

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

ÉRICA RIBEIRO GOMES

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE *CCR5* EM PORTADORES DO
HIV-1

BELÉM-PA
2009

ÉRICA RIBEIRO GOMES

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE *CCR5* EM PORTADORES DO
HIV-1

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profº Drº Ricardo Ishak

BELÉM-PA
2009

ÉRICA RIBEIRO GOMES

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE *CCR5* EM PORTADORES DO
HIV-1

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina.

Local e data da defesa: Belém (PA), 14 de dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Ishak
ICB – UFPA
(orientador)

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
(ICB-UFPA)

Prof^ª Dr^ª Izaura Maria Vieira Cayres Vallinoto
(ICB-UFPA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Meu Deus, por poder estar concluindo esta jornada com sucesso, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Deixo meu obrigado ao Laboratório de Virologia que me acolheu desde o início da minha jornada, nesta Universidade, aos Professores Ricardo Ishak, Antonio Vallinoto, Luiz Fernando Machado, Marluísa Ishak, e Vânia Nakuth muito obrigada por tudo que me foi ensinado ao longo de todos esses anos e pelo exemplo que vocês são. Não posso deixar de agradecer aos amigos que conquistei neste laboratório: Tany, Larissa, Jamilla, Priscila, Samara, Jacqueline, Ethienne, Núbia Caroline, Bárbara, Felipe, Thiago, Lúcio, Isabella, Rafa, Di Paula, Léo, Iran, Luana, Juliana, Irlis, Lucinda, Elizabete, Renata, Paulinha, Rosimar, Simone, Izete, Maria Helena, Sandra.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Ricardo Ishak que me acompanha desde a iniciação científica, por tudo que me ensinou, pelo apoio, incentivo e confiança que a mim foi depositada.

À todos os indivíduos doadores de suas amostras, pois eles foram essenciais no desenvolvimento desta pesquisa.

À minha família, meu alicerce, que quase sempre a distância me apoiou me incentivou e nunca deixou que eu desistisse, ao meu namorado que sempre acreditou em mim e que foi um verdadeiro companheiro, que nas horas mais difíceis não deixou que eu desanimasse obrigada a todos pelo incentivo, apoio, compreensão e carinho. Amo vocês!

À turma de Biomedicina 2006 pelo companheirismo, apoio e por todos os momentos felizes, de aflição e nervosismo que passamos juntos.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho de conclusão de curso tornar-se realidade, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FAMÍLIA <i>RETROVIRIDAE</i>	1
1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA –1 (HIV-1).....	2
1.2.1 Biologia do HIV-1	3
1.2.1.1 Estrutura morfológica e Organização genômica	3
1.2.1.2 Replicação do HIV-1	6
1.2.2 Patogênese da infecção pelo HIV-1	9
1.3 O RECEPTOR CC-QUIMIOCINA 5 (CCR5)	11
1.3.1 Histórico	11
1.3.2 Receptores de quimiocinas	12
1.3.3 O co-receptor CCR5	13
1.3.4 O gene <i>ccr5</i>	16
1.3.5 Distribuição global do alelo <i>ccr5</i> Δ32	17
1.3.6 Polimorfismos e impacto na infecção pelo HIV-1	19
1.4 USO TERAPÊUTICO DO CCR5	21
1.5. OBJETIVOS	22
1.5.1 Objetivo geral	22
1.5.2 Objetivos específicos.....	22

2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	23
2.1.1 Indivíduos soropositivos para HIV-1	23
2.1.2 Indivíduos soronegativos de alto risco para o HIV-1	23
2.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O HIV-1/2	24
2.3 DETERMINAÇÃO DE CARGA VIRAL PLASMÁTICA DO HIV-1	24
2.4 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺	24
2.5 DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE <i>ccr5</i>	24
2.5.1 Extração do DNA	24
2.5.2 Determinação do polimorfismo <i>ccr5</i> 432	25
2.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS	26
3. RESULTADOS	27
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da morfologia do HIV-1	4
Figura 2 - Esquema representativo do genoma do HIV-1	5
Figura 3 - Mecanismo de fusão do HIV-1 à célula alvo	7
Figura 4 - Estrutura e sequência de aminoácidos da molécula CCR5, com os sete domínios transmembrana, três <i>loops</i> intracelulares e três <i>loops</i> extracelulares	14
Figura 5 - Representação do receptor CD4, das glicoproteínas do HIV-1 e do correceptor CCR5	14
Figura 6 - Esquema representativo do gene <i>ccr5</i>	17
Figura 7- Mapa da distribuição mundial do alelo CCR5 Δ 32.	18
Figura 8 - Gene CCR5 parcial e sequência de aminoácidos com eliminação de 32 pb	19
Figura 9 - Gel de agarose a 3% com identificação de duas combinações alélicas possíveis para o gene <i>ccr5</i>	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuições alélica e genotípica do gene <i>ccr5</i> nos grupos investigados.....	27
Tabela 2 - Polimorfismo no gene <i>ccr5</i> e quantificação de linfócitos T CD4 ⁺ nos indivíduos HIV-1 positivos.....	28
Tabela 3 - Polimorfismo no gene <i>ccr5</i> e quantificação da carga viral nos indivíduos HIV-1 positivos.....	28
Tabela 4 - Resultados da contagem de linfócitos T CD4 ⁺ , de carga viral, de tempo de terapia ARV e do tempo de infecção dos portadores do HIV-1 que possuem mutação CCR5 Δ 32 em heterozigose.....	29

RESUMO

Para entrar na célula alvo o HIV-1 requer a presença da molécula CD4 que age como receptor e de uma segunda molécula ou co-receptor que, na maioria de casos, é um receptor de quimiocina. Entre os receptores de quimiocina, o CCR5 e o CXCR4 são os co-receptores principais para a entrada de HIV. Uma deleção de 32 pares de bases no gene que codifica o receptor CCR5 impede a perfeita ligação do vírus à célula alvo. O objetivo deste trabalho foi descrever o perfil genético no receptor de Beta-quimiocinas CCR5 em portadores do HIV-1 e em um grupo de soronegativos com alto risco de exposição e correlacionar o perfil genético aos níveis de contagem de linfócitos T CD4⁺ e de carga viral. Foram selecionados, aleatoriamente, 330 portadores do HIV-1, atendidos na Unidade de Referência para Doenças Infecciosas e Parasitárias Especiais (URE-DIPE) e 100 profissionais do sexo de Belém. Após assinarem um termo de consentimento e responderem ao questionário epidemiológico, foi coletada uma amostra de sangue dos participantes, para extração do DNA e amplificação por reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) de um fragmento de 184 pb do gene CCR5. A frequência da mutação CCR5-Δ32 em heterozigose foi de 4% na população de portadores do HIV-1 e de 8% na população controle de alto risco. Não foram encontrados indivíduos homozigotos para a mutação CCR5-Δ32 neste estudo. Não foi observada diferença nas distribuições das frequências alélicas e genotípicas no gene do receptor CCR5 entre as duas populações em estudo. No presente estudo não houve correlação estatisticamente significativa entre a contagem de linfócitos T CD4⁺ e de carga viral com a presença da mutação CCR5 Δ32 na forma heterozigota. Assim, não foi possível inferir se a presença da mutação entre os soropositivos heterozigotos para o gene CCR5 está associada a uma progressão mais lenta para AIDS, quando comparado aos pacientes portadores da forma normal do co-receptor.

1. INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA *RETROVIRIDAE*

Os retrovírus foram descobertos pela ciência há mais de 80 anos sendo considerados como responsáveis pelo aparecimento de sarcoma em galinhas. Mais tarde, atribuiu-se aos retrovírus o aparecimento de adenocarcinoma mamário e de leucemias em camundongos, aumentando, assim, o interesse da comunidade científica (Gallo, 2005).

Mesmo quando ainda não se havia feito a caracterização dos vírus como agentes microbianos, em 1908, Ellerman & Bang, conseguiram induzir processos de leucemia em galinhas a partir da inoculação de filtrado celular obtido de tecidos leucêmicos de pássaros. Posteriormente, Rous, em 1911, confirmou a possibilidade da etiologia infecciosa em processos neoplásicos ao isolar o primeiro vírus de galinhas, que desenvolvia um tipo frequente de malignidade, o chamado sarcoma de Rous. Agentes virais da família *Retroviridae* foram sendo sucessivamente descritos a partir de isolados de peixes, répteis, aves e mamíferos, ainda que o potencial patogênico tenha sido demonstrado de forma convincente apenas nas aves e nos mamíferos. Tal fato despertou, ainda mais, o estudo da retrovirologia, pois a geração do novo conhecimento trazia embutida a possibilidade da redução da incidência de tumores pelo uso de medidas profiláticas que começavam a ser aplicada a outros agentes de natureza infecciosa (Gallo & Wong-Staal, 1982; Coffin, 1996).

A possibilidade da associação entre os retrovírus e neoplasias em seres humanos, pôde ser confirmada na década de 1980, quando foi isolado o primeiro retrovírus humano, a partir de uma linhagem de células linfoblastóides, obtida de um paciente com linfoma cutâneo de células T nos Estados Unidos da América (EUA), assim como em pacientes no Japão, com quadros de leucemia/linfoma de células T de adultos, LLcTA (*adult T-cell leukemia/lymphoma*, ATLL), em situações independentes (Poiesz *et al.*, 1980).

A família *Retroviridae* é subdividida em sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus* (ICTV, 2004).

Os retrovírus patogênicos ao homem incluem os (i) Vírus linfotrópico de células T humanas 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2), relacionados a distúrbios neurológicos e hematológicos, classificados no gênero *Deltaretrovirus* e (ii) as espécies *Vírus da imunodeficiência humana 1*, HIV-1 e HIV-2, classificados no gênero *Lentivirus* (Gallo, 1991; Coffin *et al.*, 1986; Liu, 1996).

1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA –1 (HIV-1)

O HIV-1 é o agente etiológico da infecção emergente mais importante das últimas décadas, causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e têm se tornado uma pandemia, ultrapassando os limites de um problema de saúde pública, com sérias implicações políticas e econômicas (Piot *et al.* , 2001).

O HIV-1 caracteriza-se por causar infecção latente em longo prazo e por produzir efeitos citopáticos em curto prazo, com envolvimento da resposta imunológica do hospedeiro, causando doença lentamente progressiva e fatal, incluindo síndromes debilitantes e degenerações do sistema nervoso central (Haase, 1986; Sharp *et al.*, 1999).

De acordo com as sequências genéticas e as propriedades sorológicas, esse vírus pode ser classificado em duas espécies: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é o mais disseminado pelo mundo, sendo o principal responsável pela pandemia da AIDS, já o HIV-2 parece ser menos patogênico e é encontrado quase que, exclusivamente, na África ocidental (Hahn *et al.*, 2000; Coffin *et al.*, 1986; Clavel *et al.*, 1986). Existem múltiplos grupos e subtipos do HIV-1, com distribuições geográficas distintas de acordo com suas origens, e é classificado em três: M (*main*), O (*outlier*) e N (*non-M, non-O*), os quais podem ser subdivididos em subtipos, além de um número crescente de formas recombinantes circulantes. O grupo M é o responsável pela maior parte das infecções no mundo e pode ser dividido em nove subtipos A-D, F-H, J e K (Gürtler *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998; Osmanov *et al.*, 2002).

A AIDS foi descrita pela primeira vez em 1981, nos EUA em um grupo de homens homossexuais que sofriam com infecções oportunistas recorrentes, e assumiu proporções alarmantes em curto período, causando impacto enorme na epidemiologia das doenças infecciosas (Dowdle, 1983; Gourevitch, 1996; Fauci, 2003). Apesar dos relatos da infecção serem relativamente recentes, análises filogenéticas estimam que o HIV-1 surgiu entre os anos de 1915 e 1941, tornando-se uma ameaça pública mundial 50 anos depois (Korber *et al.*, 2000).

Segundo o último relatório da UNAIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*) e da OMS (Organização Mundial de Saúde), apesar da AIDS ainda ser uma ameaça em todo o mundo, o número de novas infecções e de mortes ligadas à AIDS tem caído devido ao melhor acesso a medicamentos e prevenção, a quantidade de novas infecções recuou de 3 milhões em 2001 para 2,7 milhões em 2007. Atualmente, o HIV infecta cerca de 33 [30.3 -

36.1] milhões de pessoas em todo o mundo, acometendo, aproximadamente 15,4 milhões de mulheres, 17,8 milhões de homens, e causando 2 [1,8 - 2,3] milhões de morte no ano 2007. Dentre todas as regiões do planeta, a África sub-sahariana é a que apresenta um maior índice com, aproximadamente, 22 [20,5-23,6] milhões de indivíduos infectados, representando 2/3 (67%) do total de pessoas vivendo com HIV no mundo sendo a AIDS a principal causa de mortes neste continente (UNAIDS/WHO, 2007; 2008).

