

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DE $\Delta ccr5$ E
COMPARAÇÃO COM A DISTRIBUIÇÃO DE
FREQUÊNCIAS ENCONTRADAS EM INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HIV-1 NA POPULAÇÃO DE
PERNAMBUCO**

ANA KAROLINA VANDERLEI MACÊDO

**RECIFE
2003**

ANA KAROLINA VANDERLEI MACÊDO

**DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DE $\Delta ccr5$ E
COMPARAÇÃO COM A DISTRIBUIÇÃO DE
FREQUÊNCIAS ENCONTRADAS EM INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HIV-1 NA POPULAÇÃO DE
PERNAMBUCO**

Dissertação Apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Genética da Universidade Federal
de Pernambuco para Obtenção do Grau de Mestre
em Genética

Orientador: Prof. Dr. Luiz Maurício da Silva

**RECIFE
2003**

Aos meus pais, Clenilson e Rejane

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar luz e paz;

Aos meus pais, Clenilson e Rejane, minhas irmãs, Karla e Keila, por todos os dias felizes que estivemos juntos e aos meus sobrinhos, Filipe, Bruno, Júlia e Davi, que apesar de tão pequenos já significam tanto para mim;

Às minhas grandes e eternas amigas, Michele Havro e Eryca Maciel, presentes em todos os momentos;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Maurício da Silva e sua esposa Profa. Dra. Rosilda dos Santos Silva, por todos os ensinamentos;

Ao Hospital Correia Picanço, em especial ao Dr. Frederico Rangel e à Dra. Elizabete Guimarães, pela importante ajuda na obtenção da amostra de indivíduos soropositivos;

À equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana, em especial a Maria da Glória e Kasuo Kajihara pela ajuda e amizade;

Ao Rubens Oliveira, pela ajuda nos momentos que me faltavam clareza;

À Adriana Gomes, por me fazer sentir que nossos obstáculos não são maiores que os dos outros;

À Edileine Dellalibera, pela ajuda não só no período do mestrado mas também na época do meu estágio no LGMH;

À Fernanda Felício, agora mestra em genética, pelo carinho e amizade;

A todos, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1. RESUMO	7
2. INTRODUÇÃO	9
3. REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1. A IMPORTÂNCIA DA TEORIA DA EVOLUÇÃO PARA A COMPREENSÃO DAS DOENÇAS HUMANAS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.2. A ORIGEM DO VÍRUS HIV.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.3. O PAPEL DO ALELO <i>CCR5</i> Δ32 NA INFECÇÃO PELO HIV-1.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.3.1. RECEPTOR CC-QUIMIOCINA 5.....	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.3.2. QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.3.3. RECEPTORES E CO-RECEPTORES PARA O HIV-1	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.3.4. AFINIDADE DO VÍRUS HIV-1 PELOS RECEPTORES QUIMIOCINAS.....	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.3.5. O GENE <i>ccr5</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.4. POLIMORFISMO DO GENE <i>CCR5</i> E SUAS CONSEQÜÊNCIAS.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.4.1. O ALELO <i>ccr5</i> Δ32 E PROGRESSÃO DA INFECÇÃO PELO HIV-1	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.4.2. OUTRAS VARIANTES DO GENE <i>ccr5</i> ...	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.5. ORIGEM DA DELEÇÃO DE 32 PARES DE BASES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

3.6. DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DO ALELO <i>CCR5</i>Δ32	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.7. POSSÍVEL EXISTÊNCIA DE SELEÇÃO A FAVOR DO ALELO <i>CCR5</i>Δ32	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
4. ARTIGO	42
5. ABSTRACT	55

1. RESUMO

Desde a descoberta de que a proteína CCR5 serve como co-receptor de superfície celular para o vírus HIV-1 em células CD4, o gene que codifica essa proteína tem sido tema central de estudos genéticos na patogênese da AIDS. Uma deleção de 32pb neste gene fornece uma proteção contra a infecção pelo HIV-1 em homozigotos para este alelo na transmissão sexual. Este trabalho tem como finalidade detectar e comparar as frequências desta deleção nos indivíduos normais e infectados pelo vírus em Pernambuco. Para tanto, foram coletados sangue venoso de 251 indivíduos não aparentados de Pernambuco e de 260 indivíduos infectados pelo HIV-1 do Hospital Correia Picanço/PE. O DNA foi extraído por *mini salting-out* e digestão com proteinase K. A PCR foi realizada utilizando programa de amplificação e *primers* específicos. Os fragmentos amplificados foram submetidos a PAGE desnaturante a 7%, e coloração com AgNO₃. A frequência do alelo mutante *ccr5Δ32* foi de 0,042 na amostra controle e na amostra de pacientes infectados. A amostra controle está em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, com excesso de homozigotos para a deleção, sugerindo a ocorrência de seleção a favor dos homozigotos. Fora a ação de seleção natural, apenas o fluxo gênico explicaria este desequilíbrio. No entanto não há registros de migração recente de europeus para o Nordeste brasileiro. Não está descartada a possibilidade do desequilíbrio observado ter sido causado por outros fatores que não o HIV. Dos indivíduos infectados, 22 eram heterozigotos e nenhum era homozigoto para deleção.

2. INTRODUÇÃO

A partir da descoberta de que o receptor CC-quimiocina 5 (CCR5) serve como co-receptor de superfície celular para o vírus HIV-1, o gene que codifica esta proteína tem sido o tema central de estudos genéticos na patogênese da AIDS. Este gene está localizado no cromossomo 3 humano na região p21, entre um grupo de genes que codificam múltiplos receptores de quimiocinas (Rapport *et al.*, 1996; Mourichi *et al.*, 1997; Samson *et al.*, 1996b).

Um grande número de variantes genéticas dentro da região codificante e da região reguladora 5' foram identificadas, essas variantes originam conseqüências funcionais diferentes na patologia pelo HIV-1. Uma dessas variantes é a deleção de 32 pares de bases (pb) na região codificadora do segundo *loop* extracelular (éxon 4) do gene *ccr5*, produzindo um códon finalizador prematuro que origina uma proteína truncada não detectada na superfície celular (Carrington *et al.*, 1999).

Alguns indivíduos são expostos ao HIV-1, mas continuam não infectados. Esses indivíduos possuem a deleção de 32pb em homozigose no gene *ccr5*, a qual parece proteger indivíduos homozigotos na transmissão sexual do HIV-1 (Liu *et al.*, 1996). A descoberta de que esses indivíduos resistentes a infecção pelo HIV-1 são homozigotos para a deleção (*ccr5* Δ 32/*ccr5* Δ 32), levou a sugerir que heterozigotos para a deleção (*ccr5*/*ccr5* Δ 32) poderiam ter uma possível proteção (Liu *et al.*, 1996). Alguns trabalhos demonstraram que heterozigotos (*ccr5*/*ccr5* Δ 32) tinham

uma progressão mais lenta para AIDS do que homozigotos normais (*ccr5/ccr5*) (Dean *et al.*, 1996).

A multiplicidade dos efeitos genéticos do *ccr5* na infecção pelo HIV-1 revela a grande importância deste gene no estudo epidemiológico da AIDS e fornece uma lógica para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com alvo na interação do envelope do vírus com o receptor CCR5.

O presente trabalho tem como objetivos:

- 1) Determinar a frequência do alelo *ccr5*Δ32 na população do Estado de Pernambuco e em indivíduos infectados pelo HIV-1;
- 2) Comparar as frequências genóticas observadas nos dois grupos de indivíduos (infectados e controle), verificando possíveis diferenças significativas;
- 3) Comparar a distribuição do alelo mutante *ccr5*Δ32 e frequências genóticas com outras populações.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A IMPORTÂNCIA DA TEORIA DA EVOLUÇÃO PARA A COMPREENSÃO DAS DOENÇAS HUMANAS

Por que o nosso corpo possui falhas tornando-o vulnerável à doenças? Se a evolução por seleção natural produziu um mecanismo sofisticado tal como olhos, coração, e cérebro, por que não desenvolvemos caminhos para prevenir miopia, ataque do coração e doença de Alzheimer? Se nosso sistema imune pode reconhecer e atacar milhões de proteínas estranhas, por que ainda adquirimos pneumonia? Se a fita de DNA pode codificar seqüências para um organismo adulto com 10 trilhões de células especializadas, por que nós não podemos desenvolver reparo para as perdas? Se nós podemos viver 100 anos, por que não 200 anos? (Williams & Nesse, 1999)

Cada vez mais sabemos por que indivíduos adquirem doenças específicas, mas ainda é pequena a compreensão do por que existem todas essas doenças. Sabemos que uma dieta rica em gordura pode causar doenças do coração e a exposição ao sol pode causar câncer de pele, mas por que desejamos gordura e luz do sol? Por que nosso corpo não pode reparar a obstrução das artérias e os danos causados na pele pelo sol? E por que ainda adquirimos, depois de milhões de anos, a infecção pelo *Streptococcus*? (Williams & Nesse, 1999)

O grande mistério da medicina no presente é conhecer quais as falhas que causam o aumento do número de doenças. A evolução transforma esse mistério em uma série de questões sem resposta. Por que não temos o processo Darwiniano da seleção natural de forma constante eliminando os genes que provocam suscetibilidade a doenças? Por que não temos genes selecionados que poderiam perfeitamente aumentar nossas habilidades para resistir a danos e aumentar os reparos, assim como eliminar o envelhecimento? A resposta comum - que a seleção natural não é suficientemente potente - é usualmente errada, pois o nosso corpo é um pacote de cuidadosos reparos. Uma perspectiva Darwiniana na medicina pode ajudar a compreender a origem evolucionária das doenças (Williams & Nesse, 1999).

