un forte peso sulla composizione genetica dell'Italia e della Corsica (Piazza *et al.*, 1988).

Sardegna e Spagna appaiono le popolazioni più affini. È nota la presenza spagnola nell'isola protrattasi per diversi secoli che sicuramente può aver determinato tale affinità già segnalata da precedenti lavori (Vona *et al.*, 1994). Ma influssi dalla penisola iberica sulla Sardegna erano presenti già in epoca preistorica come indicato da lavori sul mtDNA e sugli aplotipi del cromosoma Y (Torroni *et al.*, 1998; Scozzari *et al.*, 2001; Tofanelli *et al.*, 2004).

I dati provenienti dai marcatori classici e dal DNA mitocondriale suggeriscono un'origine comune delle popolazioni delle due isole e quindi una certa similarità genetica (Varesi *et al.*, 2000; Vona *et al.*, 2002; Vona *et al.*, 2003). I risultati confermano l'affinità tra corsi e sardi. La non perfetta identità tra le due isole, sarebbe da attribuire alla loro storia demografica (bassa densità di popolazione, sottopopolazioni isolate, epidemie), che avrebbe portato a fenomeni di deriva genetica e all'isolamento (Vona, 1997; Vona *et al.*, 2002).

La presenza dell'Italia continentale nello stesso cluster con la Sardegna e la Corsica sembra indicare che le due isole hanno avuto apporti continentali. Questo fatto è dimostrato da altre analisi sui marcatori aploidi del mtDNA e dell'Y (Morelli *et al.*, 2000; Tofanelli *et al.*, 2004).

La particolare posizione delle Isole Baleari all'interno del cluster può trovare una possibile spiegazione nella peculiarità genetica della popolazione di Ibiza. Per alcuni marcatori tale isola sarebbe più simile alle popolazioni del Nord Africa (Picornell *et al.*, 1996) che alle altre due isole dell'arcipelago (Maiorca e Minorca) e alle altre popolazioni del Mediterraneo (Moral 1986; Miguel and PetitPierre 1989; Miguel *et al.*, 1990; Massanet *et al.*, 1997).

Le frequenze relative all'allele CCR2-64I sembrano indicare un gradiente dell'allele dal centro Europa, dove presenta la sua massima frequenza verso due direzioni: il Mediterraneo occidentale e quello orientale. Lo stesso andamento si può notare per l'allele CCR5- $\Delta 32$. Questi risultati sembrano convalidare le osservazioni riportate da Libert *et al.* (1998) per il CCR5- $\Delta 32$ sull'esistenza di un gradiente e l'andamento geografico espresso dal correlogramma per il locus CCR2 (figura 1).

In generale dai risultati ottenuti si può affermare che i due marcatori hanno mostrato una certa validità dell'impiego dei marcatori nelle analisi popolazionistiche sia a livello delle popolazioni continentali sia a livello delle popolazioni intracontinentali.