No Brasil, desde 1980 até junho de 2008, já foram notificados 730.000 [600.000 – 890.000] milhões de casos. Dos casos notificados até junho de 2007, 60,9% (289.074 casos) foram concentrados na região Sudeste, 18,8% (89.250 casos) na região Sul, 11,2% (53.089 casos) no Nordeste, 5,6% (26.757 casos) no Centro-Oeste e 3,4% (16.103 casos) no Norte. Apesar da redução da mortalidade devido à introdução da política de acesso universal ao tratamento antiretroviral, o impacto da Aids ainda é grande, com mais de 192 mil óbitos notificados até 2006, e com mais de 13 mil casos novos ocorrendo no primeiro semestre de 2007 (Boletim Epidemiológico Aids e DST, 2006; 2007; UNAIDS/WHO, 2008).

A disseminação da infecção causada pelo HIV-1 é consequência das trocas de fluidos corpóreos contaminados, que podem ser feitas através: das relações sexuais, do compartilhamento de agulhas, dos acidentes com materiais perfuro-cortantes contaminados, da transmissão via transplacentária e no aleitamento materno. Adicionalmente, co-fatores tais como doenças sexualmente transmissíveis e o polimorfismo de genes codificadores de receptores para o vírus, facilitam a infecção pelo HIV-1 e influenciam na progressão à AIDS. Contudo, o real efeito da heterogeneidade genética do hospedeiro na susceptibilidade à infecção, ainda, é pouco compreendido (Garred *et al.*, 2003).

1.2.1 Biologia do HIV-1

1.2.1.1 Estrutura morfológica e organização genômica

O HIV-1 é uma partícula esférica que mede, aproximadamente, 100 nm de diâmetro e apresenta, externamente, um envelope composto por uma bicamada lipídica oriunda da membrana da célula hospedeira acrescida das glicoproteínas virais gp120 e gp41 (Haseltine & Wong-Staal, 1988). Internamente ao envelope, encontra-se a matriz viral que é formada pela proteína p17. O capsídeo viral, o qual apresenta simetria cônica, é formado pela proteína p24 e

envolve duas cópias lineares de RNA genômico de fita simples, polaridade positiva e, ainda, as enzimas protease, transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e a proteína p7 de ligação ao RNA (Vaishnav & Wong-Staal, 1991). No interior do capsídeo encontram-se, ainda, as proteínas necessárias à replicação viral: p6, Vif, Vpr e Nef (Frankel & Young, 1998; Figura 1).

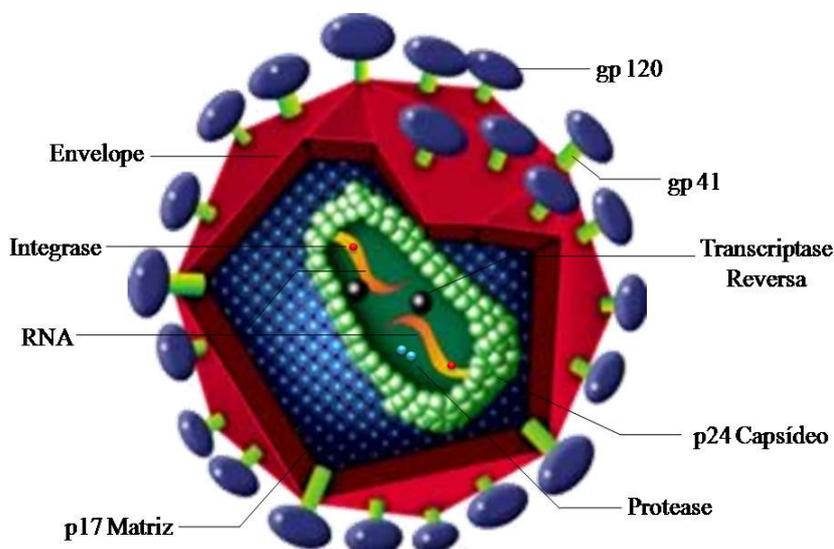


Figura 1- Representação esquemática da morfologia do HIV-1 (Adaptado de Chemistry at Wellesley College <<http://www.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/hiv/t-hiv.GIF>>).

O genoma viral do HIV-1, sequenciado em 1985 por Wain-Hobson *et al.*, é formado por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, com polaridade positiva, cada uma com, aproximadamente, 9,8 quilobases (kb) de comprimento. Contém nove genes delimitados por duas regiões terminais longas e repetitivas chamadas *LTR* (*Long Terminal Repeats*). Estes genes estão divididos em três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) comuns aos outros retrovírus e em seis genes regulatórios (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*) que codificam proteínas auxiliares, as quais são capazes de regular a replicação e a infectividade viral (Greene, 1991; Subbramanian & Cohen, 1994; Figura 2).

O gene *gag* codifica um precursor de 55 kDa (Pr55^{Gag}) que, ao ser clivado por uma protease viral durante a maturação, origina as proteínas estruturais que compõem a matriz e o

capsídeo viral, p17 e p24, as proteínas mais internas do nucleocapsídeo, p7 e p6 e dois pequenos peptídeos, p1 e p2, cuja função parece estar associada com as taxas de clivagem do precursor nos sítios específicos (Wills & Craven, 1991; Pettit *et al.*, 1994; Krausslich *et al.*, 1995; Vogt, 1997; Wiegers *et al.*, 1998). O gene *pol* codifica as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase. A protease cliva os polipeptídios precursores codificados pelos genes *gag* e pelo próprio gene *pol*; a transcriptase reversa, além de ser responsável pela replicação do RNA viral também possui ação de RNase; e a integrase é responsável pela integração do ácido nucléico viral ao genoma celular. O gene *env*, por sua vez, codifica uma poliproteína precursora de 160 kDa (gp160), a qual é clivada por proteases celulares em duas subunidades, originando as glicoproteínas de superfície gp120 e transmembrana gp41. Estas glicoproteínas superficiais são importantes no momento do contato entre a partícula viral e a célula hospedeira, pois estas ligam-se aos receptores CD4 e aos co-receptores localizados na membrana plasmática de linfócitos T auxiliares, de monócitos, de macrófagos e de células dendríticas foliculares (Frankel & Young, 1998; Weiss *et al.*, 1992).