A evolução, fundamentalmente, é um processo que envolve mudanças genéticas na estrutura das populações e todo fator capaz de alterar frequências alélicas é um agente potencial de evolução. O modelo de Hardy-Weinberg estabelece que uma população “ideal”, de tamanho infinitamente grande, atinge um equilíbrio ou estado estático. Em populações grandes, com acasalamentos ao acaso, e na ausência das forças responsáveis pelas alterações das frequências alélicas, existe um estado de equilíbrio. Os fatores evolutivos que, sabidamente, causam alterações nas frequências alélicas são a seleção, a mutação, a migração e a deriva genética. Estas forças atuam em conjunto, de tal modo que a população atinge e mantém um estado de equilíbrio enquanto as condições permanecerem razoavelmente constantes. Quando as condições mudam, ou acontece um desvio aleatório do ponto original de equilíbrio, há uma tendência no sentido de um novo ponto de equilíbrio (Gregg & Mettler, 1969).

3.2. A ORIGEM DO VÍRUS HIV

Mais de dez milhões de pessoas estão infectadas com o vírus HIV-1; mais de um milhão de pessoas estão desenvolvendo a AIDS ou morreram com AIDS. Esses números são ainda relativamente pequenos quando comparados aos impostos por outros organismos, como o vírus influenza (Ewald *et al.*, 1999).

Evidências moleculares sugerem que o HIV tem infectado o homem por décadas ou séculos. Os dois maiores grupos de HIV-1 e HIV-2 divergiram há um ou dois séculos atrás de um ancestral comum para os vírus HIV e SIV (vírus da imunodeficiência em símios). Com base nas seqüências de ácidos nucleicos do HIV-1, foi proposto que a região do oeste e central da África poderia ser o epicentro evolucionário do HIV-1 (Ewald *et al.*, 1999).

Várias teorias sugerem a transmissão entre espécies como acidentes biomédicos envolvendo células infectadas com o SIV na produção de vacinas para poliomielite ou em experimentos com inoculações do protozoário causador da malária. Outra hipótese da transmissão entre humanos e outros primatas seria a transmissão por um vetor (Ewald *et al.*, 1999).

O tempo entre a soroconversão e o desenvolvimento para AIDS é bastante variável, de dez anos a apenas alguns meses. Pessoas que foram infectadas por transfusão sanguínea desenvolveram AIDS mais rapidamente do que as infectadas por relação sexual. A explicação para essas observações estaria na relação da carga viral presente no sangue, sêmen e fluidos vaginais. Considerando as características do vírus no início da infecção e as características dos indivíduos infectados, surgem variações nas características do desenvolvimento da infecção (Ewald *et al.*, 1999).

3.3. O PAPEL DO ALELO *ccr5*Δ32 NA INFECÇÃO PELO HIV-1

3.3.1. RECEPTOR CC-QUIMIOCINA 5

Samson *et al.* (1996a) identificaram um novo gene humano e sua expressão funcional, chamado ChemR13. Este gene codifica uma proteína de 352 aminoácidos

com uma massa molecular calculada em 40.600 Da. A organização genômica do loco foi investigada demonstrando que este gene está ligado por uma distância de 17,5 kb ao gene que codifica o receptor CC-quimiocina 2 que é o receptor da proteína quimioatraente de monócito (MCP-1). A resposta fisiológica desta nova proteína às quimiocinas também foi estudada, observando-se que MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófago) era o mais potente agonista e que MIP-1 β e RANTES também eram ativos em concentrações fisiológicas, enquanto as outras quimiocinas não tinham nenhum efeito. ChemR13 é então um membro da crescente família de receptores de quimiocinas que estão envolvidos no recrutamento das células no processo inflamatório e imune. Sendo o quinto receptor identificado de sua classe, este novo receptor de CC-quimiocina foi designado como CCR5.

Neste mesmo ano Rapport *et al.* (1996) clonaram este gene e caracterizaram este novo receptor de CC-quimiocina (CCR5) para RANTES, MIP-1 β e MIP-1 α . O CCR5 é expressado em macrófagos e células T, e é o primeiro exemplo de receptor de quimiocina humano a responder aos sinais dados por MIP-1 β . Naquele trabalho foi identificado que este novo gene está a uma distância de 18kb a jusante do gene que codifica o receptor CC-quimiocina 2, na região 3p21. A sequência de aminoácidos de CCR5 é mais similar a CCR2B, com 71% de resíduos idênticos. Também neste mesmo ano, Combadiere *et al.* (1996) clonaram o cDNA humano do CCR5, que possui 48-74% de aminoácidos idênticos aos outros CCRs. Os RNAs do CCR5 foram detectados em monócitos mas não em neutrófilos e eosinófilos. RANTES, MIP-1 β e MIP-1 α , foram todos potentes agonistas para o CCR5. Este trabalho sugeriu que o CCR5 é um receptor acoplado a proteína G e serve de mediador, para a resposta dos monócitos, a RANTES, MIP-1 β e MIP-1 α .

A expressão do gene que codifica a proteína CCR5 foi observada em altos níveis no timo e baço, em níveis médios nos leucócitos e no sangue periférico, e em baixos níveis nos intestinos, ovários e pulmões. Foi observada também a expressão do gene *ccr5* em linhagens de células hematopoiéticas e linfócitos T. O transcrito

está presente também na linhagem de células mielóides e em células T CD4 (Rapport *et al.*, 1996).

Os quatro genes que codificam os receptores CCR1, CCR2, CCR3 e CCR5 (designados respectivamente CMKBR1, CMKBR2, CMKBR3 e CMKBR5 no *Genome Data Bank*) foram mapeados no braço curto do cromossomo 3 na região p21.3 entre os marcadores AFM362WB9 e WI-6983, com uma distância total de 350kb. O gene CMKBR4 que codifica o receptor CCR4 foi localizado mais distante (3p24) entre os marcadores FB18G7 e D3S1768. Este grupo de genes codificadores de receptores de quimiocinas sugere uma expansão relativamente recente desta família por duplicação de genes. Deleções e duplicações da região 3p21 têm sido descritas em desordens neoplásicas de linhagem hematopoiética, sugerindo uma forte ligação desta família de genes de receptores CC-quimiocinas (Samson *et al.*, 1996b).

Deng *et al.* (1996), Choe *et al.* (1996), Alkhatib *et al.* (1996) e Doranz *et al.* (1996) identificaram o principal co-receptor para o vírus HIV-1. Estes trabalhos sugeriram que a entrada do vírus na célula hospedeira está condicionada à presença da molécula CD4 e de um cofator, e indicaram que o CCR5 e CD4 juntos funcionam cooperativamente como mediador para a entrada do vírus nos macrófagos, facilitando a infecção pelo HIV-1.

3.3.2. QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES

Citocinas são proteínas (geralmente glicoproteínas) de peso molecular relativamente baixo (raramente maiores do que 25 kDa), e frequentemente consistem de uma única cadeia polipeptídica. Elas regulam todos os processos biológicos importantes como crescimento e ativação celular, inflamação, imunidade, reparo tecidual, fibrose e morfogênese. Algumas citocinas são, ainda,

fatores quimiostáticos para tipos celulares específicos e atualmente são designados “quimiocinas” (Roitt *et al.*, 1999).

As quimiocinas compreendem uma grande família de citocinas quimiostáticas estruturalmente homólogas envolvidas no recrutamento e ativação de leucócitos e outros tipos celulares. Todas essas moléculas contêm duas alças internas ligadas por pontes de dissulfeto. Estão classificadas em subfamílias CXC (α -quimiocinas), CC (β -quimiocinas), C e CXXXC quimiocinas, dependendo da distância entre os resíduos de cisteína na região amino-terminal que participam da ligação de dissulfeto. Tradicionalmente, muitas CXC-quimiocinas têm sido implicadas nos eventos mediados por neutrófilos, enquanto as CC-quimiocinas atuam nos monócitos, macrófagos e células T. As quimiocinas são secretadas por uma variedade de tipos celulares, incluindo leucócitos, células dendríticas, células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, hepatócitos e outras. Elas têm sido implicadas numa variedade de condições inflamatórias e mais recentemente seus receptores têm sido identificados como co-receptores para infecção de células hospedeiras pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV-1). As quimiocinas exercem sua função fisiológica através da ligação e ativação dos receptores de membrana celular (Tabela 1). Já foram caracterizados sete receptores específicos para CC-quimiocinas (CCR1-7), cujos genes estão localizados no cromossomo 3 humano e quatro para CXC-quimiocinas (CXCR1-4) cujos genes estão localizados no cromossomo 2 humano (Yang *et al.*, 1999, Hasegawa *et al.*, 2001).

