

# DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO CCR5 E DELEÇÃO $\Delta$ -32 EM MÃES E FILHOS HIV-1 INFECTADOS DA CIDADE DO RIO GRANDE

JOSE A. LEVY\*  
GABRIELA MENDOZA SASSI\*\*  
ANA MARIA DE MARTINEZ\*\*\*  
FELIPE S. PAULITSCH\*\*\*\*

## RESUMO

Os co-receptores CCR5 e CCR2 têm importância na entrada do HIV em células-alvo. Alterações nas bases alélicas desses co-receptores parecem conferir proteção ao hospedeiro, dificultando a entrada do vírus em nível celular. Pretendeu-se determinar a frequência e distribuição dos co-receptores normais (CCR5 e CCR2) e mutantes ( $\Delta$ 32CCR5 e CCR2-64I) em pacientes HIV infectados. Selecionou-se aleatoriamente uma amostra de 46 pacientes soropositivos acompanhados pelo serviço de infectologia do HU/FURG. Coletou-se sangue e extraiu-se o DNA dos mesmos. Após, foram genotipados os co-receptores CCR5 e  $\Delta$ 32CCR5 ( $n = 46$ ) e CCR2 e CCR2-64I ( $n = 22$ ). Encontrou-se uma frequência alélica das mutações  $\Delta$ 32CCR5 e CCR2-64I de 5,5% e 9%, respectivamente. Dois pacientes afro-brasileiros portavam  $\Delta$ 32-CCR5, gene descrito somente em caucasianos.

## ABSTRACT

The co-receptor CCR5 and CCR2 play an important role as HIV enters the target-cell. Alterations in the allelic bases of those co-receptor seem to check protection to the host, avoiding the entrance of the virus at cellular level. The aim of this work was to determine the frequency and distribution of the normal co-receptors (CCR5 and CCR2) and mutants ( $\Delta$ 32CCR5 and CCR2-64I) in patients HIV-infected. Randomly, it was selected a sample of 46 patients HIV-positive accompanied by the Service of Infection Treatment of HU/FURG. Blood was collected and the DNA was extracted. Afterwards, the co-receptors CCR5 and  $\Delta$ 32CCR5 ( $n = 46$ ) and CCR2 and CCR2-64I ( $n = 22$ ) were genotyped. It was found the allelic frequency of the mutations  $\Delta$ 32CCR5 and CCR2-64I of 5,5% and 9%, respectively. Two Afro-Brazilian patients carried  $\Delta$ 32-CCR5, gene only described in Caucasians.

## 1 – INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida foi reconhecida pela primeira vez em 1981, com a ocorrência inexplicável de pneumonias por *Pneumocystis carinii* em cinco homossexuais masculinos de Los

---

\* Professor do Dep. de Química – FURG. E-mail: levy@mikrus.com.br

\*\* Professora do Dep. Materno-Infantil – FURG

\*\*\* Professora do Dep. de Patologia – FURG

\*\*\*\* Médico

Angeles, até então sadios, e do Sarcoma de Kaposi em 26 homossexuais masculinos, também previamente hígidos, de Nova York e Los Angeles. Com o tempo, a doença também foi descrita em usuários de drogas injetáveis, receptores de transfusão de sangue e hemofílicos. Todos de ambos os sexos.

Em 1983, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi isolado de um paciente com linfadenopatia, e em 1984 foi demonstrado que esse vírus era o agente etiológico da AIDS. Os casos de AIDS citados anteriormente a 1984 foram reconhecidos retrospectivamente devido a suas características clínicas.

### **1.1 – Epidemiologia**

Até dezembro de 2000, foram notificados 203.353 casos de AIDS no país (Ministério da Saúde, 2000). A região sul do Brasil é a segunda região com o maior número de casos, com 29.233 notificações até dezembro/00. De 1983, ano em que foi notificado o primeiro caso no Estado, até agosto de 1999, o número acumulado de notificações foi de 13.204. Como a AIDS é uma doença urbana, o maior número de casos ocorre nas capitais, cidades de regiões metropolitanas e algumas cidades do interior geralmente populosas, como as cidades universitárias e/ou portuárias.

O município do Rio Grande, segundo dados do IBGE (1996), tem uma população de 179.711 habitantes, é uma cidade universitária e o único porto marítimo do Estado. Até dezembro/00, foram notificados 386 casos de AIDS. No Brasil, ocupa a 43ª posição no *ranking* das cidades com maior número de casos notificados, com um coeficiente de incidência em 1998 (número de casos/100.000 habitantes) de 29,9 (Ministério da Saúde, 2000). Desde o início da epidemia, a cidade se destacou pela organização de seus serviços de saúde, oferecendo atendimento especializado de qualidade aos pacientes soropositivos residentes no próprio município e em outros da região. Rio Grande é, no momento, um importante centro de referência e contra-referência aos pacientes HIV positivos residentes em Pelotas, Jaguarão, Santa Vitória do Palmar, Pedro Osório, Pinheiro Machado, São José do Norte, entre outros.

Em 1997, 20% das consultas ambulatoriais prestadas aos indivíduos HIV positivos no Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr. (HU), pertencente à Fundação Universidade Federal do Rio Grande, foram dirigidas a indivíduos procedentes de outros municípios. Desde 1996, os dados dos pacientes foram informatizados e atualmente há aproximadamente 900 pacientes registrados e em acompanhamento clínico-ambulatorial regular.

## 1.2 – Influência do genótipo do hospedeiro na evolução da infecção pelo HIV

Desde o início da epidemia, têm-se observado diferenças na evolução da infecção entre os indivíduos infectados. A variabilidade na evolução da infecção (ou seja, o tempo desde que o indivíduo se infectou até o desenvolvimento da AIDS) dos pacientes é muito grande. Em alguns pacientes é de sete anos antes de aparecer os sintomas da doença, e outros permanecem assintomáticos por 12, 15 ou mais anos (Landu, 1999). Existem ainda casos descritos de pacientes que são expostos freqüentemente ao HIV e não adquirem a infecção. É evidente que fatores ambientais podem ter um papel importante, mas também existem fatores genéticos. E é enfocando esses possíveis fatores genéticos que os pesquisadores tentam explicar essa variação na evolução dos pacientes HIV.

Duas linhas de pesquisa do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) têm-se desenvolvido quase simultaneamente, de acordo com Stanchev e Broder (2001): a imunológica e a virológica. A primeira focaliza a caracterização estrutural e funcional de como o HIV-1 entra na célula, procurando as etapas e requerimentos para a infecção viral, e a outra busca descobrir os fatores capazes de inibir a replicação de HIV-1.

## 1.3 – Os receptores

O desenvolvimento das pesquisas aprimorou o conhecimento sobre o mecanismo pelo qual o HIV penetra nas células de defesa do organismo humano. Sabe-se que, no início do ciclo biológico do HIV, ocorre a entrada do vírus na corrente sanguínea por via sexual, transfusão de sangue, compartilhamento de seringas ou outros. Uma vez dentro do hospedeiro, o vírus procura a molécula CD4+ (presente na superfície das células de defesa) para fazer uma ligação de forte afinidade entre esta e uma proteína que se localiza na superfície do HIV – a gp120. Após, o vírus é incorporado à célula de defesa. Além da ligação entre gp120 e CD4+, existem co-receptores que se localizam próximos ao CD4+ e participariam no mecanismo de entrada desse vírus, facilitando ou impedindo.