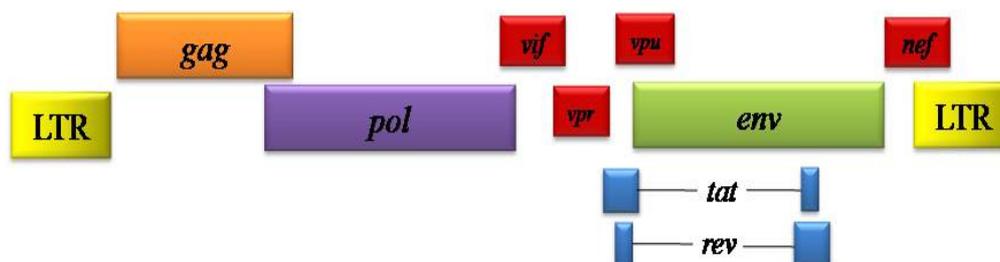


Figura 2 – Esquema representativo do genoma do HIV-1 (Adaptado de Subbramanian & Cohen, 1994).

1.2.1.2 Replicação do HIV-1

A HIV infecta células que apresentam a molécula CD4, sendo que as principais células-alvo do vírus no organismo são os linfócitos T CD4⁺. A infecção dessas células ocorre predominantemente no trato gastrintestinal, onde a maioria dos linfócitos T CD4⁺ é encontrada, além dos nódulos linfáticos, outros tecidos linfáticos e no sangue periférico (Douek *et al.*, 2002). A infecção dos macrófagos e das células dendríticas pelo HIV foi demonstrada e essas células infectadas constituem um reservatório importante do vírus (Turville *et al.*, 2002).

O ciclo viral nas células se desenvolve em quatro fases:

a) Ligação e penetração do vírus na célula (invasão celular):

A entrada do vírus se faz por um mecanismo de fusão com a membrana celular da célula hospedeira (Lifson *et al.*, 1986; Bauer *et al.*, 1987). Inicialmente ocorre a ligação da partícula viral a receptores específicos na superfície da célula alvo, a interação com o receptor é mediada pela glicoproteína de superfície, gp120, a qual se liga ao receptor CD4 com alta afinidade (Klatzmann *et al.*, 1984; Lasky *et al.*, 1987).

Entretanto, apenas a interação gp120-CD4 não é suficiente para a entrada do HIV-1 na célula alvo, necessitando ainda da interação entre o vírus e moléculas co-receptoras. Um grupo de receptores de quimiocinas, pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G, atua como co-receptores essenciais ao reconhecimento da célula alvo, entre os receptores de quimiocina, CCR5 e CXCR4 são os principais (Luster, 1998; Clapham, 1997). As duas principais classes de HIV-1, as que apresentam tropismo por células T e as que apresentam tropismo por macrófagos, diferem quanto aos co-receptores envolvidos no reconhecimento viral: os vírus que possuem tropismo por macrófagos utilizam os co-receptores β -quimiocinas CCR5, enquanto que os vírus que possuem tropismo por células T necessitam dos co-receptores α -quimiocinas CXCR4 (Berger, 1997; Chan & Kim, 1998; Klatzmann *et al.*, 1984).

A ligação da subunidade de gp120 com moléculas de CD4 induz uma mudança na conformação. que promove ligação secundária da gp120 com o co-receptor de quimiocina. A ligação do co-receptor induz uma mudança na conformação na glicoproteína gp41, que expõe

uma região hidrofóbica, chamada de peptídeo de fusão, que se insere na membrana celular e permite que a membrana do vírus se funda com a membrana da célula alvo, posteriormente ocorre a penetração do vírus e o nucleocapsídeo liberado no citoplasma (Abbas & Andrew, 2005). Sendo que o vírus pode, ainda, penetrar na célula via endocitose mediada por receptores, seguida da degradação do envelope viral (Bauer *et al.*, 1987; Figura 3).

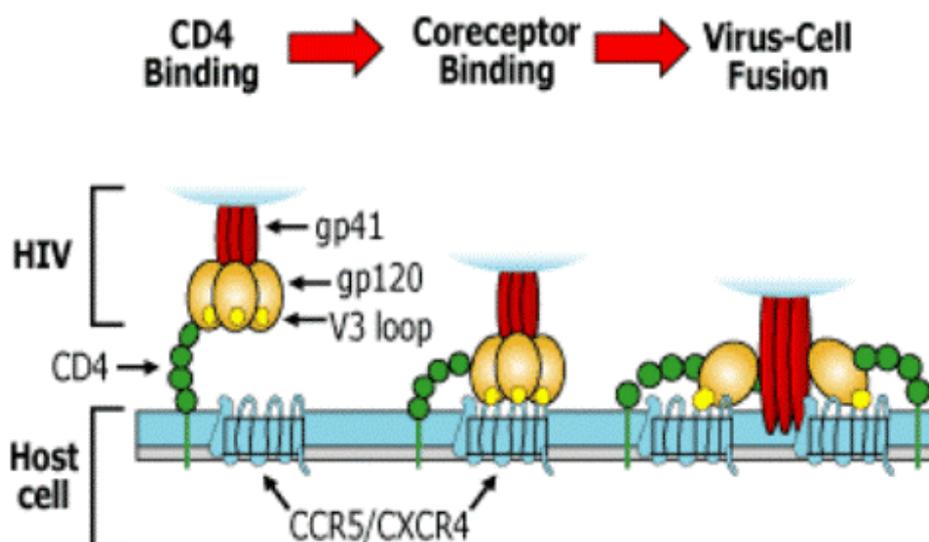


Figura 3- Mecanismo de fusão do HIV-1 à célula alvo (Adaptado Moore, 2003)

Durante a evolução da infecção pelo HIV, o tropismo viral pelas células do sistema imune apresenta modificações. Na infecção recente prevalecem, inicialmente, variantes monocitotrópicas, com capacidade de infectar células que expressam receptores CCR5 predominantes durante a fase de latência clínica. Em uma fase mais avançada, a prevalência de variantes com tropismo por receptores CXCR4, indutores de sincício, torna-se mais importante, com estimativa de progressão para a AIDS em aproximadamente 3 a 4 anos (Mayers *al.*, 1992). Isolados CXCR4 infectam tanto células ativadas como em repouso, porém a replicação não é completada em células que permanecem em repouso, com um bloqueio anterior ao estágio de importe nuclear do complexo de pré-integração. A evolução do biótipo CCR5 está associada ao desenvolvimento da AIDS. As variantes do HIV-1 que apresentam CXCR4 depletam, preferencialmente, células naive, induzindo uma deterioração imunológica mais acentuada,

enquanto que variantes CCR5 atingem em especial células de memória, com um impacto menos intenso na fisiologia do sistema imune (Mullins, 1999).

b) Transcrição reversa e replicação do genoma:

Uma vez que o vírion HIV penetrou na célula, as enzimas do complexo núcleo-capsídeo tornam-se ativas e o ciclo viral propriamente dito tem início. Nesta etapa ocorre o desnudamento e a liberação do conteúdo do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira, o que se faz necessário para a etapa seguinte: a transcrição reversa, a qual é mediada pela enzima viral transcriptase reversa (Frankel & Young, 1998). Ainda no citoplasma, esta enzima viral utiliza um RNA transportador (RNAt) presente no vírus, como indicador, ocorre a transcrição das fitas de RNA em um filamento híbrido RNA-DNA. Posteriormente, a transcriptase reversa atua como ribonuclease H degradando a fita de RNA e, a seguir, sintetiza a fita positiva de cDNA que é mantida como um complexo de nucleoproteína, a qual é transportada para o núcleo, onde pode haver integração (provírus) no genoma da célula, através da enzima integrase, podendo o provírus permanecer em um estado de latência durante meses ou anos, ou a permanência na forma circular não integrada (Panganiban & Fiore, 1988).

c) Expressão dos genes virais:

O genoma proviral integrado ao material genético da célula infectada inicia a fase tardia da replicação com a transcrição e o processamento do RNA viral. Os transcritos irão dar origem ao RNA genômico e à síntese de proteínas estruturais (Greene, 1991). Esta fase inicia-se com a ação da enzima RNA polimerase II celular, que transcreve o provírus em RNA mensageiros virais, que vão para o citoplasma. Os transcritos irão originar o RNA genômico e a síntese de proteínas da estrutura viral. As proteínas do envelope são transportadas para a membrana celular. As proteínas estruturais se reúnem no citoplasma com os RNA virais e migram para a membrana, em regiões onde há acúmulo de glicoproteínas virais, saindo da célula por brotamento. Após a liberação, a protease sofre uma autoativação, clivando as poliproteínas, de modo que a partícula viral toma a forma característica tornando-se infecciosa (Greene, 1991).

d) Maturação dos vírions:

Após a síntese do RNA viral e das proteínas virais, a próxima etapa consiste na montagem e no brotamento das partículas virais. Os vírus são, inicialmente, montados próximos à membrana celular, na forma de partículas imaturas, compostas de um envelope glicoprotéico, RNA genômico e poliproteínas virais (Wainberg *et al.*, 1988).

Após ou durante o brotamento, fase em que o vírus adquire o envelope a partir da membrana da célula do hospedeiro, as partículas passam por uma modificação morfológica conhecida como maturação, que consiste na clivagem das poliproteínas pela enzima viral protease, produzindo enzimas e proteínas do capsídeo viral, de modo que a partícula viral toma a forma característica, tornando-se infecciosa (Greene, 1991). Esses vírions tem como uma de suas características, o fato de expressarem diferentes versões do RNA viral ancestral, uma vez que as eventuais modificações introduzidas na etapa de retrotranscrição podem ser incorporadas às partículas emergentes.

1.2.2 Patogênese da infecção pelo HIV-1

As interações entre o HIV-1 e o hospedeiro humano são bastante complexas, conforme é evidenciado a variabilidade na taxa de progressão da doença observada em pacientes infectados (Liu *et al.*, 1996b). A infecção pelo HIV-1 deprime o sistema imunológico, na medida em que infecta e destrói os linfócitos T CD4⁺, os quais normalmente coordenam a resposta imune, além do aumento dos linfócitos T CD8⁺, diminuindo a relação CD4⁺/CD8⁺ (Pantaleo & Fauci, 1996).

As manifestações clínicas da infecção variam desde um estado de portador assintomático até o desenvolvimento de doenças oportunistas graves e potencialmente letais, com a AIDS como o estágio mais avançado da doença, essas manifestações podem variar de acordo com diversos fatores, como idade, gênero, genética do hospedeiro, histórico de tratamento, entre outros (Cao *et al.*, 1995; Chaisson *et al.*, 2000).

A manifestação inicial da infecção pelo HIV-1, em metade a dois terços dos indivíduos recentemente infectados, é caracterizada como uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa, chamada de síndrome retroviral aguda, descrita por Cooper e

colaboradores em 1985. Após a infecção primária, o paciente infectado pode permanecer assintomático por vários anos mas, também pode apresentar sintomas pouco específicos como linfadenopatia generalizada persistente, fadiga, febre baixa, sudorese noturna, diarreia intermitente e perda de peso (Chaisson *et al.*, 2000). Outras formas de apresentação se devem a processos imunologicamente mediados, resultantes da resposta do hospedeiro à infecção viral crônica, como linfadenopatia, trombocitopenia, polineuropatias, miopatias e complexo AIDS-demência (Navia *et al.*, 1986a; 1986b; Kurtzberg *et al.*, 1987; Fuller *et al.*, 1993; Chaisson *et al.*, 2000).

Após um período variável de tempo, a maior parte dos pacientes começa a apresentar sinais e sintomas clínicos de imunodeficiência, com manifestações variadas, sendo a maioria delas relacionada às infecções oportunistas que acometem o paciente, além de neoplasias (Chaisson *et al.*, 2000).

A progressão à AIDS, em pacientes infectados pelo HIV-1, parece estar diretamente relacionada à diminuição na contagem de células T CD4⁺ e à carga viral no plasma e nos tecidos linfóides (Graziosi *et al.*, 1998). Embora diversos fatores estejam relacionados à variabilidade na taxa de progressão da doença, a ativação do sistema imunológico é, provavelmente, o fator determinante mais importante (Bentwich *et al.*, 1998), pois além de facilitar a replicação viral, de alterar o perfil da produção de citocinas e de afetar o ciclo celular é também associado com vários graus de disfunção imune, como deficiência na resposta imunológica e apoptose, os quais aceleram à progressão da doença e diminuem a sobrevivência do paciente (Bentwich *et al.*, 1998; Fahey, 1998; Srebel & Bour, 1999; Gougeon & Montagnier, 1999; Hazenberg *et al.*, 2000).

Conforme já mencionado, pode haver uma variação considerável no tempo de progressão da doença, com alguns indivíduos progredindo em menos de dois anos, enquanto outros, chamados de progressores lentos (*long-term non-progressors*), podem permanecer assintomáticos e sem alterações imunológicas por muitos anos, com pelo menos oito anos de infecção sem nenhuma alteração imunológica (Cao *et al.*, 1985; Phair *et al.*, 1992; Sheppard *et al.*, 1993).

Desde o começo da epidemia da AIDS, tem sido observadas diferenças significativas na taxa de progressão da doença, havendo evidências fortes sugerindo uma resistência natural para a infecção em vários indivíduos que permaneceram não afetados, apesar do fato de terem tido várias exposições ao HIV, particularmente por relações sexuais (Paxton *et al.*, 1996).