Os receptores de quimiocinas são proteínas unicatenárias. Cruzam a membrana celular sete vezes (Figura 1) e pertencem a uma família de receptores acoplados a proteínas G. As regiões da proteína localizadas para o exterior da célula se unem às quimiocinas e as regiões localizadas para o interior celular acoplam toda a maquinaria sinalizadora, necessária para induzir a resposta celular. A proteína G deflagra a resposta intracelular que resulta em alterações nas funções celulares, tais como ativação, movimento ou migração usualmente ao longo da concentração do

gradiente de quimiocinas e varia dependendo da quimiocina ligante e do tipo celular (Murphy et al., 1996; Premak et al., 1996; McNicholl *et al.*, 1997).

Tabela 1. Quimiocinas, células alvo e seus receptores

Quimiocina	Célula alvo	Receptor
CXC		
IL-8	N, Ba, T	CXCR1, R2
GRO α (MGSA- α)	N	CXCR2
GRO β (MGSA- β MIP-2 α)	N	CXCR2
GRO γ (MIP-2 β)	N	CXCR2
ENA-78	N	CXCR2
NAP-2	N, Ba	CXCR2
LDGF-PBP	Fibroblastos	CXCR2
GCP-2	N	CXCR1, R2
PF4	Fibroblastos, Célis endoteliais	desconhecido
Mig	T ativadas, NK	CXCR3
IP-10	T ativadas, (Th1>Th2)	CXCR3
SDF-1 (PBSF)	BM, T, DC, CD34 ⁺	CXCR4
BCA-1/BLC	B	CXCR5
CC		
MIP-1 α (LD78 α)	Mono/Mac, T (Th1>Th2), NK, Ba, BM, DC	CCR1, R5
MIP-1 β (Act-2, HC-21)	Mono/Mac, T (Th1>Th2),NK, Ba, BM, DC	CCR5
MDC (STPC-1)	Mono, T (Th2>Th1), NK, Ba	CCR4
TECK	Mac, tímócito, DC	CCR9
TARC	T CD4 ⁺	CCR4
RANTES	Mono/Mac, T memória, NK, Ba, Eo	CCR1, R3, R5
HCC-1	Mono, BM	CCR1
LEC/HCC-4	Mono, linfócito	CCR1, R2
DC-CK-1 (PARC, MIP-4, Naïve T>T		Desconhecido

AMAC-1)		
LARC/MIP-3 α	T memória, DC imatura	CCR6
ELC (MIP-3 β)	T, B, DC madura	CCR7
MCP-1	T, Mono, Ba	CCR2, R11
MCP-2	T, Mono, Eo, Ba	CCR2, R3, R11
MCP-3	T, Mono, Eo, Ba, DC	CCR1, R2, R3
MCP-4	T, Mono, Eo, Ba, DC	CCR2, R3, R11
Eotaxina	Eo, células da microglia	CCR3
I-309	T, Mono	CCR8
SLC (6Ckine)	T, B, DC madura	CCR7
ILC/CTACK	T memória	CCR10
C e CXXXC		
Linfotaxina (SCM-1 ATAC)	T, NK	CXCR1
Neurotactina	T, Mono	CX3CR1

Células alvo são designadas como segue: N: Neutrófilo; Ba: basófilo; Mono: monócito; Eo: eosinófilo; Mac: macrófago; NK: célula *Natural killer*; B: linfócito B; T: linfócito T; DC: célula dendrítica; BM: célula de medula óssea; Th1 e Th2: linfócito *helper* tipo 1 e 2, respectivamente (Hasegawa, H. e Fujita, S., 2001).

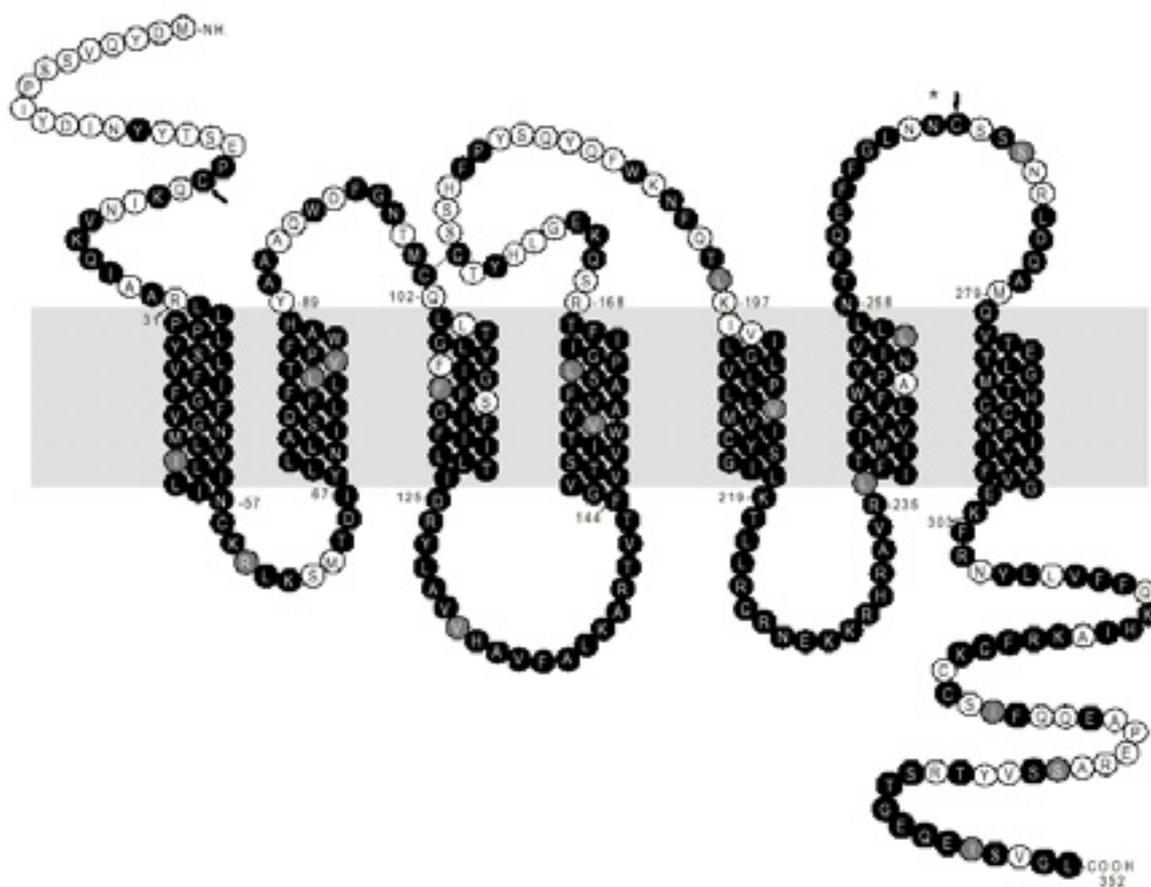


Figura 1 – Estrutura e seqüência de aminoácidos da molécula CCR5, com os sete domínios transmembrânicos, três *loops* intracelular e três *loops* extracelular (McNicholl *et al.*, 1997).

3.3.3. RECEPTORES E CO-RECEPTORES PARA O HIV-1

Os primeiros casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foram relatados em 1981, constituindo por sua patogenicidade, transmissibilidade e virulência, um dos maiores problemas de saúde pública. Mas agora está claro que casos da doença haviam ocorrido sem serem reconhecidos por cerca de quatro anos antes de sua identificação. A doença se caracteriza por uma suscetibilidade a infecção por patógenos oportunistas ou pela ocorrência de uma forma agressiva de Sarcoma de Kaposi ou linfomas de células B, acompanhada de uma profunda diminuição do número de células T CD4. Como parecia se disseminar pelo contato com os fluidos corporais, suspeitou-se inicialmente que ela seria causada por um

novo vírus e, em 1983, o agente agora conhecido como responsável pela AIDS, denominado de “vírus da imunodeficiência humana” (HIV), foi isolado e identificado (Rowland-Jones *et al.*, 1995).

Em 1989 ficou determinado que a molécula CD4 situada na superfície de certas células constituía o principal ponto de entrada do vírus. Os linfócitos T apresentam a proteína CD4 em sua superfície e dirigem muitos aspectos da resposta imune diante de uma agressão por vírus. Também se sabia que o HIV infectava e permanecia durante anos em outras classes de células imunitárias portadoras da molécula CD4, os macrófagos. Em condições normais as moléculas CD4, dos linfócitos e dos macrófagos, participam do sistema de sinalização entre células imunitárias. Mas quando o HIV entra em ação as moléculas CD4 se unem a uma glicoproteína do envelope viral denominado gp120. A fusão dessa molécula com CD4 presente nessas células facilitaria a penetração do vírus no interior da célula (Feng *et al.*, 1996). Embora o HIV-1 necessite da expressão de CD4 para se ligar ao envelope glicoproteico (ENV), diversos estudos têm sugerido que a presença de CD4 não é suficiente para a fusão do envelope viral à membrana celular. Estudos iniciais mostraram que embora células humanas expressando CD4 sejam permissivas para a entrada do vírus, células de camundongos expressando CD4 humano não são. Essas descobertas sugerem que co-fatores específicos para cada espécie existente na superfície das células são necessários, além de CD4, para a entrada do HIV. Estudos subsequentes mostraram que cepas do HIV-1, que tinham se adaptado para crescer em linhagens de células T denominadas cepas T-tropical, poderiam infectar células T primárias, mas não monócitos ou macrófagos. Em contraste muitas cepas infectam monócitos, macrófagos e células T primárias mas não as linhagens de células T transformadas. Essa diferença no tropismo é consequência de diferentes seqüências específicas da subunidade de ENV, da gp120, sugerindo que múltiplos co-fatores específicos para cada tipo de célula são necessários para a entrada do vírus HIV além de CD4. Iniciou-se então a busca de outras moléculas correceptoras (Dragic *et al.*, 1996).

