

INFLUÊNCIA DOS MARCADORES CCR2 E CCR5 NA PROGRESSÃO CLÍNICA EM INDIVÍDUOS SOROPOSITIVOS PARA O HIV

Evandra Santos Pontes¹; Valdir de Queiroz Balbino²

¹Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: evandra.biomed.ufpe@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de genética – CCB – UFPE. E-mail: vqbalbino@gmail.com

Sumário Acredita-se que em função da intensa miscigenação étnica ocorrida na formação da população brasileira seja possível a detecção dos polimorfismos CCR5 Δ 32 e CCR2+64 através das análises dos marcadores genéticos. Uma deleção de 32 pares de bases no gene CCR5 em estado de homozigose provoca uma falha no processo de penetração viral conferindo proteção contra a entrada do vírus na célula e quando em heterozigose o retardo nos processos patológicos associados à imunodeficiência. Assim, essa pesquisa objetiva detectar a frequência de ocorrência da deleção de 32 pares de bases no gene CCR5 em 200 indivíduos soropositivos para o HIV acompanhados no Hospital das Clínicas de Pernambuco. Foram coletados 5ml de sangue venoso e posterior extração de DNA por mini salting out. A PCR foi desenvolvida a partir de um programa de amplificação e primers específicos seguido de eletroforese em agarose. Nesta pesquisa as frequências genotípicas encontradas acompanham outros resultados obtidos na região com 95% dos pacientes apresentando o alelo selvagem, outros 10 indivíduos são heterozigotos, representando uma frequência de 5% e não foram identificados homozigotos para a deleção com a população estando em equilíbrio de Hardy Weinberg. Assim, os valores encontrados podem estar associados a colonização europeia em muitas cidades brasileiras.

Palavras chave: CCR5 Δ 32; DNA; genética; HIV; frequência.

INTRODUÇÃO

O HIV (vírus da imunodeficiência humana) é um retrovírus constituído de duas fitas simples de RNA (PINTO, 2006 ; NAZARI e JOSHI, 2008). Seus principais alvos são os linfócitos T CD4, responsáveis pela estruturação das reações imunes. A depleção funcional dessas células leva a desorganização e inibição da resposta imunitária tornando o portador vulnerável a infecções por incontáveis microrganismos. As quimiocinas atuam na ativação e regulação do sistema imune inato e adaptativo modulando a suscetibilidade a certas infecções virais crônicas e tendo sua expressão alterada pelas mesmas (BRAVO et al, 2013; WILKIN et al, 2007; BAUMANN, 2015). No gene CCR5, uma deleção de 32 pares de bases está associada à resistência à entrada do HIV na célula, provocada pela diminuição na expressão de correceptores na superfície celular. Além disso, existe uma mutação na região V64I em CCR2 que leva a um retardo no curso clínico da aids e a defesa contra a infecção pelo hiv-1. Mutações em genes têm sido relatadas como características que interferem na susceptibilidade à infecção pelo HIV e na progressão para a AIDS (AZEVEDO e SANTOS, 2008). Assim, a identificação de padrões genéticos que possam estar relacionados à progressão

do HIV/aids é fundamental para a compreensão da imunopatogênese da infecção do HIV, servindo de base para o desenvolvimento de medidas profiláticas e imunoterapias.

OBJETIVOS

Avaliar associações entre polimorfismos genéticos em genes de susceptibilidade em indivíduos soropositivos para o HIV-1 do Setor de Doenças Infecto-Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas do Recife (HC), Brasil.