Bibliografia

- Aarons, E., Fernandez, M., Rees, A., McClure, M., e Weber, J., 1997, CC-chemokine receptor 5 genotypes and in vitro susceptibility to HIV-1 of a cohort of British HIV-exposed uninfected homosexual men. *AIDS*, 11(5):688-689.
- Alvarez, V., Lopez-Larrea, C., e Coto, E., 1998, Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users. *Hum Genet*, 102(4), 483-486.
- Barbouche, R.M., Hong, L., Dellagi, K., e Kostrikis, L.G., 2001, Contrasting frequencies of CCR5delta32 and CCR2-64I alleles in the Tunisian population. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 26(3), 298-299.
- Battiloro, E., Androni, M., Parisi, S.G., Mura, M.S., Sotgiu, G., Aceti, A., Cossu, G., Concia, E., Verna, R., e D'Ambrosio, E., 2000, Distribution of the CCR5 delta32 allele in Italian HIV type 1-infected and normal individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16(2), 181-182.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., e Bonhomme, F., 2002, GENETIX 4.03, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Biti, R., French, R., Young, J., Bennet, B., e Steward, G., 1997, HIV-1 infection in a individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med*, 3, 252.
- de Roda Husman, A.M., Koot, M., Cornelissen, M., Keet, I.P., Brouwer, M., Broersen, S.M., Bakker, M., Roos, M.T., Prins, M., de Wolf, F., Coutinho, R.A., Miedema, F., Goudsmit, J., e Schuitemaker, H., 1997, Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*, 127(10), 882-890.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlohov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., e O'Brien, S.J., 1996, Genetics restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science*, 273, 1856.
- Degerli, N., Yilmaz, E., e Bardakci, F., 2005, The Delta32 allele distribution of the CCR5 gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population. *Clin Biochem*, 38(3), 248-252.
- D'Souza, M.P., e Harden, V.A., 1996, Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat Med*, 2(12), 1293-1300.
- Eugen-Olsen, J., Iversen, A.K., Garred, P., Koppelhus, U., Pedersen, C., Benfield, T.L., Sorensen, A.M., Katzenstein, T., Dickmeiss, E., Gerstoft, J., Skinhoj, P., Svejgaard, A., Nielsen, J.O., e Hofmann, B., 1997, Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS*, 11(3),305-310.
- Excoffier, L., e Slatkin, M., 1995, Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol*, 12(5),921-927.
- Galvani, A.P., e Montgomery, S., 2003, Evaluating plague and smallpox as historical selective pressure for the CCR5-Δ32 HIV-resistance allele. *PNAS*, 100,25.
- Guo, S.W., e Thompson, E.A., 1992, Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48(2), 361-372.
- Gharagozloo, M., Doroudchi, M., Farjadian, S., Pezeshki, A.M., Ghaderi, A., 2005, The frequency of CCR5Delta32 and CCR2-64I in southern Iranian normal population. *Immunol Lett*, 96(2):277-281.
- Harpending, H.C, e Jenkins, T., 1973, Genetic distance among southern African populations. In MH Crawford and PL Workman (eds.): *Methods and Theories in anthropological Genetics*. Albuquerque University of New Mexico Press; 177 – 199.