Já em 1995 o grupo liderado por Robert Gallo indicava que algumas quimiocinas bloqueavam a infecção por HIV em ensaios realizados *in vitro*.

3.3.4. AFINIDADE DO VÍRUS HIV-1 PELOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

Na fase precoce da infecção pelo HIV-1, o vírus possui afinidade pelos macrófagos (M-trópico) e invadem essas células pela união da proteína gp120, presente no envelope do vírus, e as moléculas CD4 e CCR5 presentes na superfície dessas células. Na fase média da infecção, algumas moléculas gp120 se alteram tornando-se capazes de reconhecer outro receptor quimiocina (CXCR4) e utilizam esta molécula para invadir os linfócitos T CD4. Neste fase o vírus possui uma dupla afinidade, pois infectam tanto os macrófagos como os linfócitos T CD4. Na fase mais tardia da infecção o vírus possui uma alta afinidade pelos linfócitos T CD4 (T-trópico) e são esses vírus que destroem o sistema imunitário e possibilitam o desenvolvimento da AIDS (O'Brien and Dean, 1997).

As moléculas CCR5 e CXCR4 estão presentes tanto nos monócitos como nos linfócitos T CD4, porém o vírus HIV-1 utiliza a molécula CCR5 para infectar os monócitos e os linfócitos T CD4 e a molécula CXCR4 somente para infectar linfócitos T CD4. Esta afinidade se correlaciona com a habilidade do vírus em induzir a formação de sincício em linhagens de células T. Na virose não formadora de sincício (NSI), a molécula utilizada é o CCR5 e na virose formadora de sincício (SI) a molécula utilizada é o CXCR4. Contudo, em algumas viroses SI podem ser utilizadas ambas as moléculas (McNilcholl *et al.*, 1997).

He *et al.* (1997) estudaram os co-receptores para o HIV-1 em células da microglia que expressam CCR5 e CCR3. Anticorpos anti-CCR3 e MIP-1 β inibiram a infecção pelo HIV-1, sugerindo que ambos os receptores promovem a infecção pelo HIV-1 no Sistema Nervoso Central.

A tuberculose (TB) é a maior doença oportunista em pacientes infectados pelo HIV-1, estando associado com a ativação do sistema imune e aumento da expressão pelo HIV-1. Morris *et al.* (2001) analisaram as propriedades biológicas de isolados de HIV-1 em pacientes com TB ativa. Todos os isolados foram não formadores de sincício (NSI) que utilizam o CCR5 como co-receptor. Nenhum isolado utilizou outro receptor quimiocina (CXCR4, CCR1, CCR2b ou CCR3) como co-receptor. Análise da região V3 do envelope viral mostrou que esses isolados possuíam o motivo GPGQ característico do subtipo C do vírus HIV-1 e também tinham a seqüência típica das viroses NSI. Estes dados indicam que apesar do estado avançado da doença nos pacientes, o vírus HIV-1 ainda utiliza o CCR5 como co-receptor.

Nilholson *et al.* (2001) estudaram a expressão do CCR5 e CXCR4 em células T nativas e de memória na infecção pelo HIV-1 e a resposta a terapia antiretroviral. Concluíram que a elevação do CCR5 é concomitante a ativação do sistema imune e replicação viral, e a diminuição do CXCR4 na progressão da doença e na resposta a terapia.

3.3.5. O GENE *ccr5*

O gene que codifica o CCR5, denominado *ccr5* está organizado com quatro éxons e dois íntrons. Os transcritos parecem iniciar a partir de dois promotores distintos. Um promotor está situado a montante do éxon 1 na extremidade 5' (Pu) e o outro promotor está situado a montante do éxon 3 (Pd). O promotor Pu é um promotor fraco enquanto que o promotor Pd é um promotor forte. As seqüências promotoras (Pu e Pd) têm duas importantes características. Primeiro, a região Pu tem seqüência homóloga à região 3'UTR. O significado disto, se existe algum, não está claro. Segundo, é característico de diversos receptores acoplados à proteína G, que nem Pu nem Pd têm motivos CCAAT ou o clássico TATA. A composição rica em AT dos promotores do CCR5, Pu e Pd, sugere que eles pertencem a uma classe

de promotores recentes. Não existem evidências conclusivas atualmente que sugira que *ccr5* necessite rigorosamente de ativação e inativação durante o desenvolvimento e diferenciação celular (Mummidi et al., 1997; Guinard et al., 1998).

3.4. POLIMORFISMO DO GENE *ccr5* E SUAS CONSEQUÊNCIAS

3.4.1. O ALELO *ccr5*Δ32 E PROGRESSÃO DA INFECÇÃO PELO HIV-1

Alguns indivíduos são expostos ao HIV-1, mas continuam não infectados. Células T CD4 de dois desses indivíduos foram altamente resistentes, *in vitro*, a entrada do HIV-1. Esses indivíduos possuíam um defeito em homozigose, no gene que codifica o CCR5. Este defeito consiste na deleção de 32pb na região codificadora do segundo loop extracelular produzindo um códon finalizador prematuro, dando origem uma proteína truncada que não pode ser detectada na superfície celular. Esta deleção parece proteger os indivíduos homozigotos na transmissão sexual do HIV-1 (Liu *et al.*, 1996).

Dean *et al.* (1996) demonstraram que heterozigotos para a deleção (*ccr5/ccr5*Δ32) tinham uma progressão mais lenta para AIDS do que homozigotos normais (*ccr5/ccr5*). Homozigotos para a deleção (*ccr5*Δ32/*ccr5*Δ32) não se infectariam devido à limitação do gene. No entanto indivíduos com este genótipo foram infectados por diferentes cepas de HIV-1 ou através de outras rotas de infecção, como a transfusão sanguínea, onde a quantidade de vírus seria bem maior do que a recebida por relação sexual. Entretanto, nesses casos a progressão da doença observada foi lenta.

Indivíduos infectados pelo vírus HIV-1 possuem um grande risco de desenvolverem linfomas não-Hodgkin (NHL). O genótipo *ccr5/ccr5*Δ32 está também associado com proteção a linfomas. Ainda que o mecanismo para esta proteção não esteja claro, as células B expressam CCR5 na superfície, e RANTES,

uma das três quimiocinas ligantes do CCR5, que é mitogênica para células B. É possível que RANTES desempenhe um papel importante na expansão do linfoma via CCR5 antes que a vigilância imune tenha uma chance para eliminar as células malignas. Neste caso, o nível diminuído de CCR5 em indivíduos heterozigotos *ccr5/ccr5Δ32* pode ser vantajoso para o controle indireto da expansão do linfoma (Rabkin *et al.*, 1999; Dean *et al.*, 1999).

O fato de declarar que CXCR4 e diversos outros receptores de quimiocinas podem mediar a entrada do HIV-1 para o interior das células, sugere uma precaução em assumir que indivíduos com o genótipo *ccr5Δ32/ccr5Δ32* poderiam ser absolutamente resistentes à infecção pelo HIV-1 (McNicholl *et al.*, 1997).

Buseyne *et al.* (1998) estudaram os efeitos imunológicos e virológicos da mutação em crianças infectadas pelo vírus HIV-1. Os heterozigotos para a deleção possuíam um baixo nível do vírus, alto número de linfócitos T CD4 e uma progressão lenta da infecção.

Wilkinson *et al.* (1998) estudaram 566 indivíduos hemofílicos (23 soronegativos e 543 soropositivos) e 97 indivíduos que receberam transfusão sanguínea (9 soronegativos e 88 soropositivos). Não foi encontrado nenhum paciente homozigoto para a deleção nos 631 indivíduos soropositivos. Nesse trabalho também foi observado que entre os 471 indivíduos hemofílicos soropositivos homozigotos normais e os 72 indivíduos hemofílicos soropositivos heterozigotos não houve diferença na progressão para AIDS. Similarmente, não houve diferença na progressão da doença nos indivíduos observados que receberam transfusão sanguínea.

Visco-Comandini *et al.* (1998) demonstraram que o alelo *ccr5Δ32* é mais freqüente em pacientes soropositivos que não evoluem ou possuem uma progressão lenta da infecção, enquanto que no grupo que evolui rapidamente não foi encontrado este alelo.

Alvarez *et al.* (1998) analisaram soropositivos pertencentes ao grupo de usuário de drogas intravenosa na Espanha (n=150) e controle (n=250). A freqüência

do alelo $\Delta ccr5$ foi de 0.105 e 0.040 no controle e pacientes HIV-1+, respectivamente. Foram estudados 50 soropositivos com evolução lenta e 10 que não evoluem, sendo encontrada a deleção de 32pb no gene *ccr5* e não foi encontrada mutação no gene *cxcr4*. A frequência do alelo *ccr5* Δ 32 entre os pacientes com evolução rápida e pacientes com evolução lenta da doença foi de 3 e 15%, respectivamente. Não foi encontrado nos pacientes o alelo *ccr5* Δ 32 em homozigose comparado a 1% da amostra controle. Isto sugere que a ausência desta mutação confere uma vantagem ao vírus para infectar as células. Em adição, pacientes que carregam este alelo permanecem assintomáticos por um longo período de tempo.