METODOLOGIA

Foram convidados a participar do projeto 200 indivíduos soropositivos para HIV, atendidos no Setor de Doenças Infecto-Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas do Recife (HC), pertencentes às diferentes categorias de progressão para AIDS (progressão rápida, progressão crônica e progressão lenta) com cada indivíduo assinando e recebendo uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) sendo em seguida coletados 5 ml sangue venoso. Os critérios de inclusão utilizados foram que os pacientes possuíssem idade entre 18 e 85 anos, com diagnóstico de HIV, podendo ser de ambos os sexos, com ou sem tratamento com a TARV e que aceitaram responder ao questionário assinando no ato o TCLE e participando do projeto. Para a análise do DNA foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubo vacutainer utilizando-se ACD (ácido cítrico 0,0038M; citrato de sódio tribásico 0,075M; dextrose 0,133M) como anticoagulante, em seguida o DNA foi extraído seguindo a técnica de extração por Mini Salting out (MILLER et al., 1988). O DNA foi diluído e quantificado com espectrofotômetro para utilização na genotipagem, a qual foi feita pela técnica de PCR convencional. Os ciclos da PCR para os genes CCR5 e CCR2 foram padronizados no LABBE (Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva) da UFPE, foi realizado da seguinte forma: 1 ciclo com 94°C por 5 minutos; seguido por 35 ciclos, 94°C por 30 segundos, 56 °C de pareamento por 30 segundos, 72°C por 1 minutos, 72°C por 7 minutos, 4 °C infinito. A PCR foi realizada no termociclador “Axygen Maxygene II”, o volume final de 25µl, constituído de: 1 microlito de 50 ng de DNA; 12,5 microlitos MIX (Promega), 9,5 água ultrapura, 1 microlito de cada primer. Ao término da PCR do gene CCR5 e CCR2 foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo, para visualizar se houve amplificação das bandas, sendo o gel submetido à luz ultravioleta. Após visualizar a amplificação dos genes CCR5 foram identificados os homozigotos sem deleções (alelo selvagem wt/wt), os heterozigotos (wt/ Δ 32) e os homozigotos com a deleção de 32 pares de bases (mutantes Δ 32/ Δ 32). Já para o gene CCR2, após visualizar a amplificação, as amostras foram sequenciadas no equipamento ABI 3500 da plataforma multiusuária do Laboratório Central da UFPE.

RESULTADOS

A análise dos prontuários de 110 pacientes evidenciou a predominância de algumas coinfeções como a toxoplasmose que acometeu 45,50% indivíduos, o *citomegalovírus* (CMV) com 42,72%, herpes (26,36%) e 20% tuberculose (Gráfico 1).

Principais coinfeções associadas ao hiv

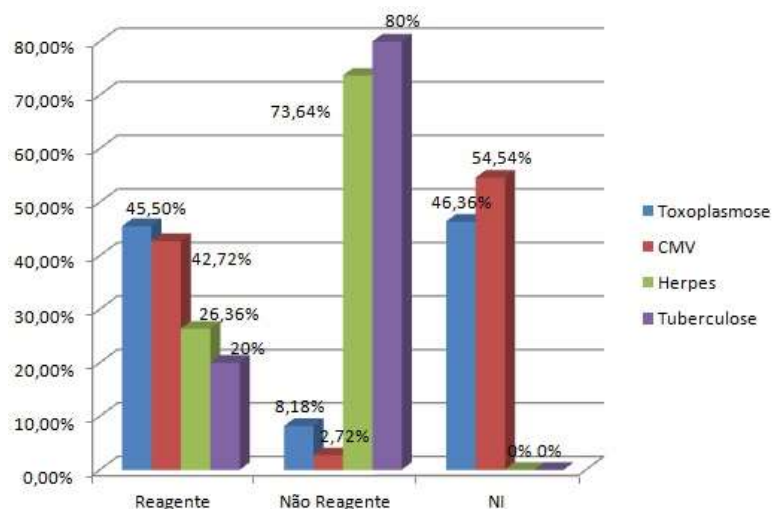


Gráfico 1 Coinfecções mais prevalentes nos indivíduos analisados vivendo com HIV.

Já em relação aos fatores genéticos foram analisados por genotipagem 200 indivíduos para o gene CCR5. Quanto ao gene CCR2 houve otimização e posteriormente o teste em gel de agarose a 3% e 4 amostras foram enviadas para o sequenciamento, contudo em função do tamanho do fragmento gerado pelo primer ser de apenas 162 pares de bases não foi possível a obtenção de sequências capazes de identificar a mutação do tipo substituição.

O resultado da análise do gene CCR5 evidenciou que 5% dos indivíduos são heterozigotos (wt/ Δ 32) para a mutação que corresponde à deleção de 32 pares de bases (193/161) presente em uma frequência de 6,78% nos indivíduos do sexo masculino enquanto no sexo feminino 2,44% demonstraram o alelo variante. Os outros indivíduos genotipados, que representam 95%, foram identificados como alelo selvagem wt/wt (193/193), sem a mutação. Neste estudo não foram visualizados indivíduos homozigotos para a deleção de 32 pares de bases do gene CCR5 Δ 32/ Δ 32(161/161) e a população apresentou-se em equilíbrio de Hardy Weinberg (Gráfico 2).