O descobrimento de que esses co-receptores – chamados de receptores das *chemokines* – são necessários para que o HIV-1 entre nas células CD4+ tem melhorado o entendimento desta doença (Deng et al., 1996; Dragie et al., 1996). Tem sido também mostrado que tanto ligantes do receptor natural e seus antagonistas podem interferir com a infecção do HIV-1 em células permissivas *in vitro*.

Os co-receptores das *chemokines* são divididos em dois grupos, de acordo com a sua importância no auxílio da entrada do vírus na célula humana: os maiores (representados pelo CCR5 e CXCR4) e os

menores (representados pelo CCR2b, CCR3 e CCR8), de acordo com Michael (1999) e Moore et al. (1997).

O CCR2b e o CCR3 podem mediar a entrada do HIV-1 dentro das células-alvo, ao menos de algumas cepas. Isso sugere uma certa promiscuidade no modo como o HIV-1 interage com os receptores\* *chemokines*. Esses co-receptores têm uma eficiência muito menor que os co-receptores maiores – embora essa afirmação seja baseada somente na sua ação de entrada nas células *in vitro* e/ou nos estudos de fusão de membranas.

Os primeiros dois co-receptores menores identificados foram justamente o CCR2b e o CCR3. Existem evidências de que o CCR3 medeia a entrada do HIV-1 em células da micróglia, no sistema nervoso central. Ele também é expresso nas células T, as quais têm função auxiliar na ativação da resposta humoral (resposta Th2). Quanto ao CCR2b, existem poucas evidências do papel dele na patogênese do HIV-1 *in vivo*. Até o momento, o único lentívirus que utiliza com eficiência esse co-receptor é o SIV (vírus da imunodeficiência símia).

Dois receptores sete-transmembrana com extensa seqüência homóloga ao CCR5 e CXCR4 – o Bonzo/STRL33/TYMSTR e o BOB/GPR15 – têm sido demonstrados como mediadores da entrada do SIV, assim como cepas de HIV-1 e HIV-2 M-trópicos\*\*. Entretanto, recentes dados do grupo John Moore (1999) mostram que os receptores R5Bonzo e R5X4Bonzo humanos sozinhos não podem ser usados pelas cepas primárias de HIV-1 para infectar células T humanas. Pelo menos não isoladamente. Outras moléculas também foram identificadas através de estudos *in vitro*: GPR1, CCR8, US28, V28/CX3CR1, APJ, ChemR23 e CMKRL1/receptor leucotrieno-B4, e são igualmente carentes de força de evidência *in vivo* do seu claro papel na patogênese do HIV-1.

### 1.3.1 – Co-receptor CCR5

Descoberto em 1996, verificou-se que se tratava de um co-receptor de grande importância para entrada para o HIV-1, especialmente das cepas M-trópicas. Dois grupos de pesquisas concluíram que esse co-receptor podia apresentar-se de duas formas diferentes. A primeira, com uma deleção de 32 pares de bases, denominou-se  $\Delta 32$ -CCR5 (ou d32-CCR5). Nessa forma, produz como resultado um gene não-funcional, e, no estado homocigoto, não foram achados indivíduos em estudos em que as amostras incluíam somente

---

\* São usados como sinônimo no texto: *Receptores de citoquinas, co-receptores de citoquinas, receptores sete-transmembrana, chemokines*.

\*\* As cepas HIV M-trópicas (ou *macrófago-trópicas*) se replicam preferencialmente em macrófagos, embora também cresçam em células T CD4+.

peessoas infectadas com HIV-1. Contudo, esse mesmo gene foi visto com freqüência em pessoas não-infectadas e que relataram uma freqüente exposição ao HIV-1. A segunda, na sua forma integral e com todas as bases, foi denominada CCR5.

Células mononucleares de homozigotos  $\Delta 32$ -CCR5 foram resistentes *in vitro* à infecção pelo R5 HIV-1, mas não ao X4 HIV-1, confirmando a especificidade dessa deleção a este co-receptor. A observação de que indivíduos homozigotos para o  $\Delta 32$ -CCR5 foram invariavelmente livres de infecção pelo HIV-1 foi rapidamente confirmada em outros grupos de pesquisa com estudos transversais com milhares de HIV-1 infectados. Isso levou a crer que este genótipo fornecia proteção ao indivíduo contra o HIV-1, genericamente falando. Esses estudos também serviram para reafirmar a identificação do CCR5 como um co-receptor maior de entrada para o HIV-1.

Entretanto, dados subseqüentes mostraram que essa redução no risco é finita, atestando uma complexidade no modo como se transmite o HIV-1. Descobriram-se oito casos de pessoas infectadas pelo HIV-1, cujos genótipos continham a deleção dos 32 pares de bases no CCR5 ( $\Delta 32$ -CCR5 homozigotas).

O'Brien et al., em 1997, relataram o caso de um homem branco, HIV-1 positivo desde 1985, homozigoto para  $\Delta 32$ -CCR5, nascido em 1967. Também era portador de hepatite B e C. A contagem de CD<sub>4</sub> era baixa em 1986 – 158/ $\mu$ L. A contagem continuou a cair e foi iniciado o uso de Zidovudina em 1989. Desenvolveu AIDS (candidíase esofagiana) em 1995 e evoluiu a óbito em 1996 por insuficiência hepática.

Theodorou et al. (1997) também descrevem um caso de paciente HIV-1 positivo com  $\Delta 32$ -CCR5 homozigotos. Esse paciente era soronegativo até abril de 1989, e apresentou a síndrome de soroconversão típica em outubro de 1989, associada com contagem de CD<sub>4</sub>+ normal. A contagem de CD<sub>4</sub> caiu rapidamente e manteve-se abaixo de 150/ $\mu$ L, apesar de a carga viral ser muito baixa. Alguns dados chamam a atenção nesse caso: o rápido curso da doença observado nesse paciente, a contagem de CD<sub>4</sub> com um incomum declínio e as taxas de carga viral que permaneceram baixas. Isso sugere que as cepas de HIV-1 que infectam homozigotos  $\Delta 32$ -CCR5 têm uma replicação incomum e peculiar.

Tanto no caso de O'Brien quanto no de Theodorou, o HIV-1 foi subtipado. Ambas as cepas eram do tipo B e também indutoras de sincício (IS).

O fato é que na ausência de um co-receptor maior de entrada – no caso, o CCR5 – os vírus nesses dois indivíduos utilizaram somente o

outro co-receptor maior de entrada – o CXCR4 –, defendendo dessa maneira a importância fisiológica dos outros co-receptores identificados. A exclusiva utilização do CXCR4 não resultou na progressão mais rápida da doença, sugerindo que a terapêutica de bloquear o CCR5 não necessariamente prejudica o paciente, caso seja exercida uma pressão do HIV-1 para utilizar o CXCR4.