Zamarchi et al. (1999) estudaram a frequência do alelo *ccr5* Δ 32 na Itália. Em 371 indivíduos soronegativos o encontraram em uma frequência de 0,047, sendo significativamente diferente de outras populações européias. Também foram estudados 54 indivíduos soronegativos usuários de drogas intravenosa (0,065), 98 hemofílicos soronegativos (0,051) e 81 hemofílicos soropositivos (0,049), sendo não significativa a diferença nas frequências nesses grupos, sugerindo que a deleção não protege contra a infecção em rotas parenterais. A frequência nos indivíduos progressores foi de 0,042 e nos indivíduos não progressores foi de 0,111.

A relação entre a deleção de 32pb (*ccr5* Δ 32), a mutação CCR2b 64I (substituição da valina pela isoleucina na posição 64 na primeira região transmembrana) e o vírus HIV-1 foi estudada por Schinkel et al. (1999) em 108 indivíduos soropositivos pertencentes a grupo de usuários de drogas intravenosa. A mutação no receptor CCR2b ocorre numa frequência de 0,098 em brancos e 0,151 em africanos. Pesquisas sugeriram que esta mutação está associada com um papel favorável na progressão da doença. Porém o mecanismo desse fenômeno não está claro, pois o CCR2b não é utilizado como co-receptor e a mutação está localizada na região transmembrânica. Neste trabalho não foi encontrada evidência de que essas mutações tivessem algum efeito nos indivíduos infectados, quando comparados com progressão a AIDS, morte ou contagem de células CD4. O

declínio das células CD4 e a carga viral nos três primeiros anos não foi diferente entre os heterozigotos para as mutações e os homozigotos normais. Alternativamente, diferenças no papel da transmissão ou características na variante do HIV-1 poderiam explicar este fenômeno.

Genótipos combinados como *ccr5*Δ32, CCR2-6AI, SDF1-3'A (mutação na região 3' não traduzida do gene SDF1 – fator derivado do estroma) e alelos HLA (antígenos leucocitário humano) podem prever o estado não progressor por um longo tempo (LTNP) em indivíduos infectados pelo HIV-1. Os LTNP representam menos de 5% dos indivíduos infectados. A deleção foi significativamente alta entre os LTNP. Os alelos HLA predominantes nos LTNP foram HLA-A3, -B14, -B17, -B27, -DR6 e -DR7 (Magierowska *et al.*, 1999).

Os alelos *ccr5*Δ32, CCR2b 64I, SDF1 3'A e o polimorfismo na posição 59029 do promotor *ccr5* podem influenciar na progressão da AIDS. Além disso, o *ccr5*Δ32 e CCR2b 64I têm sido associados com várias outras doenças, tais como artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença inflamatória do intestino, diabetes insulino-dependente e arteriosclerose.. Kristiansen *et al.* (2001) desenvolveram uma análise múltipla desses polimorfismos, com a finalidade de fornecer um ensaio em larga escala para os quatro polimorfismos.

Rugeles *et al.* (2002) determinaram uma frequência de 4% do alelo mutante em indivíduos soronegativos expostos ao HIV-1 e 4,2% em soropositivos na Colômbia. O genótipo homozigoto para a deleção foi encontrado somente nos soronegativos. Não houve diferenças significativas entre as frequências genótípicas e alélicas nos dois grupos. A comparação entre as frequências genótípicas observadas e as esperadas mostraram que elas foram significativamente diferentes para o grupo soronegativo.

Sheppard *et al.* (2002) estudaram indivíduos com o genótipo *ccr5*Δ32/*ccr5*Δ32 que se infectaram com o vírus HIV-1 SI. Neste estudo ficou claro que a deleção está associada a uma proteção incompleta quanto a estes vírus.

3.4.2. OUTRAS VARIANTES DO GENE *ccr5*

Carrington et al. (1997) identificaram 16 mutações na região que codifica o CCR5. Dessas mutações, 5 foram detectadas exclusivamente entre negros americanos e 8 foram observadas somente em Caucasianos (Tabela 2).

Tabela 2. Variantes do gene *ccr5* e suas freqüências

Variantes	Substituição de ácido nucléico	Nº de alelos observados/ Total de Nº de cromossomos	
		Caucasianos	Negros Americanos
I12L	A25C	1/382 (0.003)	0/664 (0.000)
C20S	T58A	2/698 (0.003)	0/664 (0.000)
A29S	G85T	-	1/64 (0.015)
I42F	A124T	1/170 (0.001)	-
L55Q	T164A	29/708 (0.041)	5/664 (0.007)
R60S	G180T	-	1/76 (0.013)
A73V	C218T	3/462 (0.002)	0/664 (0.000)
S75S	T215C	0/212 (0.000)	9/664 (0.013)
C101X	T303A	-	1/70 (0.014)
I164I	C492A	1/98 (0.010)	-
Δ32(185)	Δ32	520/5210 (0.100)	38/2030 (0.019)
R223Q	G668A	1/64 (0.016)	-
228delK	680del3	1/490 (0.002)	0/494 (0.000)
V300V	C900A	1/242 (0.000)	0/100 (0.000)
G301V	G902T	1/90 (0.011)	0/268 (0.000)
A335V	C1004T	1/174 (0.006)	12/484 (0.025)
Y339F	A1016T	0/242 (0.000)	3/116 (0.026)

Carrington et al. (1997)

Variantes como *C20S*, *I42F*, *C101X* associadas com a variante $\Delta 32$, foram identificadas em indivíduos soronegativos para o HIV-1, apesar de altamente expostos ao vírus (Carrington et al., 1997).

Outras variantes na região promotora também estão relacionadas com uma variabilidade na progressão da AIDS entre indivíduos infectados pelo HIV-1 (Martin et al., 1998; Mummidi et al., 1998; McDermott et al., 1998). Por exemplo, a substituição de citosina por timina, na posição -1835 foi identificada em indivíduos

infectados pelo HIV-1 que possuem uma progressão lenta da AIDS (Mummidi et al., 1998).

3.5. ORIGEM DA DELEÇÃO DE 32 PARES DE BASES

Libert *et al.* (1998) investigaram o alelo *ccr5*Δ32 em 18 populações européias. A população de maior frequência foi a da Finlândia (16%) e a de menor foi a da Sardenha (4%). Microssatélites altamente polimórficos (IRI3.1 ou D3S4579 e IRI3.2 ou D3S4580) localizados respectivamente 11kb a montante e 68kb a jusante do gene *ccr5* foram usados para determinar o haplótipo do cromossomo carregador da mutação. Um forte desequilíbrio de ligação foi encontrado entre *ccr5*Δ32 e o alelo específico dos microssatélites IRI3.1 e IRI3.2: mais de 95% dos cromossomos carregando o alelo *ccr5*Δ32 possuíam o alelo IRI3.1-0, enquanto que 88% possuíam o alelo IRI3.2-0. Esses alelos foram encontrados, respectivamente, em somente 2 e 1,5% dos cromossomos que carregavam o alelo selvagem (*ccr5*). A partir desses dados, concluiu-se que muitos e não todos os alelos *ccr5*Δ32 originaram-se de uma mutação simples e que este evento provavelmente teve origem recente (~1000 anos atrás) no Nordeste Europeu.

Stephens *et al.* (1998) estimou que o alelo *ccr5*Δ32 tenha surgido aproximadamente há 700 anos atrás. O surgimento e o rápido aumento na frequência desta mutação em populações caucasianas, estão de acordo com a história de fortes eventos seletivos (uma epidemia de um patógeno que como o HIV-1 utiliza o CCR5). A *Yersinia pestis* é um forte candidato, pois a epidemia ocorreu há 650 anos atrás na Europa (entre 1346 a 1352) e seu mecanismo para induzir apoptose em macrófagos envolve o CCR5. Outros possíveis candidatos são a *Shigella*, *Salmonella* e *Mycobacterium tuberculosis* por terem também como alvo os macrófagos. Doenças infecciosas com a sífilis, varíola e influenza também são candidatas. Estas doenças dizimaram milhões de indivíduos durante o milênio passado.

3.6. DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DO ALELO *ccr5*Δ32

O alelo *Δccr5* possui uma frequência de 0,092 em populações caucasianas, mas está ausente em populações negras da Europa Ocidental, África Central e em populações Japonesas. (Samson *et al.*, 1996c). 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, como mostra a figura 2. (O'Brien e Dean, 1997)

A distribuição global do alelo *ccr5*Δ32 publicada por Martinson *et al.*(1997) mostrou que o alelo mutante não está confinado a pessoas descendentes de europeus, mas é encontrado por toda a Europa, Oriente Médio e Ásia. Ocorrências isoladas podem ser observadas em todo o mundo (tabela 3).

Husain *et al.* (1998) foram os primeiros a relatar a mutação na Índia. Eles estudaram 100 indivíduos normais e identificaram um indivíduo heterozigoto para a deleção.

Yudin *et al.* (1998) analisaram 531 indivíduos representando Sibéria Ocidental e Oriental, Ásia Central e partes mais orientais da Rússia. Uma frequência alta da mutação (11,1%) foi identificada na Sibéria Ocidental e uma frequência baixa (0,5 a 4,8%) foi observado nas populações da Ásia Central, Sibéria Oriental, partes mais orientais da Rússia e Canadá. Os autores concluíram que a distribuição da deleção tende a diminuir quanto mais longe estiver da Europa.