- Huang, Y., Paxton, W.A., Wolinsky, S.M., Neumann, A.U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., Kunstman, K., Erickson, D., Dragon, E., Landau, N.R., Phair, J., Ho, D.D., e Koup, R.A., 1996, The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*, 2, 1240-1243.
- Kostrikis, L.G., e Martinson, J.J., 1999, Global distribution and origin of the CCR2-64I/CCR5-59653-T HIV disease-protective haplotype. *Conf Retroviruses Opportunistic Infect* Jan 31-Feb 4, 6th, 174.
- Libert, F., Cochaux, P., Beckman, G., Samson, M., Aksenova, M., Cao, A., Czeizel, A., Claustres, M., de la Rua, C., Ferrari, M., Ferrec, C., Glover, G., Grinde, B., Guran, S., Kucinskas, V., Lavinha, J., Mercier, B., Ogur, G., Peltonen, L., Rosatelli, C., Schwartz, M., Spitsyn, V., Timar, L., Beckman, L., e Vassart, G., 1998, The *delta*CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet*, 7(3), 399-406.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., e Landau, N.R., 1996, Homozygous defect in HIV – 1 coreceptor accounts for resistance of some multiply – exposed individuals to HIV – 1 infection. *Cell*, 86, 367 – 377.
- Lucotte, G., e Mercier, G., 1998, Distribution of the CCR5 gene 32-bp deletion in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 19(2), 174-177.
- Lucotte, G., e Dieterlen, F., 2003, More about the Viking hypothesis of origin of the Δ 32 mutation in the CCR5 gene conferring resistance to HIV-1 infection. *Infection, Genetics and Evolution*, 3, 293-295.
- Martison, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y., e Clegg, J.B., 1997, Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature Genetics*, 16(1), 100-103.
- Martison, J.J., Karanickolas, R., Moore, J.P., e Kostrikis, L.G., 2000, Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS*, 14, 483-489.
- Massanet, M.F., Castro, J.A., Picornell, A., Misericordia Ramon, M., 1997, Study of the populations of the Balearic Islands (Spain) using mtDNA RFLPs. *Hum Biol*, 69(4), 483-498.
- Michael, N.L., Nelson, J.A., KewalRamani, V.N., Chang, G., O'Brien, S.J., Mascola, J.R., Volsky, B., Louder, M., White, G.C. 2nd, Littman, D.R., Swanstrom, R, e O'Brien, T.R., 1998, Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 Δ 32. *J Virol*, 72(7), 6040-6047.
- Miguel, A., e Petitpierre, E., 1989, Red-cell enzyme polymorphisms in Ibiza (Balearic Islands, Spain). *Hum Hered*, 39(6), 351-355.
- Miguel, A., Castro, J.A., Ramon, M.M., e Petitpierre, E., 1990, Red cell enzyme polymorphisms in the Balearic Islands. II. A comparison based on multivariate analyses. *Gene Geogr*, 4(2), 89-98.
- Morelli, L., Grosso, M.G., Vona, G., Varesi, L., Torroni, A., e Francalacci, P., 2000, Frequency distribution of mitochondrial DNA haplogroups in Corsica and Sardinia. *Hum Biol*, 72(4):585-595.
- Moral, P. 1986, Estudio antropogenetico de diversos polimorfismos hematològicos en la isla de Menorca. Ph D. Thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
- O'Brien, T.R., Winkler, C., Dean, M., Nelson, J.A., Carrington, M., Michael, N.L., e White, G.C. 2nd., 1997, HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 Δ 32. *Lancet*, 349(9060), 1219.
- Ohta, T., e Kimura, M., 1969, Linkage disequilibrium at steady state determined by random genetic drift and recurrent mutation. *Genetics*, 63, 229 – 238.
- Piazza, A., Cappello, N., Olivetti, E., e Rendine S., 1988, A genetic history of Italy. *Ann Hum Genet*, 52 (3):203-213.
- Picornell, A., Miguel, A., Castro, J.A., Misericordia Ramon, M., Arya, R., e Crawford, M.H., 1996, Genetic variation in the population of Ibiza (Spain): genetic structure, geography, and language. *Hum Biol*, 68(6), 899-913.