Indivíduos homozigotos  $\Delta 32$ -CCR5 perfazem aproximadamente 1-3% da população do norte da Europa. Heterozigotos são aproximadamente 14%. Esse polimorfismo é decrescente em número de indivíduos à medida que se desce para o sul da Europa e Ásia, sendo largamente ausente na África, Ásia e Oceania. Esse genótipo ( $\Delta 32$ -CCR5) pode ter se fixado há 700 anos no norte da Europa, pois sua fixação e subsequente aumento na frequência desse alelo coincide com o século XIV, quando ocorreu a epidemia de peste bubônica na Europa. Especula-se que esse gene tenha conferido proteção às pessoas na peste bubônica, produzindo uma seleção natural nos indivíduos, nos quais somente os portadores do  $\Delta 32$ -CCR5 sobreviveram. Interessantemente, pessoas que carregam um ou dois alelos  $\Delta 32$ -CCR5 e não têm aparentemente problemas de saúde – sugerindo que a função fisiológica normal do CCR5 é funcionalmente suprida por outro *loci*. Outro ponto que merece destaque é o fato de esse gene ser quase exclusivo de caucasianos.

Enquanto os homozigotos  $\Delta 32$ -CCR5 teriam, genericamente falando, uma proteção total contra o HIV-1, os heterozigotos também o teriam, porém em menor escala. O  $\Delta 32$ -CCR5/CCR5 está associado a um atraso na progressão da doença provocada pelo HIV-1 na maioria, mas não em todos os estudos de populações HIV-1 infectadas. Essa observação é condizente com o nível reduzido de expressão gênica da proteína CCR5 na superfície dos linfócitos T CD4+, e com o nível reduzido *in vivo* da replicação viral nesses indivíduos.

Observações similares foram vistas em pacientes HIV-1 pediátricos. O atraso na progressão da doença foi especialmente visível nos indivíduos portadores de vírus não-formadores de sincício (NSI\*). Isso porque as pessoas portadoras dos vírus que utilizam o CXCR4 como co-receptor principal não têm a vantagem de serem afetadas por um outro co-receptor disfuncional (no caso, o  $\Delta 32$ -CCR5), o qual não

---

\* O HIV pode ser classificado de acordo com a sua habilidade de produzir sincício. Sincícios são células gigantes, em que ocorre um aglomerado de várias outras células (tanto da linhagem linfocitária branca quanto agentes infectantes) que fundem os seus citoplasmas, aumentando de tamanho e dando um aspecto multinucleado a essa massa. Habitualmente, as cepas HIV-1 M-tropicas não formam sincício. Porém, não devem ser usadas como sinônimos.

está primariamente engajado na patogênese da infecção.

O CCR5 pode apresentar outros tipos de polimorfismos. Um menos comum (com a frequência alélica de 1%) é o polimorfismo Thr→Ala CCR5 na posição do nucleotídeo 303 (*CCR5m303*), descrito em 3 de 209 doadores de sangue na França. Isso provoca uma parada forçada no final do primeiro *loop* extracelular do CCR5 (Cys→*stop*), e abole a atividade desse co-receptor.

O CCR5m303 heterozigoto foi achado em um paciente entre 18 expostos não-infectados ao HIV1. O outro cromossomo carregava o gene  $\Delta$ 32-CCR5, e as células T primárias desse indivíduo eram resistentes aos R5 HIV-1 *in vitro*.

Outros tipos de polimorfismos pouco comuns também foram descritos: Arg→Glu na posição 223 do aminoácido no terceiro *loop* intracelular do co-receptor, e mais distalmente uma deleção de um par de bases no nucleotídeo 893, causando um deslocamento à esquerda na posição 229 do aminoácido e resultando na truncação de 54 aminoácidos no CCR5. Ambos polimorfismos, com frequência alélica de aproximadamente 4% nas populações chinesas e japonesas, podem oferecer resistência ao HIV-1, mas ainda não há dados que comprovem tal hipótese.

Lockett et al., em 1999, estudaram 144 pessoas heterossexuais expostas ao HIV-1 (infectadas e não-infectadas) e 57 parceiros HIV-1 positivos. Todos foram genotipados. As pessoas foram divididas em 3 grupos: expostos soronegativos (n = 58), HIV positivo (n = 86) e controle (n = 50). Foram encontrados 3 indivíduos homozigotos  $\Delta$ 32-CCR5, todos HIV negativos, sendo 2 do grupo controle e 1 do grupo exposto soronegativo. Entre os heterozigotos, 10 eram do grupo controle, contra 17 do exposto soronegativo. Ao analisar os dados, os autores não encontraram uma diferença significativa na frequência alélica entre os grupos.

Em outro estudo, realizado em 1997 por Visco-Comandini et al. (1998), foi analisada uma coorte de 79 pacientes caucasianos HIV-1 positivos. Os pacientes foram classificados em progressores rápidos ou muito rápidos versus lentos ou não-progressores de longo período (NPLP). Os pacientes considerados progressores rápidos tiveram um período livre de AIDS inferior a 9 anos (n = 37), incluindo 12 progressores muito rápidos (intervalo de livre de AIDS inferior a 5 anos). Os progressores lentos foram todos os outros indivíduos (n = 42), incluindo os 23 NPLP, este último grupo constituído por pacientes com 9 anos ou mais, livres de AIDS, contagem de CD4+ superior a 500 $\mu$ L, sem terapia anti-retroviral e nenhum sintoma relacionado ao HIV.

Embora nenhum  $\Delta 32$ -CCR5/ $\Delta 32$ -CCR5 tenha sido encontrado nessa amostra, a frequência alélica do  $\Delta 32$ -CCR5 foi maior no grupo de progressão lenta: 14,3% progressores lentos e 15,2% NPLP contra 2,7% progressores rápidos e 0% progressores muito rápidos.

Na América do Sul, Desgranges et al., em dezembro de 2000, analisaram a prevalência desse gene em 62 indivíduos HIV-1 infectados e 62 HIV não-infectados. Esse trabalho foi realizado no Chile, país com população de descendência espanhola, que, conjuntamente à indígena, constitui a maior parte da população. A população afro-chilena é reduzida (o que se torna interessante para o trabalho, uma vez que em pessoas de raça negra não se encontra o  $\Delta 32$ -CCR5). Não foram observados nesse trabalho homozigotos  $\Delta 32$ -CCR5, e a diferença entre HIV positivos (3/63) e HIV negativos (3/62) em indivíduos heterozigotos não foi significativa.

Os promotores da seqüência reguladora do CCR5 também têm importância no polimorfismo e estão associados com alteração da progressão da doença, mas não redução no risco de transmissão. Em dois grandes estudos, com 2.603 pacientes, Martin et al. identificaram 10 alelos no promotor do CCR5 (P1 a P10), dos quais P1 e P4 prevaleceram em todos os grupos raciais (frequência alélica de 40,5%-56,0% e 14,7%-54,1%, respectivamente). Tanto o  $\Delta 32$ -CCR5 como o CCR2B-64I estavam em completo desequilíbrio com o P1, ou seja, se o  $\Delta 32$ -CCR5 ou CCR2B-64I estavam presentes em um dado cromossomo, o P1 estava sempre presente no mesmo cromossomo. Entretanto, o contrário não é válido. O P1 pode estar presente em um cromossomo na ausência de  $\Delta 32$ -CCR5 ou CCR2B-64I. Os indivíduos homozigotos para P1 e sem os alelos protetores  $\Delta 32$ -CCR5, CCR2B-64I ou SDF1 3'A (vide adiante) mostraram um risco acelerado na progressão da doença pelo HIV-1 para AIDS, em aproximadamente 4 anos, se comparados com os indivíduos com alguns dos três alelos protetores ou sem o promotor P1.

Essa aceleração da progressão da doença foi mais marcada nos primeiros cinco anos de infecção. A classe de indivíduos com progressão da doença de taxa intermediária é definida por aqueles grupos sem P1 e sem alelos protetores. O claro mecanismo de ação do P1 permanece obscuro.