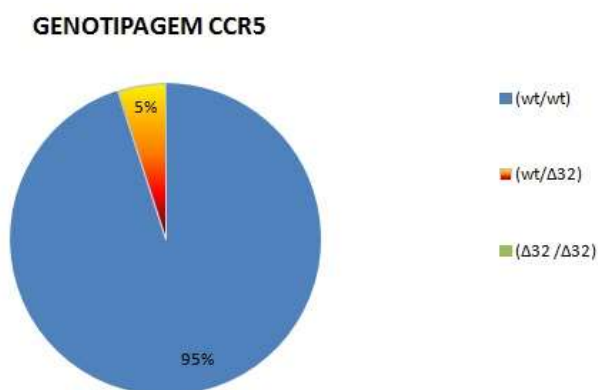


Gráfico 2 Indivíduos genotipados para o gene CCR5

DISCUSSÃO

O *Toxoplasma gondii* possui uma prevalência nos adultos da população em geral de 75% em Recife e nos imunodeficientes de 15,4% no Brasil e se não for obtido um diagnóstico precoce pode levar ao comprometimento do sistema nervoso central em 12 a 47% dos indivíduos imunocomprometidos (COELHO, KOBAYASHI e CARVALHO, 2003). Já o *citomegalovírus* que é um dos agentes oportunistas mais prevalentes em indivíduos que estão na fase avançada da infecção por HIV foi reagente em 43% dos 110 pacientes avaliados em nossa pesquisa. Outra coinfeção é a tuberculose que em Pernambuco, de 2006 a 2010, foi observado o terceiro maior índice de incidência nacional de tuberculose com 47,10 casos novos/100 mil hab corroborando a afirmação do perfil endêmico associado a região (BARBOSA e COSTA, 2012). Também foi muito prevalente o vírus da herpes que está associado ao aumento da viremia de HIV e consequentemente ao desenvolvimento mais rápido da imunodeficiência e estão presentes em 26,4% dos pacientes deste estudo (GELLER et al, 2012;).

As frequências alélicas encontradas em pesquisas no Brasil evidenciaram um padrão norte/sul de aumento dessa mutação de forma que na região sudeste foi observada uma frequência alélica de 4,4% para a deleção de 32 pares de bases do gene CCR5 superior aquelas relacionadas em Recife com 2,41% (SOUZA et al, 2006). Os dados encontrados em Recife são semelhantes a frequência de 2,5% do alelo mutante encontrado nesta pesquisa e podem ser explicadas pela colonização europeia em muitas cidades brasileiras que após cinco séculos de cruzamentos interétnicos influenciou na criação do pool genético brasileiro (SILVA e STUMPF, 2004; VARGAS et al, 2006).

CONCLUSÃO

A análise das coinfeções reforça a caracterização de região endêmica para algumas doenças tropicais cuja patogenicidade depende da desorganização nas atividades de prevenção e diagnóstico desenvolvidas pelo sistema de saúde local.

As frequências alélicas obtidas a partir da genotipagem realizada nos 200 indivíduos componentes deste estudo demonstraram que a mutação em heterozigose apresenta-se com valores semelhantes a outros estudos realizados na região.

AGRADECIMENTOS

Ao programa CNPq/PIBIC pelo financiamento do projeto de pesquisa, à UFPE pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e aos membros do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da UFPE pelo apoio durante a execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, I.R. e COSTA, I.C.C. A emergência da co-infecção tuberculose - hiv no Brasil. *Hygeia* 8 (15):232 - 244, Dez/2012.
- GELLER, M. et al. Herpes Simples: Atualização Clínica, Epidemiológica e Terapêutica. *DST - J bras Doenças Sex Transm* 2012;24(4):260-266 .
- GRIMALDI, R. et al. Prevalence of CCR5 Δ 32 mutation in Brazilian population and cell susceptibility to HIV-1 infection. *Hum Genet* 111:102-104. 2002.



SILVA, E. e STUMPF, M.P. HIV and the CCR5-Delta32 resistance allele. [FEMS Microbiol Lett.](#) 2004 Dec 1;241(1):1-12.

SOUZA, P.R et al . CCR5 promoter polymorphis and HIV-1 perinatal transmission in Brazilian children. *Journal of reproductive immunology* 69, 77-84. 2006.

VARGAS, A.E. et al. Frequency of CCR5 Δ 32 in Brazilian populations. *Bras J Med Biol Res* ,39(321-325),2006.