- Rana, S., Besson, G., Cook, D.G., Rucker, J., Smyth, R.J., Yi, Y., Turner, J.D., Guo, H.H., Du, J.G., Peiper, S.C., Lavi, E., Samson, M., Libert, F., Liesnard, C., Vassart, G., Doms, R.W., Parmentier, M., e Collman, R.G., 1997, Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *J Virol*, 71(4),3219-3227.
- Rappaport, J., Cho, Y.Y., Hendel, H., Schwartz, E.J., Schachter, F., e Zagury, J.F., 1997, 32 bp CCR-5 gene deletion and resistance to fast progression in HIV-1 infected heterozygotes. *Lancet*, 349(9056), 922-923.
- Raymond, M., e Rousset, F., 1995, Genepop (ver. 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 86, 248-249.
- Samson, L., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtronboy, G., George, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R.J., Colliman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G., e Parmentier, M., 1996, Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382, 722.
- Schneider, S., Roessli, D., e Excoffier, L., 2000, Arlequin: a software for population genetics data analysis (Ver 2.000). Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Scozzari, R., Cruciani, F., Pangrazio, A., Santolamazza, P., Vona, G., Moral, P., Latini, V., Varesi, L., Memmi, M., Romano, V., De Leo, G., Gennarelli, M., Jaruzelska, J., Villems, R., Parik, J., Macaulay, V., e Torroni, A., 2001, Human Y-chromosome variation in the western Mediterranean area: implications for the peopling of the region. *Hum Immunol*, 62(9):871-884.
- Smith, M.W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Lomb, D.A., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Kaslow, R., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Vlahov, D., Hoots, K., Hilgartner, M.W., e O'Brien, S.J., 1997, Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science*, 1997, 277(5328), 959-965.
- Stephens, J.C., Reich, D.E., Goldstein, D.B., Shin, H.D., Smith, M.W., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Allikmets, R., Schriml, L., Gerrard, B., Malasky, M., Ramos, M.D., Morlot, S., Tzetzis, M., Oddoux, C., Di Giovine, F. S., Nasioulas, G., Chandler, D., Aseev, M., Hanson, M., Kalaydjieva, L., 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, S. J., e Dean, M., 1998, Dating the Origin of the CCR5-Δ32 aids-Resistance Allele by the Coalescence of Haplotypes. *Am J Hum Genet*, 62, 1507-1515.
- Struyf, F., Thoelen, I., Charlier, N., Keyaerts, E., Van der Donck, I., Wu, J., e Van Ranst, M., 2000, Prevalence of CCR5 and CCR2 hiv-coreceptor gene polymorphisms in Belgium. *Hum Hered*, 50, 304-307.
- Su, B., Jin, L., Hu, F., Xiao, J., Luo, J., Lu, D., Zhang, W., Chu, J., Du, R., Geng, Z., Qiu, X., Xue, J., Tan, J., O'Brien, S. J., e Chakraborty, R., 1999, Distribution of Two HIV-1-Resistance Polymorphism (SDF1-3'A and CCR2-64 I) in East Asian and population and Its Implication in AIDS Epidemiology. *Am J Hum Genet*, 65, 1047-1053.
- Su, B., Sun, G., Lu, D., Xiao, J., Hu, F., Chakraborty, R., Deka, R., e Jin, L., 2000, Distribution of three HIV-1 resistance-conferring polymorphism (SDF1-3'A, CCR2-64 I, and CCR5-Δ32) in global population. *Eur J Hum Genet*, 8, 975-979.
- Theodorou, I., Meyer, L., Magierowska, M., Katlama, C., e Rouzioux, C., 1997, HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet*, 349(9060), 1219-1220.
- Torroni, A., Bandelt, H.J., D'Urbano, L., Lahermo, P., Moral, P., Sellitto, D., Rengo, C., Forster, P., Savontaus, M.L., Bonne-Tamir, B., e Scozzari, R., 1998, mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am J Hum Genet*, 62(5):1137-1152.

- Tofanelli, S., Taglioli, L., Varesi, L., e Paoli, G., 2004, Genetic history of the population of Corsica (western Mediterranean) as inferred from autosomal STR analysis. *Hum Biol*, 76(2):229-251.
- Varesi, L., Memmi, M., Cristofari, M.C., Mamei, G.E., Calò, C.M., e Vona, G., 2000, Mitochondrial control-region sequence variation in the Corsican population, France. *Am J Hum Biol*, 12(3), 339-351.
- Vona, G., Salis, M., Bitti, P., e Succa, V., 1994, Blood groups of the sardinian population (Italy). *Anthrop Anz*, 52, 4, 297-304.
- Vona, G., 1995, Le caratteristiche genetiche dei sardi. *Antropologia contemporanea*. 18 (3-4), 101-109.
- Vona, G., 1997, The peopling of Sardinia (Italy): History and effects. *Int J Anthropol*, 12, 71-87.
- Vona, G., Memmi, M., Calò, C.M., Latini, V., Vacca, L., Succa, V., Ghiani, M.E., Moral, P., e Varesi, L., 2002, Genetic structure of the Corsican population (France) : a review. *Recent Res Devel Human Genet*, 1, 147-164.
- Vona, G., Moral, P., Memmi, M., Ghiani, M.E., e Varesi, L., 2003, Genetic structure and affinities of the Corsican population (France): classical genetic markers analysis. *Am J Hum Biol*, 15(2), 151-163.