Um trabalho feito pela Divisão de Medicina Geográfica da Universidade de Alabama avaliou a distribuição do CCR5 e dos seus respectivos promotores. O trabalho estudou 5 promotores maiores do CCR5 com distribuição diferente entre os quatro grupos étnicos de Kigali, Ruanda (278 mulheres) e Bronx, Nova Iorque (58 caucasianos não-



hispânicos, 135 caucasianos hispânicos e 35 afro-americanos). Os promotores são: *P\*0101*, *P\*0102*, *P\*0103*, *P\*0201* e *P\*0202*. Esses promotores têm importância especial, pois são eles que irão determinar qual expressão terá o co-receptor. Em particular, o alelo promotor *P\*0103* foi restrito aos pacientes negros. Verificou-se que homocigoto *P\*0201/\*0201* é um fator de risco para progressão mais rápida do HIV. Os caucasianos hispânicos e não-hispânicos tiveram uma frequência alélica maior do *P\*0101* e *P\*0201*, enquanto nos afro-americanos foi o *P\*0102*. Esse promotor (*P\*102*) foi bem freqüente também nos africanos-ruandenses, seguindo o exemplo dos afro-americanos. Entretanto, *P\*0202* é que foi o promotor de maior frequência alélica nesse grupo.

Outra resposta imune também atribuída ao gene *CCR5* é a resistência que ele confere ao vírus varicela-zona. Wiencke et al. (2001), em um estudo com 157 indivíduos adultos normais, associaram a circulação de IgG sérica com a presença de  $\Delta 32$ -*CCR5*. Foram testadas IgGs de quatro tipos de herpes-vírus diferentes: varicela-zona, Epstein-Barr, citomegalovírus e herpes simples tipo 1 e tipo 2. Indivíduos com o gene  $\Delta 32$ -*CCR5* foram 9,2 vezes mais soronegativos para varicela-zona que os não-portadores desse gene. Nos outros tipos de herpes-vírus esse achado não foi significativo.

A identificação desses genes e a demonstração de sua proteção da progressão da doença é fundamental para o desenvolvimento de uma terapêutica efetiva à infecção. Daí a importância de se conhecer o genótipo das coortes.

### **1.3.2 – Co-receptor CCR2B**

Enquanto os pesquisadores têm opiniões concordantes sobre os mecanismos de ação plausíveis dos polimorfismos de *CCR5*, o mesmo não vale para os co-receptores menores de entrada do HIV-1 *CCR2B*. Smith et al. relataram uma transição comum causando uma substituição Val→Ile no aminoácido de posição 64 do *CCR2B* (*CCR2B-64I*). A frequência alélica em caucasianos, afro-americanos, asiáticos e hispânicos é de 10%, 15%, 25% e 17%, respectivamente. Como se pode ver, o *CCR2B-64I* está presente em todas as etnias estudadas, ao contrário do  $\Delta 32$ -*CCR5*, que só é encontrado em pessoas brancas.

Esse polimorfismo, localizado no primeiro domínio transmembrana do *CCR2B*, está associado com o atraso na progressão da doença, mas não um risco reduzido de infecção, como foi verificado em quatro coortes de portadores HIV-1. Essas coortes foram enriquecidas por pacientes em que o tempo preciso de infecção HIV-1 era conhecido.

Diferentemente do alelo  $\Delta 32$ -*CCR5*, que inativa o co-receptor de

entrada maior do HIV-1, o CCR2B-64I apenas causa uma mudança conservativa na porção não-exposta do co-receptor de questionável relevância fisiológica.

Os estudos conflitantes sobre este co-receptor estimularam a análise de outras coortes sorocoincidentes e soroprevalentes. Enquanto a maior parte dos subseqüentes estudos confirmou a associação do CCR2B-64I com um retardo na progressão da doença, outros não o fizeram. Essa situação também estimulou o lançamento de uma meta-análise internacional pelo HIV/AIDS Collaborative Review Group of the International Cochrane Collaboration das associações genéticas com o acometimento da doença. As conclusões iniciais confirmaram a associação de ambos,  $\Delta 32$ -CCR5 e CCR2B-64I, com atraso na progressão. Uma meta-análise muito mais extensa confirma a associação de ambos os alelos com atraso de progressão da doença do HIV com grande certeza estatística.

Apesar da associação epidemiológica do CCR2B-64I com o retardo da progressão da doença, nenhum mecanismo de ação para esta associação foi elucidado, mesmo a despeito das significativas pesquisas em cima deste co-receptor. A falha do CCR2B-64I altera a expressão da superfície da célula do CCR2B, CCR5 ou CXCR4, e não afeta a susceptibilidade das células-alvo para infecção com cepas R5 ou X4 HIV-1. Kostrikis et al. sugerem que o CCR5 e CCR2 são separados por apenas 14 kilobases no cromossomo 3, e que o CCR2B-64I pode estar ligado ao polimorfismo do CCR5 através da sua seqüência reguladora, e poderá, então, exercer um efeito através do CCR5. Se o mecanismo for esse, o CCR2B-64I poderá afetar o CCR5 RNAm e a superfície de expressão da célula, mas todos os dados avaliáveis falham em suportar essa conseqüência. O CCR2B-64I é provavelmente ligado a algum lugar no gene do cromossomo 3.

No trabalho de Lockett et al., já citado anteriormente, além de avaliar o CCR5, também foi feita sua correlação com o CCR2. Ao analisar somente o CCR2B-64I, não foi encontrada uma diferença estatística significativa entre os expostos não-infectados, os HIV positivos e o grupo controle. Ao cruzar os dados, combinando o  $\Delta 32$ -CCR5 com o CCR2B-64I, a diferença aumentou entre os grupos, sendo estatisticamente significativa.

#### **1.4 – Dados locais**

Desde 1996, no serviço de HIV/AIDS do Hospital Universitário da FURG, os dados foram informatizados, e atualmente há aproximadamente 900 pacientes registrados em acompanhamento clínico-ambulatorial e laboratorial. Com esta informação é possível realizar estudos sobre a história natural da doença tendo em conta os

fatores genéticos, virais e a sua influência na reconstituição imunitária com o uso de anti-retrovirais. Por outro lado, o Laboratório de Bioquímica Marinha (LBM) da FURG vem desenvolvendo, desde 1976, estudos com genética molecular, especialmente em organismos marinhos, que têm as condições físicas para o desenvolvimento deste tipo de estudos.

Devido à inexistência de estudos epidemiológicos de coorte no Rio Grande do Sul referentes à evolução da infecção pelo HIV, tendo em conta a variabilidade viral e o genótipo do hospedeiro e a influência deste no uso da terapia anti-retroviral tríplice que reconstitui a imunidade celular, torna-se relevante realizar pesquisas nessa área, na cidade do Rio Grande.

O objetivo desta primeira etapa de trabalho é determinar o genótipo de mães e filhos HIV-1 positivos, que têm acompanhamento clínico regular no serviço de infectologia do Hospital Universitário/FURG, verificando a prevalência dos co-receptores CCR5, d32-CCR5, CCR2 e CCR2B-64I nessa amostra.

## **2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

Para este estudo foram recrutadas aleatoriamente mulheres HIV positivas que fazem tratamento no Hospital-Dia AIDS do Hospital Universitário da Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, e que têm um acompanhamento clínico laboratorial regular. Aquelas que concordaram em participar do estudo foram instruídas sobre o objetivo e protocolo do mesmo, assinando, posteriormente, um termo de consentimento.