A associação do HIV-1 a um tipo específico de receptores indica não apenas o tropismo para um determinado tipo celular, mas também tem servido como um indicador confiável de maior ou menor susceptibilidade genética do hospedeiro ao HIV. A presença de determinadas mutações nos genes dos receptores de alfa e beta-quimiocinas são fatores que determinam a transmissão do vírus e a progressão para o quadro de SIDA/AIDS (Kuritzkes, 2000).

1.3 O RECEPTOR CC-QUIMIOCINA 5 (CCR5)

1.3.1 Histórico

Samson *et al.* (1996) identificaram um novo gene humano e sua expressão funcional, este gene foi chamado ChemR13, ele é um membro da crescente família de receptores de quimiocinas que estão envolvidos no recrutamento das células nos processos inflamatório e imune. Sendo o quinto receptor identificado de sua classe, este novo receptor de CC-quimiocina foi designado como CCR5. Combadiere *et al.*, (1996) clonaram o cDNA humano do CCR5, que possui 48-74% de aminoácidos idênticos aos outros CCRs, este trabalho sugeriu que o CCR5 é um receptor acoplado à proteína G e serve de mediador, para a resposta dos monócitos, a RANTES, MIP-1 β e MIP-1 α .

No mesmo ano quatro trabalhos independentes identificaram o principal co-receptor para o HIV-1. Estes trabalhos sugeriram que a entrada do vírus na célula hospedeira está condicionada à presença da molécula CD4 e de um co-fator e indicaram que o CCR5 e o CD4 juntos funcionam cooperativamente como mediadores para a entrada do vírus nos macrófagos, facilitando a infecção pelo HIV-1 (Deng *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996; Doranz *et al.* 1996).

Também em 1996, três grupos trabalhando independentemente chegaram à mesma conclusão, que uma supressão de 32-pb do receptor CCR5 parecia ter a capacidade de conferir proteção contra a transmissão do HIV-1 (Dean, 1996; Liu, 1996; Samson, 1996).

Com base na distribuição geográfica do alelo-CCR5 Δ 32, bem como sobre a variação intrahaplótipo usando microsatélites altamente polimórficos, estima-se que a deleção de 32-pb ocorreu, aproximadamente, 1.000 anos atrás no Nordeste Europeu (Libert *et al.*, 1998).

1.3.2 Receptores de quimiocinas

Citocinas são proteínas de peso molecular relativamente baixo e, freqüentemente, 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 quimiotáticos para tipos celulares específicos e recebem a denominação de “quimiocinas” (Abbas & Andrew 2005).

Quimiocinas são peptídeos com 70-120 resíduos de aminoácidos, que mediam uma gama de efeitos pró-inflamatórias em leucócitos, como quimiotaxia, degranulação e ativação de integrinas (Miller & Krangel, 1992; Baggiolini *et al.*, 1994). Todas essas moléculas contêm duas alças internas ligadas por pontes dissulfeto e são classificadas em subfamílias de acordo com o número e a localização dos resíduos de cisteína N- terminal que participam da ligação de dissulfeto. Duas destas famílias são consideradas as principais, CXC (α -quimiocina) e CC (β -quimiocina). A família CXC atua, principalmente, sobre os neutrófilos, é composta por um par de Cys separados por um único resíduo e os membros mais importantes dessa classe são a interleucina-8 (IL-8), o derivado do estroma fator-1 (SDF-1), o interferon-g proteína-induzida-10 (IP-10), o fator de plaquetas-4 (PF-4), a proteína de ativação de neutrófilos-2 (PNA-2) e o crescimento de melanoma estimular a atividade (MGSA). A família CC age, principalmente, sobre os monócitos, linfócitos e eosinófilos, é constituída por duas Cys adjacentes e inclui proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1a, MIP-1b), regulamentada a ativação de linfócitos T normais expressos e secretada (RANTES), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (Baggiolini *et al.*, 1994; Luster, 1998; Hasegawa *et al.*, 2001).

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 HIV-1. As quimiocinas exercem sua função fisiológica através da ligação e ativação dos receptores de membrana celular. 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 & Fujita, 2001).

Os receptores de quimiocinas são proteínas unicatnárias. Cruzam a membrana celular sete vezes e pertencem a uma família de receptores acoplados a proteínas G. Essas proteínas têm quatro domínios expostos na superfície celular: o N-terminal e três alças extracelulares (E1, E2 e E3). 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, 1996; Premak & Schall, 1996; McNicholl *et al.*, 1997).

1.3.3 O co-receptor CCR5

O receptor CCR5 é uma proteína de 40,6 kDa com 352 resíduos aminoácidos (Samson, 1996). O receptor CCR5 possui uma estrutura com sete domínios transmembrânicos α -helicoidais, acoplados a proteínas triméricas (proteína G) de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP) e é expressa em leucócitos (Luster, 1998). Quatro cisteínas, normalmente presentes no primeiro e no segundo *loop* extracelular dos receptores de proteína G-acoplado são contidos com a proteína CCR5. O C-terminal é rico em resíduos de serina e de treonina, fazendo com que o C-terminal seja um local potencial para fosforilação por proteína cinases G- receptores acoplados (Samson, 1996; Figura 4).

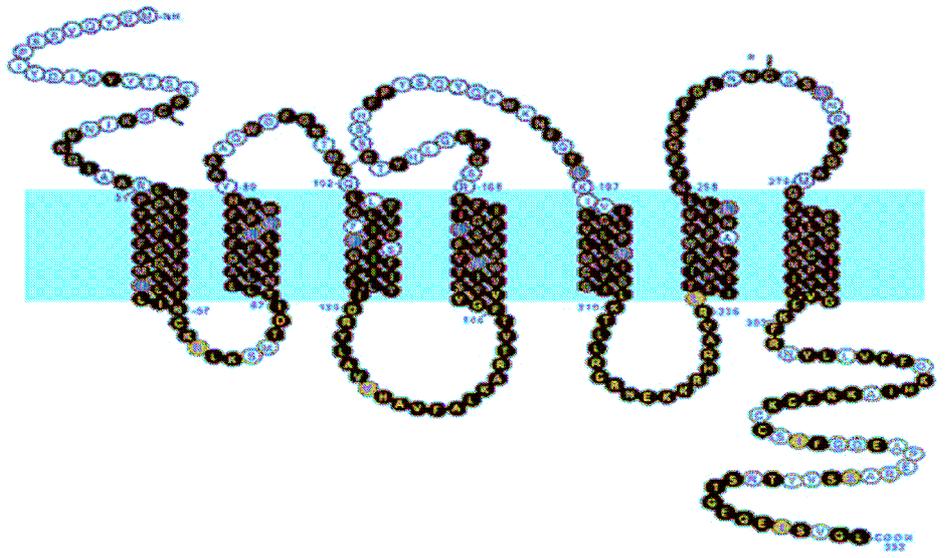


Figura 4- Estrutura e sequência de aminoácidos da molécula CCR5, com os sete domínios transmembrana, três *loops* intracelulares e três *loops* extracelulares (McNicholl *et al.*, 1997).