Szalai *et al.* (1998) analisaram 108 recém-nascidos na Hungria, encontrando 21 heterozigotos e 2 homozigotos para a deleção, com uma frequência do alelo mutante de 0,116.

Passos *et al.* (1998) estudaram a frequência do alelo *ccr5*Δ32 em 100 indivíduos da população urbana do sudeste brasileiro e em 98 índios brasileiros. Foi observado uma frequência do alelo mutante de 0,035 na população urbana e sua ausência nos índios brasileiros estudados. A frequência do *ccr5*Δ32 encontrada na população urbana pode ser explicada pela colonização européia.

Tabela 3. Distribuição global do Δ ccr5

População	Nº estudado	Genótipo			% Δ ccr5
		ccr5/ccr5	ccr5/ Δ ccr5	Δ ccr5/ Δ ccr5	
Europa					
Ashkenazi	43	26	16	1	20.93
Islândia	102	75	24	3	14.71
Grã-Bretanha	282	223	57	3	11.13
Espanha-Basque	29	24	5	0	8.62
Espanha-Catalunia	49	41	8	0	8.16
Itália	91	81	10	0	5.49
Irlanda	44	40	4	0	4.55
Chipre	84	77	7	0	4.17
Grécia	63	60	3	0	2.38
Oriente Médio					
Caucasus:Daguestão	110	96	14	0	6.36
Arábia Saudita	241	231	10	0	2.07
Yemen	34	34	0	0	-
Asia					
Rússia:Udmurtia	46	38	7	1	9.78
Gujarat	32	30	1	1	4.69
Paquistão	34	32	2	0	2.94
Sindh	29	28	1	0	1.72
Punjab	34	33	1	0	1.47
Bengal	25	25	0	0	-
Hong Kong	50	50	0	0	-
Taiwan	83	83	0	0	-
Filipinas: Filipino	26	26	0	0	-
Filipinas: Negros	30	30	0	0	-
Mongolia	59	59	0	0	-
Sri Lanka	37	37	0	0	-
Burma	67	67	0	0	-
Tailândia	101	100	1	0	0.50
Borneo	151	151	0	0	-
Sumatra	72	72	0	0	-
Andaman Islands	24	24	0	0	-
África					
Nigéria	111	110	1	0	0.45
Gâmbia	56	56	0	0	-
República Africana Central	52	52	0	0	-
Kenya	80	80	0	0	-
Ivory Coast	87	87	0	0	-
Malawi	80	80	0	0	-
Zâmbia	96	96	0	0	-
Kalahari San	36	36	0	0	-
Oceania					
Nova Guiné	96	96	0	0	-
Polinésia Francesa	94	94	0	0	-
Aborígenes Australianos	98	96	2	0	1.02
Guam	59	58	1	0	0.85
Fiji	17	17	0	0	-
Américas					
Nuu-Chah-Nulth	38	37	1	0	1.32
México (Huicholes)	52	52	0	0	-
Brasil (índios)	98	98	0	0	-
Jamaica	119	119	0	0	-
Primatas					
Chimpanzé	66	66	0	0	-
Total	3.408				

Martinson et al.(1997)

A população do Estado de Pernambuco (Brasil), ainda não havia sido estudada para esta deleção até o presente, daí a importância deste trabalho, pois a revelação das frequências do alelo mutante (*ccr5Δ32*) nesta população e nos indivíduos infectados pelo HIV-1 fornecerá informações sobre a origem desta população e poderá sugerir novas abordagens para o diagnóstico, prognóstico e tratamento da AIDS.

3.7. POSSÍVEL EXISTÊNCIA DE SELEÇÃO A FAVOR DO ALELO *ccr5Δ32*

A alta frequência do alelo *ccr5Δ32* nas populações europeias, iniciada por um evento simples, a mutação, poderia em teoria ser resultado de uma tendência genética ao acaso, na ausência de seleção natural contra ou a favor da mutação. Contudo, dada a origem relativamente recente da mutação e o tamanho da população europeia, é improvável que tenha sido somente um rápido aumento aleatório na frequência do alelo *ccr5Δ32*. Um possível mecanismo de seleção é portanto postulado. Neste caso, a seleção atuaria primariamente em heterozigotos sendo mais provável que dirija esta nova mutação a um valor médio de sua frequência alélica de 10% em cem gerações ou menos. Esta seleção pode estar associada com a resistência a doenças infecciosas ou suas conseqüências, de acordo com o envolvimento do CCR5 no recrutamento de monócitos, macrófagos e células T. A natureza precisa desse fator seletivo, contudo, permanece em discussão (Libert *et al.*, 1998).

3.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. and Berger, E.A.** (1996) CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science*, 272: 1955-1958.
- Alvarez, V., López-Larrea, C. and 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: 483-486.
- Buseyne, F., Janvier, G., Teglas, J.P., Ivanoff, S., Burgard, M., Bui, E., Mayaux, M.-J, Blanche, S., Rouzioux, C. and Rivière, Y.** (1998) Impact of heterozygosity for the chemokine receptor CCR5 32-bp-deleted allele on plasma virus load and CD4 T lymphocytes in perinatally human immunodeficiency virus-infected children at 8 years of age. *The journal of infectious diseases*, 178: 1019-23.
- Carrington, M., Kissner, T., Gerrard, B., Ivanov, S., O'Brien, S.J. and Dean, M.** (1997) Novel alleles of the chemokine receptor gene CCR5. *Am. J. Hum. Genet.*, 61: 1261-1267.
- Carrington, M., Dean, M., Martin, M.P. and O'Brien, S.J.** (1999) Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and consequences. *Human Molecular Genetics*. 10: 1939-1945.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J.** (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, 85: 1135-1148.
- Combadiere, C., Ahuja, S.K., Tiffany, H.L. and Murphy, P.M.** (1996) Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine

- receptor selective for MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES. *Journal of Leukocyte Biology*. 60: 147-152.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M.W., Allikmets, R., O'Brien, S.J.** (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science*, 273: 1856-1862.
- Dean, M., Jacobson, L.P., McFarlane, G., Margolick, J.B., Jenkins, F.J., Howard, O.M.Z., Dong, H.-F., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Gomperts, E., Vlahov, D., Oppenheim, J.J., O'Brien, S.J. and Carrington, M.** (1999) Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5- Δ 32 mutation. *Cancer Res.*, 59: 3561-3564.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. and Landau, N.R.** (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381: 661-666.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G. and Doms, R.W.** (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 85: 1149-1158.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y.X. and Nagashima, K.A.** (1996) HIV-1 entry into CD4 (+) cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381: 667-673.
- Ewald, P.W.** (1999) Evolution of infections disease, 119-180.
- Feng, T.C.C., Broder, P.E., Kennedy and Berger, E.A.** (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G-protein coupled receptor. *Science*, 272:277.
- Gregg, T.G. and Mettler, L.E.** (1969) Population Genetics and Evolution. Prentice-Hall, 72-76.

- Guinard, F., Combadiere, C., Tiffany, H.L. and Murphy, P.M.** (1998) Gene organization and promotor function for CC chemokine receptor 5 (CCR5). *The Journal of Immunology*, 160: 985-992.
- Hasegawa, H. and Fujita, S.** (2001) Chemokines and lymphocytes: The role of chemokines and their receptors in the immune system. *Cellular and Molecular Biology*, 47: 599-607.
- He, J., Chen, Y., Farzan, M., Choe, H., Ohagen, A., Gartner, S., Busciglio, J., Yang, X., Hofmann, W., Newman, W., Mackay, C.R., Sodroski, J. and Gabuzda, D.** (1997) CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature*. 385: 645-649.
- Hunsai, S., Goila, R., Shahi, A. and Banerjea, A.C.** (1998) First report of a healthy indian heterozygous for $\Delta 32$ mutant of HIV-1 co-receptor-CCR5 gene. *Gene*, 207: 141-147.
- Kristiansen, T.B., Knudsen, T.B., Ohlendorff, S. and Eugen-Olsen, J.** (2001) A new multiplex PCR strategy for the simultaneous determination of four genetic polymorphisms affecting HIV-1 disease progression. *Journal of Immunological Methods*, 252: 147-151.
- 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., Kucinskias, V., Lavinha, J., Mercier, B., Ogur, G., Peltonen, L., Rosatelli, C., Schwartz, M., Spintsyn, V., Timar, L., Beckman, L., Parmentier, M. and Vassart, G.** (1998) The $\Delta accr5$ mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Human Molecular Genetics*, 7: 399-406.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A. and 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.