Os pacientes estudados foram do sexo feminino HIV-1 infectados, e seus respectivos filhos que foram expostos a HIV-1 durante a gestação. Ao todo foram analisados 44 pacientes HIV positivos, entre mães, filhos e mulheres individualmente; mais uma mulher HIV negativo que serviu de controle para o experimento. Das 32 mulheres, 22 eram sem pesquisa de filhos e 10 com pesquisa de filhos. As crianças foram em número de 12.

O material biológico coletado para genotipagem do DNA nos indivíduos foi o sangue. Para a extração de DNA de sangue total foi utilizado o Kit Genomic GFX Pharmacia®. A presença de DNA certificava-se através de eletroforese, em gel de agarose 0,8%. Fig 1.

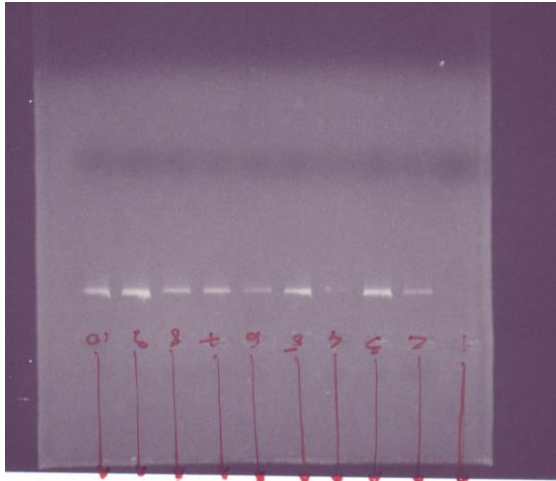


FIGURA 1 – Gel de agarose 0,8% com o DNA de pacientes.

As regiões codificadoras do CCR5 e CCR2 foram amplificadas por PCR (reação em cadeia da polimerase) a partir do DNA genômico. Os primers da região CCR5 usados foram:

- 1- [CAA.AAA.GAA.GGT.CTT.CAT.TAC.ACC] senso,
- 2- [CCT.GTG.CCT.CTT.CTT.CTC.ATT.TCG] anti-senso,
- 3- [CTC.GGA.TCC.GGT.GGA.ACA.AGA.TGG.ATT.AT] senso mutante.

Para a região do CCR2, os primers usados foram:

- 4- [GTG.GGC.AAC.ATG.CTG.GTC.G] senso, primer
- 5- [GTG.GGC.AAC.ATG.CTG.GTC.A] senso mutante
- 6- [AGC.ATG.GAC.AAT.AGC.CAG.GT] anti-senso.

Para cada 1 $\mu$ l da amostra de DNA foi usada a seguinte quantidade de reagentes: buffer 1x 2,5 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 2mM 1 $\mu$ l, dNTP 1 $\mu$ l, primer sensu 2,5 $\mu$ l, primer anti-sensu 2,5 $\mu$ l e água 9,5 $\mu$ l.

### 3 – RESULTADOS

Dos 45 indivíduos estudados, foram encontrados cinco pacientes com a deleção de 32 pares de bases do CCR5: duas mães com seus respectivos filhos, e uma paciente cuja prole não foi testada (Tab. 1). Estas apresentavam bandas duplas após a corrida do PCR, identificando-as como possivelmente heterozigotos (Fig. 2). Os demais analisados foram homozigotos para CCR5, sem a presença da deleção  $\Delta$ 32-CCR5. A freqüência alélica do  $\Delta$ 32CCR5 e de CCR2-64I foi de 5,5% e 9%, respectivamente.

TABELA 1 – Correlação entre o genótipo CCR5 e paciente. As mães com respectivos filhos encontram-se na mesma linha.

Id. Mãe	Genótipo	Id. Prole	Genótipo
12401	$\Delta 32$ CCR5/CCR5	12402	$\Delta 32$ CCR5/CCR5
12403	CCR5/CCR5	12404	CCR5/CCR5
12405	CCR5/CCR5	12406	CCR5/CCR5
12407	CCR5/CCR5	12408	CCR5/CCR5
		12409	CCR5/CCR5
12410	CCR5/CCR5	12411	CCR5/CCR5
19401	CCR5/CCR5	19402	CCR5/CCR5
19403	$\Delta 32$ CCR5/CCR5	19404	$\Delta 32$ CCR5/CCR5
19405	CCR5/CCR5	19406	CCR5/CCR5
19407	(Perda)		
19408	$\Delta 32$ CCR5/CCR5		
19409	CCR5/CCR5		
19410	CCR5/CCR5		
19411	CCR5/CCR5		
19412	CCR5/CCR5		
26401	CCR5/CCR5	26402	CCR5/CCR5
26403	(Perda)		
26404	CCR5/CCR5		
26405	CCR5/CCR5		
03501	CCR5/CCR5	03502	CCR5/CCR5
		03503	CCR5/CCR5
03504	CCR5/CCR5		
03505	CCR5/CCR5		
03506	CCR5/CCR5		
03507	CCR5/CCR5		
03508	CCR5/CCR5		
03509	CCR5/CCR5		
03510	CCR5/CCR5		
10501	CCR5/CCR5		
10502	CCR5/CCR5		
10503	CCR5/CCR5		
10504	CCR5/CCR5		
10505	CCR5/CCR5		
10506	CCR5/CCR5		

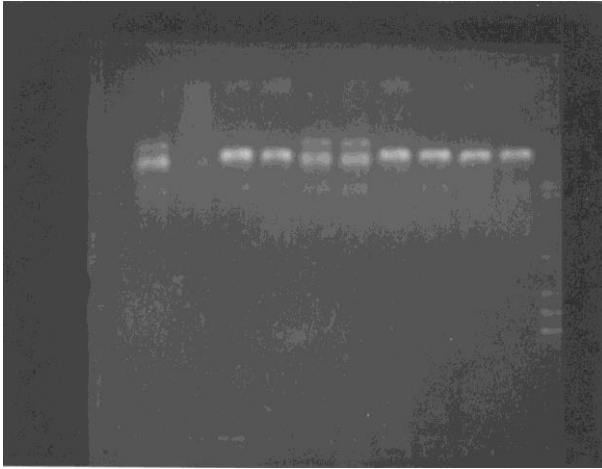


FIGURA 2 – Gel de agarose 2,5% com DNA amplificado por PCR para estudo do CCR5. Há ocorrência de bandas duplas na 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> carreiras (da esquerda para direita), sugerindo a deleção de 32 pares de bases nesses 3 pacientes.

Uma das mães heterozigotas ( $\Delta 32\text{CCR5}/\text{CCR5}$ ), na entrevista realizada, tem a seguinte história clínica: mestiça (afro-brasileira), sabe ser portadora do vírus HIV desde janeiro de 1999, durante o pré-natal realizado. Refere via de transmissão heterossexual com parceiro único, nega uso de drogas endovenosas e/ou inalatórias antes e durante a gestação, é fumante (não suspendeu o uso durante a gestação), não fez uso de medicação anti-retroviral durante a gestação, nega ruptura prematura de membranas e outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) durante a gestação. Tem 3 filhos, sendo somente o último exposto ao HIV. Seu filho exposto ao HIV nasceu em fevereiro de 1999 com 2.120g, a termo, parto normal, e não foi amamentado durante o puerpério.