O receptor CCR5 liga-se a quimiocinas, macrófagos inflamatórios proteína 1a (MIP-1a), macrófagos inflamatórios proteína 1b (MIP-1b), regulamenta a ativação de células T normais expressas e secretadas (RANTES) e também é ligante para as glicoproteínas do envelope do HIV-1 (M-trópico) (Samson, 1996; Raport, 1996; Figura 5).

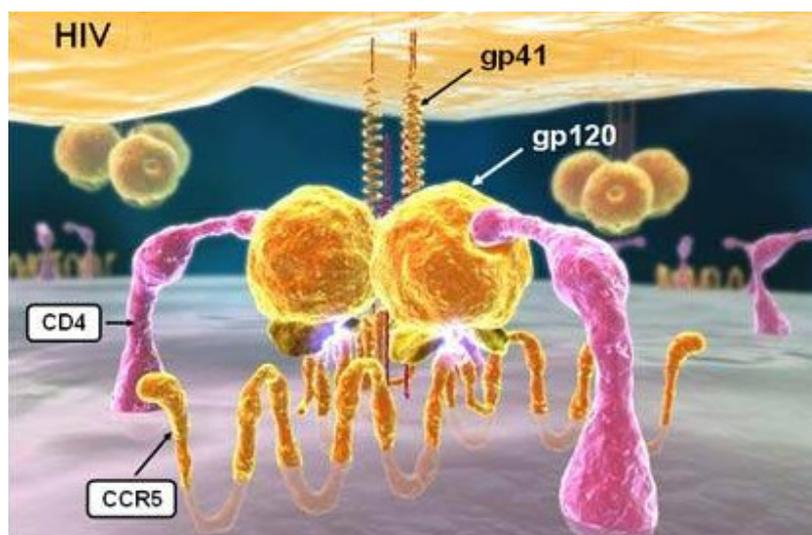


Figura 5- Representação do receptor CD4, das glicoproteínas do HIV-1 e do co-receptor CCR5 (disponível / www.bbc.co.uk/.../drive/galleries/1679/1/).

As primeiras tentativas de identificar os determinantes da função de co-receptor CCR5 se basearam na utilização de quimera, que inclui os segmentos de CCR5 e afins, tais como receptores de quimiocinas CCR5 murino ou CCR2b, que não medeiam a fusão e entrada do HIV-1. Múltiplos domínios da proteína CCR5, direta ou indiretamente, contribuem para a sua atividade de co-receptor, o domínio amino-terminal (NT) desempenha um papel privilegiado na fusão do vírus e na entrada. O CCR5 medeia sinalização intracelular, entretanto a endocitose não é necessária para a sua atividade de co-receptores em linhagens de células, mas podem desempenhar um papel *in vivo* (Doranz *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1997; Picard *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998).

Estudos de mutagênese Point forneceram uma visão mais clara dos determinantes da função de co-receptor CCR5. Foi demonstrado que a carga negativa e os resíduos de tirosina no NT CCR5 (ASP-2, Tyr-3, Tyr-10, Asp-11, Tyr-14, Tyr-15, Glu-18) são importantes para a interação do CD4 e da gp120, para a ligação do CCR5 e para a entrada de vírus (Doranz *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996).

O co-receptor CCR5 presente na superfície que se liga à gp120 tem um núcleo hidrofóbico cercado por uma periferia com carga positiva e é composto de duas variáveis conservadas e de resíduos (Kwong *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 1998). A interação gp120/co-receptor resulta em alterações conformacionais na trímero gp120/gp41 que provocam a inserção do peptídeo de fusão gp41 na membrana plasmática (Weissenhorn *et al.*, 1997).

A entrada de diferentes cepas do HIV-1 na célula apresenta exigências diferentes para domínios extracelulares. O CCR5 existe em vários estados conformacionais em equilíbrio, com um ou mais estados conformacionais favorecendo a interação com o HIV-1 (Lee *et al.*, 1999). Uma mutação pode reduzir os estados conformacionais que interagem com o HIV-1, o que poderia ser superado pela superexpressão do CCR5 mutante. Outros receptores de quimiocinas poderiam atuar como co-receptores, mas são incapazes de alcançar um estado conformacional favorecendo a interação com o HIV-1. No entanto, as mutações podem deslocar o equilíbrio em favor dos estados conformacionais que não interagem com o HIV-1. Na ausência de agonistas em uma conformação inativa é favorecido por um ativo, que é normalmente indetectável, embora facilmente revelado em células sobre-expressão do receptor (Akhter *et al.*, 1997). Além disso, as

mutações artificiais ou naturais em diferentes domínios da proteína G-acoplada receptores deslocam o equilíbrio em favor da conformação ativa, muitas vezes levando a condições patológicas (Rao & Oprian, 1996). Da mesma forma, indivíduos portadores de mutações naturais do CCR5 apresentam diferentes graus de susceptibilidade ao HIV-1 (Carrington *et al.*, 1997).

1.3.4 O gene *ccr5*

O receptor CCR5 é uma proteína de 40,6 kDa com 352 resíduos aminoácidos codificada pelo gene *cmkbr5*, que está localizada na região p21.3 do cromossomo 3 humano (Samson, 1996).

O gene que codifica o CCR5 está organizado em quatro éxons e dois íntrons. Os transcritos parecem iniciar a partir de dois promotores distintos. Um promotor está situado próximo ao éxon 1 na extremidade 5' (Pu) e o outro promotor está situado próximo ao éxon 4 na extremidade 3' (Pd). O promotor Pu é um promotor fraco enquanto que o promotor Pd é um promotor forte. As sequências promotoras (Pu e Pd) têm duas importantes características. Primeiro, a região Pu tem sequência homóloga à região 3'UTR. O significado disto não está claro. Segundo, é característico de diversos receptores acoplados à proteína G, que nem Pu nem Pd têm 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; Figura 6.)

O CCR5 é expresso em diversos tecidos humanos, em maiores proporções no timo e no baço, com níveis médios de leucócitos no sangue periférico e do intestino delgado, e em níveis baixos no ovário e no pulmão. O CCR5, também é expresso em linhagens de células hematopoéticas e em linfócitos T.