- Magierowska, M., Theodorou, I., Debre, P., Sanson, F., Autran, B., Riviere, Y, Charron, D. and Costagliola, D.** (1999) Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1 and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood*, *93*: 936-41.
- Majumder, P.P. and Dey, B.** (2001) Absence of the HIV-1 protective del-ccr5 allele in most ethnic populations of India. *Europ. J. Hum. Genet.*, *9*: 794-796.
- Martin, M.P., Dean, M., Smith, M.W., Winkler, C.A., Gerrard, B., Michael, N., Margolick, J., Buchbinder, S., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Hilgartner, M.W., Hoots, K., Vlahov, D., O'Brien, S.J. and Carrington, M** (1998) Genetic acceleration of a AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science*, *282*: 1907-1911.
- Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.T., Clegg, J.B.** (1997) Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature Genet.*, *16*: 100-103.
- McDermott, D.H., Zimmerman, P.A., Guignard, F., Kleeberger, C.A., Leitman, S.F. and Murphy, P.M.** (1998) CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet*, *352*: 866-870.
- McNicholl, J., Smith, D.K., Qari, S.H. and Hodge, T.** (1997) Host genes and HIV: The role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele (Δ 32 CCR5). *Perspectives*, *3*: 261-271.
- Morris, L., Cilliers, T., Bredell, H., Phoswa, M. and Martin, D.J.** (2001) CCR5 is the major coreceptor used by HIV-1 subtype C isolates from patients with active tuberculosis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, *17*: 697-701.
- Mourichi, H., Mourichi, M. and Fauci, A.S.** (1997) Cloning and analysis of the promoter region of CCR5, a coreceptor for HIV-1 entry. *Journal Immunol.*, *159*: 5441-5449.
- Mummidi, S., Ahuja, S.S., McDaniel, B.L. and Ahuja, S.K.** (1997) The human

- CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J. Biol. Chem.*, 272: 30662-30671.
- Mummidi, S., Ahuja, S.S., Gonzalez, E., Anderson, S.A., Santiago, E.N., Stephan, K.T., Craig, F.E., O'Connell, P., Tyron, V., Clark, R.A., Dolan, M.J. and Ahuja, S.J.** (1998) Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nature Med.*, 4: 786-793.
- Murphy, P.M.** (1996) Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Rev.*, 7: 47-64.
- Nicholson, F.K., Browning, S.W., Hengel RL., Lew, E., Gallagher, L.E., Rimland D. and McDougal, J.S.** (2001) CCR5 and CXCR4 expression on memory and naive T cells in HIV-1 infection and response to highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir Immune Defic. Syndr.*, 27: 105-15.
- O'Brien, S.J. and Dean, M.** (1997) Genes que oponen resistencia al sida. *Investigación y ciencia*, 6-14.
- Passos, G.A.S., and Picanço, V.P.** (1998) Frequency of the Δ CCR5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immunology Letters*, 61: 205-207.
- Pereira, R.W., Pires, E.R., Duarte, A.P.M., de Moura, R.P., Monteiro, E., Torloni, H., Proietti, A.B., Simpson, A.J.G. and Pena, D.J.** (2000) Frequency of the CCR5 Δ 32 allele in Brazilians: a study in colorectal cancer and in HTLV-I infection. *Genetics and Molecular Biology*, 23(3): 523-526.
- Premak, B.A. and Schall, T.J.** (1996) Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nature Med*, 2: 1174-1178.
- Rabkin, C.S., Yang, Q., Goedert, J.J., Nguyen, G., Mitsuya, H. and Sei, S.** (1999) Chemokine and chemokine receptor gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood*, 93: 1838-1842.

- Rapport, C.J., Gosling, J., Schweickart, V.L., Gray, P.W. and Charo, I.F.** (1996) Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α . *J. Biol. Chem.*, 271: 17161-17166.
- Rowland-jones, S.L. and McMichael, A.** (1995) Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Curr Opin Immunol*, 7: 448-455.
- Rugeles, M.T., Solano, F., Diaz, F.J., Bedoya V.I. and Patino, P.J.** (2002) Molecular characterization of the CCR5 gene in seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus (HIV). *J Clin Virol*, 23: 161-169.
- Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G. and Parmentier, M.** (1996a) Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry*, 35: 3362-3367.
- Samson, M., Soularue, P., Vassart, G. and Parmentier, M.** (1996b) The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p.24 regions of chromosome 3. *Genomics*, 36: 522-526.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumèroulie, C., Cougnaux, J., Forceille, C., Muydermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G. and Parmentier, M.** (1996c) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 382: 722-725.
- Schinkel, J., Langendam, M.W., Coutinho, R.A., Krol, A., Brouwer, M. and Schuitemaker, H.** (1999) No evidence for an effect of the CCR5 Δ 32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users. *The Journal of Infectious Diseases*, 179: 825-31.

- Sheppard, H.W., Celum, C., Michael, N.L., O'Brien, S., Dean, M., Carrington, M., Dondero, D. and Buchbinder, S.P.** (2002) HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 29:307-313.
- 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., Tzetis, M., Oeddoux, C., di Giovine, F.S., Nasioulas, G., Chandler, D., Assev, M., Hanson, M., Kalaydjieva, L., Glavac, D., Gasparini, P., Kanavakis, E., Claustres, M., Kambouris, M., Ostrer, H., Duff, G., Baranov, V., Sibul, H., Goldman, D., Martin, N., Duffy, D., Schmidtke, J., Estivill, X., O'Brien, S.J. and 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.
- Szalai, C., Czinner, A., Császár, A., Szabó, T. and Falus, A.** (1998) Frequency of the HIV-1 resistance CCR5 deletion allele in Hungarian newborns. 782
- Visco-Comandini, U., Hultgren, C., Broström, C., Birk, M., Kim, S. and Sällberg, M.** (1998) Human Immunodeficiency virus type 1 disease progression, CCR5 genotype, and specific immune responses. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5: 463-466.
- Wilkinson, D.A., Operskalski, E.A., Busch, M.P., Mosley, J.W. and Koup, R.A.** (1998) A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness. *The journal of infectious diseases*, 178: 1163-6.
- Williams, G.C. and Nesse, R.M.** (1999) Why we get sick. The new science of Darwiniana medicine, 3-25.

- Yang, J-Y., Togni, M., Widmer, U.** (1999) Heterozygous defect in HIV-1 coreceptor CCR5 and Chemokine production. *Cytokine, 11*:1-7.
- Yudin, N.S., Vinogradov, S.V., Potapova, T.A., Naykova, T.M., Sitnikova, V.V., Kulikov, I.V., Khasnulin, V.I., Konchuk, C., Vloschinskii, P.E., Ivanov, S.V., Kobzev, V.F., Romaschenko, A.G. and Voevoda, M.I.** (1998) Distribution of CCR5-delta 32 gene deletion across the Russian part of Eurasia. *Hum Genet, 102*: 695-698.
- Zamarchi, R., Indraco, S., Minuzzo, S., Coppola, V., Gringeri, A., Santagostino, E., Vicenzi, E., De Silvestro, G., Blagiotti, R., Baldassarre, C., Chieco-Bianchi, L. and Amadori, A.** (1999) Frequency of a mutated CCR-5 allele (delta32) among Italian healthy donors and individuals at risk of parenteral HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses, 15*: 337-44.

4. ARTIGO

Manuscrito a ser encaminhado à Revista **Genetics and Molecular Biology**

DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DE $\Delta ccr5$ E COMPARAÇÃO COM A DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS ENCONTRADAS EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1 NA POPULAÇÃO DE PERNAMBUCO

Ana Karolina Vanderlei Macêdo, MSc; Edileine Dellalibera, MSc; Michele Havro, MSc; Eryca Maciel, MSc; Frederico Rangel Araújo; Maria Izabel Guimarães; Rosilda dos Santos Silva, PhD e Luiz Maurício da Silva, PhD.

**Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil**

Endereço para correspondência:

Dr Luiz Maurício da Silva

mauricio@ufpe.com.br

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Av Prof. Moraes Rego S/N Cidade Universitária,

CEP:50732-970, Recife, PE, Brasil

Telefone/fax: (81) 3271 8512

RESUMO

Foram analisados um total de 511 indivíduos da População do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, para a mutação *ccr5*Δ32 pela técnica de PCR, sendo 260 indivíduos HIV-1 soropositivos e 251 da população controle. A frequência do alelo mutante foi de 0,0423 para os indivíduos soropositivos e 0,0418 para os indivíduos controle. Os indivíduos homozigotos para a mutação foram encontrados em 1,2% (3/251) dos indivíduos controle, mas não foi encontrado nos indivíduos soropositivos. Os indivíduos heterozigotos foram encontrados em 8,5% (22/260) dos indivíduos soropositivos e 6% (15/251) dos indivíduos controle. A diferença nas frequências genóticas e alélicas entre os grupos não foi significativa, mas a comparação entre o observado e o esperado das frequências genóticas demonstraram uma diferença significativa no grupo dos indivíduos controle, sugerindo uma seleção a favor dos homozigotos para o alelo mutante.

Palavras-chave: *ccr5*, AIDS, *ccr5*Δ32.

INTRODUÇÃO

O receptor quimiocina 5 (CCR5) pertence a uma família de receptores acoplados a proteínas G que cruzam a membrana celular 7 vezes, estando envolvido na quimiotaxia dos leucócitos para as áreas de inflamação em resposta a ligação com as CC-quimiocinas - MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (Samson *et al.*, 1996a; Combadiere *et al.*, 1996). O gene que codifica o CCR5 está localizado na região p21.3 do cromossomo 3 humano, próximo aos outros genes de receptores CC-quimiocinas (Samson *et al.*, 1996b; Rapport *et al.*, 1996).

A proteína CCR5, juntamente com o CD4, permite a entrada do HIV-1 em macrófagos e monócitos, mostrando ser o principal co-receptor para o vírus HIV-1 M-trópico (Dragic *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996 e Samson *et al.*, 1996a). Ao contrário do vírus HIV-1 T-trópico, o qual geralmente aparece na fase mais tardia da doença, o M-trópico tem sido responsável pela transmissão viral e início da infecção (Wolinsky *et al.*, 1996).