A outra mãe heterozigota é branca, portadora do vírus HIV desde maio de 1999, também durante o pré-natal realizado. Refere via de transmissão heterossexual, através de parceiro único, nega uso de drogas endovenosas e/ou inalatórias antes e durante a gestação. Também nega: tabagismo, uso de medicação anti-retroviral durante a gestação, ruptura prematura de membranas, outras DSTs durante a gestação. Seu único filho foi exposto ao HIV durante a gestação, nasceu em maio de 1999, pesando 2.730g, a termo, parto normal, e foi amamentado durante o puerpério.

No tocante à outra paciente, que é heterozigota ( $\Delta 32\text{CCR5}/\text{CCR5}$ ), e cuja prole não foi averiguada, não há dados disponíveis.

Também foi realizado PCR para averiguar quais os alelos dos pacientes para o co-receptor CCR2 (Tab. 2). Para este não foram incluídos todos os pacientes, mas somente as mães com seus respectivos filhos. Isso gerou uma amostra de 22 pacientes (dez mães e doze crianças). Foram encontrados quatro heterozigotos para a inversão no 64° par de bases do gene CCR2, verificado por bandas duplas após a realização do PCR desses pacientes (Fig. 3). Interessantemente, esses pacientes são os mesmos que tiveram nos seus genótipos  $\Delta 32\text{CCR5}/\text{CCR5}$  (tanto as mães quanto os filhos).

TABELA 2 – Correlação entre o genótipo CCR2 e paciente. As mães com os respectivos filhos encontram-se na mesma linha.

Mãe	Genótipo	Prole	Genótipo
<b>12401</b>	CCR2B-64I/CCR2	<b>12402</b>	CCR2B-64I/CCR2
<b>12403</b>	CCR2/CCR2	<b>12404</b>	CCR2/CCR2
<b>12405</b>	CCR2/CCR2	<b>12406</b>	CCR2/CCR2
<b>12407</b>	CCR2/CCR2	<b>12408</b>	CCR2/CCR2
		<b>12409</b>	CCR2/CCR2
<b>12410</b>	CCR2/CCR2	<b>12411</b>	CCR2/CCR2
<b>19401</b>	(Perda)	<b>19402</b>	CCR2/CCR2
<b>19403</b>	CCR2B-64I/CCR2	<b>19404</b>	CCR2B-64I/CCR2
<b>19405</b>	CCR2/CCR2	<b>19406</b>	CCR2/CCR2
<b>26401</b>	CCR2/CCR2	<b>26402</b>	CCR2/CCR2
<b>03501</b>	CCR2/CCR2	<b>03502</b>	CCR2/CCR2
		<b>03503</b>	CCR2/CCR2



FIGURA 3 – Gel de agarose 2,5% com DNA amplificado por PCR para estudo do CCR2. Há ocorrência de bandas duplas na 8ª e 9ª carreiras (da esquerda para direita), sugerindo a inversão de pares de base.

## 4 – DISCUSSÃO

A freqüência da mutação do alelo CCR5 em nosso trabalho foi de 5,5%, enquanto na Europa e países nórdicos essa freqüência em pessoas brancas chega a 9,2% (n = 704) e 9,8% (n = 122) (Michael, 1999), e nos Estados Unidos foi encontrado na faixa de 8% (95% brancos, n = 637). Embora o nosso número de pacientes seja baixo, ele nos permite uma comparação grosseira com outros estudos.

Estudos anteriores (Michael, 1999) mostram que os homozigotos para  $\Delta 32\text{CCR5}$  têm uma proteção substancial após o contato sexual no que tange a infecção pelo HIV. Os indivíduos  $\Delta 32/\Delta 32$  são mais freqüentemente encontrados entre as pessoas expostas e não-infectadas pelo vírus. Este trabalho somente selecionou pacientes entre um grupo sabidamente HIV positivo, sendo esperado não encontrar nenhum homozigoto para essa mutação do CCR5. Também foi pretendido conferir se as crianças que tiveram exposição vertical e soronegativaram com o passar do tempo teriam alguma relação com essa mutação do CCR5. Entre as duas crianças heterozigotas para  $\Delta 32\text{CCR5}$ , uma confirmou ser soronegativa e a outra soropositiva. A falta de uma coorte maior prejudicou essa observação.

As pessoas heterozigotas ( $\Delta 32\text{CCR5}/\text{CCR5}$ ) mostraram uma taxa de progressão da doença mais lenta que as demais pessoas homozigotas sem essa mutação ( $\text{CCR5}/\text{CCR5}$ ) em vários estudos. Porém, nenhum efeito na transmissão sexual (tanto homo quanto heterossexual) foi observado.

A presença dessa alteração no alelo CCR5 é substancialmente maior em pacientes caucasianos (i.e., pessoas oriundas do norte da Europa, brancas e com ancestrais brancos). Neste estudo, encontramos uma mãe e seu filho mestiços (mistura de afro-brasileiro com branco) e que carregam no seu genótipo essa mutação do alelo CCR5. Embora sejam heterozigotos, o fato chama a atenção pela baixa freqüência com que esse alelo é visto em descendentes de africanos. Peterson et al. (2001) descrevem essa alteração em pessoas mestiças e comentam a baixa freqüência com que é vista. Entretanto, o Brasil é um país com alta taxa de miscigenação, marcante na cidade do Rio Grande. Isso propiciou uma variação genética ampla.

Outra mutação estudada foi a do CCR2, que causa uma inversão da base 64, levando a uma mudança de um único aminoácido. Estudou-se somente as mães e os filhos para essa inversão. Foi encontrada uma freqüência alélica de 9% e as mesmas mães e filhos que tinham a mutação no CCR5 tiveram a inversão da base 64 do CCR2. Todos heterozigotos.



Lockett et al. (1999) analisaram também a mutação do CCR2 e verificaram que, embora a frequência de 64I em HIV positivos seja similar à das populações controle, havia um número significativamente menor de pessoas heterozigotas para a mutação 64I entre expostos e não-infectados do que entre heterossexuais infectados HIV positivos. Lockett et al. chegaram à conclusão que o 64I é um fator de risco para a transmissão do HIV em mulheres, na coorte estudada por eles (RR = 1,6). Entretanto, a transmissão de HIV é menos freqüente de mulheres para homens do que de homens para mulheres. Conseqüentemente, mais contatos dos homens são necessários para detectar um possível efeito do genótipo na infecção no homem. Como a maioria dos contatos no estudo de Lockett et al. foram mulheres, uma diferença significativa entre os genótipos foi reduzida quando contatos com homens foram introduzidos na análise.

Peterson et al. (2001) fizeram a identificação de novas mutações no alelo CCR5, incluindo do  $\Delta 32$ CCR5 através de um de gel com gradiente de desnaturação, relacionando os alelos CCR5,  $\Delta 32$ CCR5, CCR2 e CCR2-64I. O gel com gradiente de desnaturação (*denaturing gradient gel electrophoresis* – DGGE) tem uma composição diferente do gel de agarose. Ele permite detectar substituições nucleotídicas simples.

Quando Peterson et al. estudaram o CCR5, descobriram sete novos pontos de mutação e identificaram seis já previamente relatados em outros trabalhos. Todos os pacientes HIV positivos e HIV negativos apresentaram bandas adicionais no DGGE no fragmento E, abaixo (L) e/ou acima (U), em combinação com a banda CCR5 normal (N). Bandas duplas à baixa porcentagem de uréia e formaldeído foram notadas. A retirada dessas bandas aberrantes do gel, seguida por seqüenciamento, revelou 11 variações de nucleotídeos ocorrendo na banda baixa, e uma 12<sup>a</sup> variação foi incluída na banda superior. Comparando essa seqüência mutante com o Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), revelaram que essa seqüência forma parte do gene para o co-receptor de citoquina 2 (CCR2), incluindo os códons 217-267. Todas as mutações que ocorreram com o fragmento E foram confirmadas como sendo da mutação CCR5 por reconhecimento das intensidades das bandas no DGGE e confirmação por excisão de bandas heteroduplex do gel seguidas por seqüenciamento.

Os dados de Peterson et al. permitem explicar os resultados deste trabalho, onde todas as amostras heterozigotas para  $\Delta 32$ CCR5 foram igualmente heterozigotas para CCR2-64I. Nossos achados concordam com o que Peterson et al. revelaram, já que as mutações  $\Delta 32$ CCR5 formam parte do CCR2. Porém, seria necessária a eletroforese em

DGGE, como fez Peterson et al., com seqüenciamento das amostras para confirmar essa hipótese e aumentar o número de casos.

## 6 –CONCLUSÃO

Após a análise dos dados, verifica-se que a freqüência alélica para  $\Delta 32CCR5$  e CCR2-64I foi, respectivamente, 5,5% e 9% nessa amostra.

Todos os pacientes heterozigotos para mutação do CCR2 também eram heterozigotos para mutação do CCR5, levando a se pensar em uma correlação entre esses dois co-receptores.

A presença de dois afro-brasileiros mestiços (mãe e filho) com alelos  $\Delta 32CCR5/CCR5$  demonstra que essa mutação não é exclusiva de caucasianos.

A freqüência alélica para  $\Delta 32CCR5$ , em nossa amostra, foi inferior à encontrada em outros estudos europeus (5,5% versus 9,2%), tendo que ser levado em consideração que nesse estudo foram genotipados somente pacientes soropositivos.

A falta de um maior número de pacientes prejudicou a correlação da progressão da patologia com o tipo de co-receptor apresentado por cada paciente.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Direção do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa, da FURG, em especial ao Dr. Vicente Mariano Pias, à FAPERGS (Proc. 0104648), CNPq e ao Laboratório de Bioquímica Marinha da FURG, pelos auxílios que permitiram viabilizar este projeto. Agradecemos também à equipe do SEDILADI, Serviço de Diagnóstico Laboratorial de Doenças Infecto-Contagiosas da FURG, e à equipe do Hospital-Dia Pediátrico da FURG. E, muito especialmente, às pacientes que colaboraram neste estudo.

## BIBLIOGRAFIA

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Boletim epidemiológico AIDS*. Ano XIII, n. 03-36 a 52 Semanas Epidemiológicas – outubro a dezembro/2000.

\_\_\_\_\_. *Boletim epidemiológico AIDS*. Ano XII, n. 04-35-47, setembro a novembro/1999.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Congenital and acquired immunodeficiencies*. In: ———. *Celular and molecular immunology*. Philadelphia, ed. W. B. Saunders Company, 2000; 14ª ed, cap 20, p. 445-67

Alkhatib G, Ahuja SS, Light D, et al. CC chemokine receptor 5-mediated signaling and HIV-1 co-receptor activity share common structural determinants. *J Biol Chem* 1997; 272(32): 19771-6.

Berson J & Doms RW. Structure-function studies of the HIV-1 coreceptors. *Immunology* 1998; 10: 237-48.

Bidwell J, Keen L, Gllagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity* 1999; 1: 3-19.

Björndal A, Deng H, Jansson M, *et al.* Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 1997; 71(10): 7478-87.

Blaak H, Ran LJ, Rientsma R, Schuitemaker H. Susceptibility of in vitro stimulated PBMC to infection with NSI HIV-1 is associated with levels of CCR5 expression and  $\beta$ -chemokine production. *Virology* 2000; 267, 237-46.

Brien TRO, Winkler C, Dean M, *et al.* HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 $\Delta$ 32. *Lancet* 1997; 349: 1219.

Carrington M, Nelson GW, Martin MP, *et al.* HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science* 1999; 283: 1748-52. *apud* Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 466-474.

Cecilia D, Kulkarni SS, Tripathy SP, *et al.* Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. *Virology* 2000; 271: 253-8.

Chenike AL, Sattentau Q, Moulard M. Selective HIV-1-induced downmodulation of CD4 and coreceptors. *Arch Virol* 2000; 145(3): 455-71.

Cocchi F, Deviso AL, Garzino-Derno A, *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270: 1811-15. *apud* Moore JP, Trkola A & Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 551-562.

Coliman RG & Yi Y. Cofactors for human immunodeficiency virus entry into primary macrophages. *The Journal of Infectious Diseases* 1999; 179: S422-6.

Deng H., Liu R., Ellmeier, W., *et al.*, Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1, 1996. *Nature*, 381: 661-666.

Desgranges C, Carvajal P, Afani A, *et al.* Frequency of CCR5 gene 32-basepair deletion in Chilean HIV-1 infected and non-infected individuals. *Immunol Lett* 2001; 76(2); 115-117.

Desgranges, C., Carvajal, P., Afani, A., *et al.*, 2001. Frequency of CCR5 gene 32-basepair deletion in Chilean HIV-1 infected and non-infected individuals. *Im. Lett* 76: 115-117.

Dragic T., Litwin, V., Allaway, CP., *et al*, 1996. HIV-1 entry into CD4 cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381: 667-673.

Easterbrook PJ, Rostron T, Ives N, *et al.* Chemokine receptor polymorphisms and human immunodeficiency virus disease progression. *The Journal of Infectious Diseases* 1999; 180: 1096-105.

Eskild A, Jonassen TØ, Heger B, *et al.* The estimated impact of the CCR-5  $\Delta$ 32 gene deletion on HIV disease progression varies with study design. *AIDS* 1998; 12: 2271-74.

Fauci AS, Lane HC. Doenças causadas por vírus da imunodeficiência humana (HIV): AIDS e distúrbios correlacionados. *In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. Harrison – Medicina Interna*. Rio de Janeiro, ed. Mc Graw Hill, 1998; 14ª ed, v. II, cap 308, 1903-70.