A deleção de 32bp neste gene (*ccr5* Δ 32) confere resistência a infecção pelo HIV-1 em indivíduos homocigotos para a deleção, porque resulta em uma proteína traduzida truncada que conseqüentemente não é integrada na membrana celular (Liu *et al.*, 1996). Heterocigotos para o alelo *ccr5* Δ 32 demonstram uma progressão mais lenta nos estágios clínicos da AIDS (Huang *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 1996 and Michael *et al.*, 1997).

O alelo *ccr5* Δ 32 está presente em populações Européias e Norte Americanas, com uma freqüência de heterocigotos variando de 10 a 20% em Caucasianos (Liu *et al.*, 1996; Martinson *et al.*, 1997; Dean *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996 and Samson *et al.*, 1996c). Além de estar presente por toda a Europa, este alelo mutante também é encontrado no Oriente Médio e Ásia com freqüência de 2 a 5%. Ocorrências isoladas podem ser observadas em todo o mundo. Uma freqüência muito baixa foi observada em africanos, japoneses e nativos americanos (Martinson *et al.*, 1997). No Sudeste Brasileiro a freqüência do alelo mutante foi de 3,5% (Passos Jr, and

Picanço, 1998). No presente trabalho, determinamos a frequência do alelo *cer5A32* numa amostra da população do Estado de Pernambuco, localizado no Nordeste Brasileiro, e em indivíduos HIV-1 soropositivos desta região.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra consiste de 511 indivíduos não relacionados da população do Estado de Pernambuco (PE), sendo 251 indivíduos controle e 260 indivíduos HIV soropositivos do Hospital Correia Picanço, Recife (PE). De todos os indivíduos foram coletados 5ml de sangue venoso utilizando ACD (ácido cítrico 0,038M; citrato de sódio tribásico 0,075M; dextrose 0,133M) como anticoagulante.

O DNA foi extraído pelo método mini *salting-out* e digestão com proteinase K (Miller *et al.*, 1988). Foram utilizados os *primers* descritos por Martinson *et al.* (1997) para a amplificação da região da deleção.

O DNA genômico (50-100 ng) de cada indivíduo foi amplificado para um volume total de 23 µl contendo tampão 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 1 U Taq polymerase and 25 pmol de cada *primer*.

A PCR foi efetuada em um termociclador Perkin-Elmer 2400, ciclagem: 94° C por 5 minutos, 1 ciclo; 94° C por 30 segundos e 70° C por 30 segundos, 30 ciclos. Com um acréscimo de 1 segundo na temperatura de extensão para cada ciclo.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante 7%, no sequenciador SQ3 Sequencer-Pharmacia por uma hora com 2000 volts. Após a corrida eletroforética o gel foi corado com nitrato de prata. O alelo normal, com 193 pb e o mutante com 161 pb foram identificados por comparação com marcador de peso molecular (Figura 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 251 indivíduos controle estudados, 233 não apresentaram a deleção, 15 foram heterozigotos e 3 foram homozigotos para a deleção, o alelo mutante apresentando freqüência 0,0418 (Tabela 1). Após a aplicação do Teste Exato de Fisher pôde-se deduzir que a distribuição genotípica observada para o loco analisado encontra-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,0059$).

A presença do alelo *ccr5*Δ32 pode ser explicada pela história da colonização ocorrida nesta região do Brasil. A freqüência de 0,0418 deste alelo em nossa população é inferior à freqüência média observada na Europa (0,10) o que pode ser atribuído à contribuição de africanos e ameríndios. O desequilíbrio de Hardy-Weinberg em Pernambuco sugere uma seleção a favor do homozigoto *ccr5*Δ32/*ccr5*Δ32, já que o número de homozigotos *ccr5*Δ32/*ccr5*Δ32 observado foi significativamente maior que o esperado.

Dos 260 indivíduos infectados, 22 foram heterozigotos para deleção, o alelo mutante apresentando freqüência de 0,042. Não foi identificado nenhum homozigoto para a deleção, resultado que reforça a idéia de que a homozigose para a deleção confere resistência à infecção pelo HIV-1, como descrita na literatura. Na amostra dos indivíduos soropositivos, os heterozigotos já desenvolveram os sintomas da AIDS e possuem uma média de quatro anos de tratamento com terapias antiretrovirais, possuem carga viral baixa e contagem de linfócitos T CD4 abaixo do normal, semelhante aos indivíduos soropositivos da amostra que não possuem a deleção.

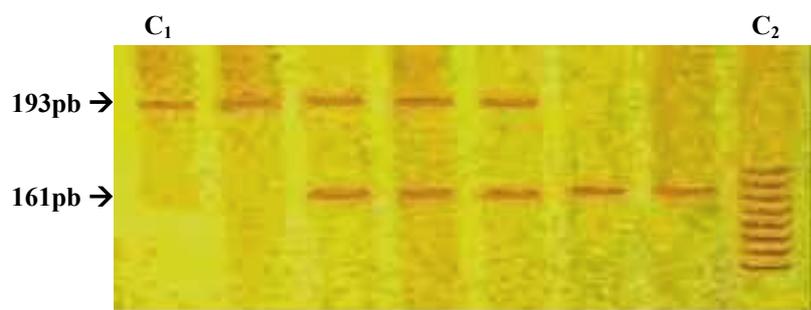


Figura 1 - Gel de poliacrilamida 7% com o alelo *ccr5* (193pb), o alelo Δ *ccr5* (161pb), os controles - C₁ (193pb) e C₂ (167pb, 163pb, 159pb, 155pb, 151pb, 147pb, 143pb e 139pb)

Tabela. 1 Distribuição das frequências alélicas e genótípicas considerando os alelos *ccr5* e *ccr5* Δ 32 na população Pernambucana (indivíduos controle e indivíduos soropositivos).

	Indivíduos Controle		Indivíduos Soropositivos	
Frequências alélicas				
<i>ccr5</i>	0,9582		0,9577	
<i>ccr5</i> Δ 32	0,0418		0,0423	
Genótipos	Observado	Esperado	Observado	Esperado
<i>ccr5/ ccr5</i>	233(92,8%)	230,44	238 (91,5%)	238,47
<i>ccr5/ ccr5</i> Δ 32	15 (6,0%)	20,12	22 (8,5%)	21,07
<i>ccr5</i> Δ 32/ <i>ccr5</i> Δ 32	3 (1,2%)	0,44	0	0,47
χ^2	16,26		0,50	
Total	251		260	

REFERÊNCIAS

- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. and Berger, E.A. (1996) CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science*, 272: 1955-1958.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, 85: 1135-1148.
- Combadiere, C., Ahuja, S.K., Tiffany, H.L. and Murphy, P.M. (1996) Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES. *Journal of Leukocyte Biology*. 60: 147-152.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M.W., Allikmets, R., O'Brien, S.J. (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science*, 273: 1856-1862.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. and Landau, N.R. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381: 661-666.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G. and Doms, R.W. (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 85: 1149-1158.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y.X. and Nagashima, K.A. (1996) HIV-1 entry into CD4 (+) cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381: 667-673.

- 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. and Koup, R.A. (1996) The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.*, 2:1240-1243.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A. and 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.
- Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.T., Clegg, J.B. (1997) Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature Genet.*, 16: 100-103.
- Michael, N.L., Chang, G., Louie, L.G., Mascola, J.R., Dondero, D., Birx, D.L. and Sheppard, H.W. (1997) The role of viral phenotype and CCR5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Med.*, 3: 338-340.
- Miller, A.S., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988) A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA for Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res.*, 16: 1215.
- Passos, G.A.S., and Picanço, V.P. (1998) Frequency of the Δ CCR5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immunology Letters*, 61: 205-207.
- Rapport, C.J., Gosling, J., Schweickart, V.L., Gray, P.W. and Charo, I.F. (1996) Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α . *J. Biol. Chem.*, 271: 17161-17166.
- Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G. and Parmentier, M. (1996a) Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry*, 35: 3362-3367.
- Samson, M., Soularue, P., Vassart, G. and Parmentier, M. (1996b) The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5

(CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p.24 regions of chromosome 3. *Genomics*, 36: 522-526.

- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumèroulie, C., Cougnaud, J., Forceille, C., Muydermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G. and Parmentier, M. (1996c) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 382: 722-725.
- Wolinsky, S.M., Korber, B.T., Neumann, A.U., Daniels, M., Kunstman, K.J., Whetsell, A.J., Furtado, M.R., Cao, Y., Ho, D.D. and Safrin, J.T. (1996) Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science*, 272: 537-542.

5. ABSTRACT

Of a total of 511 individuals from the population of the States of the Pernambuco, Northeast of Brasil, analysed for Delta32 mutation by the PCR technique, 260 scored HIV seropositive and 251 control population. The frequency of the mutant allele Delta32 was 0,0423 for seropositive individuals and 0,0418 for control individuals. The homozygous mutant genotype was found in only 1,2% (3/251) of control individuals, but in no seropositive individuals. The heterozygous genotype was found in 8,5% (22/260) of seropositive individuals and in 6% (15/251) of control individuals. The differences in the allelic and genotypic frequencies among the groups were not statistically significant. A comparison between the observed and the expected genotypic frequencies showed that they were significantly different for the control individuals group, suggesting a protective, yet indirect effect of the mutant genotype.