Fauci AS, Longo DL. Os retrovírus humanos. *In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. Harrison – Medicina Interna*. Rio de Janeiro, ed. McGraw Hill, 1998; 14ª ed, v I, cap 192, 1184-89.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, *et al.* HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872-7. *apud* Moore JP, Trkola A & Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 551-562

- Feng Y, Leavitt M, Tritz R, *et al.* Inhibition of CCR5-dependent HIV-1 infection by hairpin ribozyme gene therapy against CC-chemokine receptor 5. *Virology* 2000; 276: 271-8.
- Ghezzi S, Menzo S, Brambilla A, *et al.* Inhibition of R5X4 dualtropic HIV-1 primary isolates by a single chemokine co-receptor ligands. *Virology* 2001; 280: 253-61.
- Greene E, Pinto L, Landay A, *et al.* Anti-CCR5 antibodies in sera of HIV-positive individuals. *Human Immunology* 2001; 62: 143-145.
- Herrera C, Morimoto C, Blanco J, *et al.* Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *J Biol Chem* 2001; 12: 102-7.
- Hu Qx, Trent JO, Tomaras GD. Identification of ENV determinants in V3 that influence the molecular anatomy of CCR5 utilization. *J Mol Biol* 2000; 302: 359-375.
- Klein M. Current progress in the development of a human immunodeficiency virus vaccine: research and clinical trials. *Vaccine* 2001; 19: 2210-15.
- Klitz W, Chaim B, Schito A, *et al.* Evolution of the CCR5  $\Delta 32$  mutation based on haplotype variation in Jewish and northern European population samples. *Human Immunology* 2001; 62: 530-8.
- Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, *et al.* A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med* 1998; 4: 350-3 *apud* Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 466-474.
- Landau NR. HIV co-receptor identification: good or bad news for drug discovery? *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 628-630.
- Landau NR. Recent advances in AIDS research: genetics, molecular biology and immunology. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 449-450.
- Levy JA, Sanchez A. Aplicações dos métodos de biologia molecular em oceanografia biológica. *Vittalle* 1998; 10: 47-68.
- Li BQ, Fu T, Dongyan Y, *et al.* Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 276: 534-8.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiple exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86: 367-7. *apud* Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 466-474.
- Lockett SF, Alonso A, Wyld R, *et al.* Effect of chemokine receptor mutations on heterosexual human immunodeficiency virus transmission. *The Journal of Infectious diseases* 1999; 180: 614-20.
- Luther SA, Cyster JG. Chemokine as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001; 2(2): 102-7.
- Malkevitch N, McDermott DH, Yi Y, *et al.* Coreceptor choice and T cell depletion by R5, X4, and R5X4 HIV-1 variants in CCR5-deficient (CCR5 $\Delta 32$ ) and normal human lymphoid tissue. *Virology* 2001; 281: 239-47.
- Malkevitch N, McDermott DH, Yi Y, *et al.* Coreceptor choice and T cell depletion by R5, X4, and R5X4 HIV-1 variants in CCR5-deficient (CCR5 $\Delta 32$ ) and normal human lymphoid tissue. *Virology* 2001; 281(2): 239-47.
- Mandell GL, Mildvan D. *Atlas of infectious diseases*. Philadelphia, ed. Current Medicine, 1997. 2<sup>a</sup> ed, v I.

Martin, M., Dean, M., & Smith, M., 1998. Acceleration of AIDS progression by promoter variant of CCR5. *Science* 282: 1907-11

Martinson JJ, Hong L, Karanikolas R, et al. Global distribution of the CCR2-641/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS* 2000; 14(5): 483-9.

Meyer L, Magierowska M, Hubert J-B, et al. CCR5  $\Delta$ 32 deletion and reduced risk of toxoplasmosis in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of Infectious Diseases* 1999;180: 920-4.

Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 466-474.

Moore JP, Trkola A & Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 551-562.

O'Brien, T., Winkler C., Dean, M., et al, 1997. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 $\Delta$ 32. *The Lancet* 349: 1219.

Oh MD, Kim SS, Kim EY, et al. The frequency of mutation in CCR5 gene among Koreans. *J STD AIDS* 11(4): 266-7.

Papa A, Papisimitriou E, Adwan G, et al. HIV-1 co-receptor CCR5 and CCR2 mutations among Greeks. *Immunol Med Microbiol* 2000; 28(1): 87-9.

Paxton WA, Martin SR, Tse D, et al. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures. *Nat Med* 1996; 2: 412-17. *apud* Moore JP, Trkola A & Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 551-562.

Peterson DC, Kotze MJ, Zeier MD, et al. Novel mutations using a comprehensive CCR5-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *AIDS* 2001; 15(2): 171-7.

Phair JP. Determinants of the natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of Infectious Diseases* 1999;179(2): S384-6.

Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, et al. N-linked glycosylation of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 co-receptor utilization. *J Biol Chem* 2001;

Rij RPv, Portegies P, Hallaby T, et al. Reduced prevalence of the CCR5  $\Delta$ 32 heterozygous genotype in human immunodeficiency virus-infected individuals with AIDS dementia complex. *The Journal of Infectious Diseases* 1999;180: 854-7.

Saiki RK, Gelfand D, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491

Sampson M, Libert F, Doranz BL, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382: 722-5. *apud* Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 466-474.

Sanchez-Carrasquillo E, Garcia V, Rivera CE, et al. CCR5 and beta-chemokines in HIV-1 infected children. *Health Sci J* 2000; 19(4): 345-51.

Smith MW, Dean M, Carrington M, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV infection and disease progression. Haemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Haemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1997; 959-65 *apud* Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 466-474.

Spencehauer C, Gordon CA, Trkola A, *et al.* A luciferase-reporter gene-expressing T-cell line facilitates neutralization and drug-sensitivity assays that use either R5 or X4 strains of human immunodeficiency virus type-1. *Virology* 2001; 280: 292-300.

Sprins E, Ferreira J, Pereira PP. Epidemiologia da Infecção: Aspectos que contribuem para a transmissão do HIV. *In: Sprins E, Finkelsztein A. Rotinas em HIV e AIDS.* Porto Alegre, ed. Artmed, 1999; cap 1, 21-24.

Stantchev T, Broder C. Human immunodeficiency virus type-1 and chemokines: beyond competition for common cellular receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2001; 12: 219-43.

Tamura H, Omagari A, Oishi S, *et al.* Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selective indexes. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 2000; 10: 2633-37.

Tang J, Rivers C, Karita E, *et al.* Allelic variants of human beta-chemokines receptor 5 (CCR5) promoter: evolutionary relationships and predictable associations with HIV-1 disease progression. *Genes and Immunity* 1999; 1: 20-27.

The International Perinatal HIV Group. Duration of ruptured membranes and vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis from 15 prospective cohort studies. *AIDS* 2001; 15:357-68.

Theodorou I, Laurence M, Magierowska M, *et al.* HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 $\Delta$ 32. *Lancet* 1997; 349: 1219-20.

Valentin A, Trivedi H, Lu W, *et al.* CXCR4 mediates entry and productive infection of syncytia-inducing (X4) HIV-1 strains in primary macrophages. *Virology* 2000; 269: 294-304.

Visco-Comandi U, Hultgren C, Brostrom C, *et al.* 1998. Human Immunodeficiency virus type 1 diseases progression, and specific immune responses. *Clin Diag Lab Imm*, July, 463-466.

Wiencke, J., Kelsey, K., Zuo, Z., *et al.*, 2001. Genetic resistance factor for HIV-1 and immune response to varicella zoster virus. *The Lancet*, 357:360-61.

Xiao X, Kinter A, Broder CC, *et al.* Interactions of CCR5 and CXCR4 with CD4 and gp120 in human blood monocyte-derived dendritic cells. *Experimental and Molecular Pathology* 2000; 68: 133-8.

Yang J, Liu CQ. Molecular modeling on human CCR5 receptors and complex with CD4 antigens and HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 21(1): 29-34.

Zang Y, Moore JP. Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry? *J Virol* 1999; 73: 3443-8. *apud* Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 466-474.

Zuber B, Hinkula J, Vödrös D, *et al.* Induction of immune responses and break of tolerance by DNA against the HIV-1 co-receptor CCR5 but no protection from SIVsm challenge. *Virology* 2000; 400-11.

Recebido: 2/6/2003

Aceito: 22/6/2003