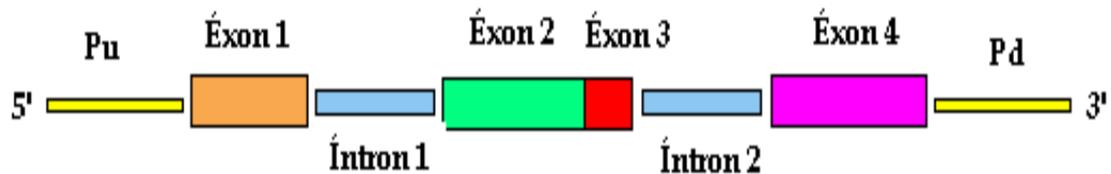


Figura 6- Esquema representativo do gene *ccr5* (Adaptado de Mummidi *et al.*, 1997).

1.3.5 Distribuição global do alelo *ccr5* $\Delta 32$

O alelo *ccr5* $\Delta 32$ é mais comumente encontrado em populações europeias (frequência média de 10%), muito embora seja observada uma considerável variação na distribuição de frequências da mutação. De modo geral, as populações do sul da Europa e região do Mediterrâneo apresentam frequências menores que as observadas no norte do continente. O alelo CCR5 Δ 32 também tem sido encontrado em populações do Oriente Médio e do continente indiano com frequências variando entre 2 a 5%, mas é raro ou ausente em outras populações asiáticas, na África, na Oceania e em populações nativas das Américas (Martinson *et al.*, 1997; Figura 7).

Estudos sugerem que o surgimento e o rápido aumento na frequência desta mutação em populações caucasianas estão de acordo com a história de fortes eventos seletivos, por exemplo, surtos de doenças infecto-contagiosas mediadas por agentes que utilizam o CCR5 como o HIV-1. 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, influenza e varíola também são candidatas, a última em maior intensidade, uma vez que essas doenças dizimaram milhões de indivíduos durante o milênio passado (Stephens *et al.*, 1998; Carrington, 1997; Galvani & Novembre, 2005).

Em populações do Norte do Brasil, amostras de diferentes composições étnicas têm sido investigadas, incluindo indivíduos da população de Belém, indígenas das tribos Yanomami,

Kaiapó (Xikrin do Bacajá), Awá-Guajá, Zoé, (Parakanã e Tiriyo), japoneses, e descendentes de escravos africanos. A mutação CCR5 Δ 32 não foi encontrada entre os indígenas, e apresentou frequências muito baixas em japoneses e em negros. Por outro lado, heterozigotos CCR5/ CCR5-delta32 e homozigotos CCR5-delta32 / CCR5-delta32 foram identificados na amostra da população de Belém, correspondendo a uma frequência de 4,2% para o gene CCR5-delta32 (Carvalhoes, 1999, 2000).

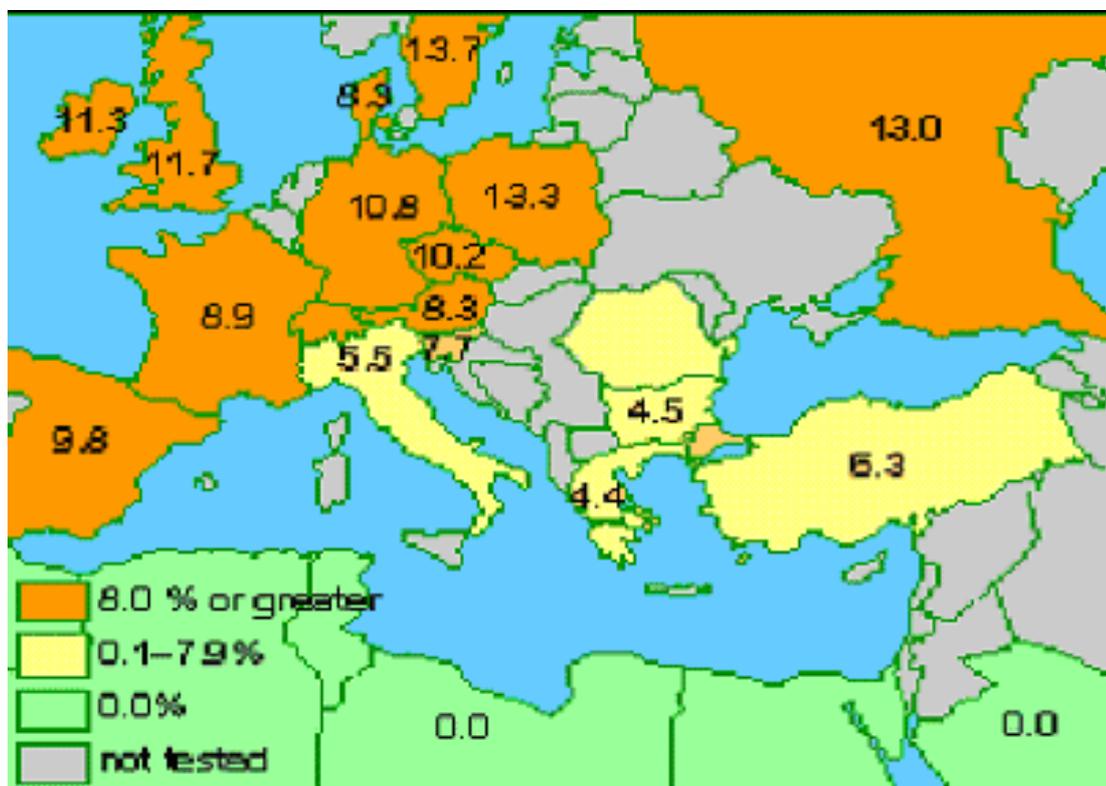


Figura 7-Mapa da distribuição mundial do alelo CCR5 Δ 32 (Adaptado de Carl Zimmer *Evolution: The Triumph of an Idea*, , © 2001, Harper Collins Publish < www.evolution.berkeley.edu/.../IA2HIV2.shtml).

1.3.6 Polimorfismos e impacto na infecção pelo HIV-1

Vinte diferentes mutações já foram relatadas no gene *cmkbr5*, dezesseis das quais (80%) são de "código-alterando". Dezessete das vinte mutações são mutações pontuais, com onze sendo transversões e seis sendo transições. Entre os outros três alelos mutantes há um único par de bases em supressão, a eliminação trinucleotídea, e a supressão de 32 pares de base - CCR5 Δ 32 (Ansari-Lari *et al.*, 1997; Carrington *et al.*, 1997; Figura 8).

A mutação CCR5 Δ 32 causa um "frame-shift" no aminoácido 185, o que provoca uma terminação prematura na transcrição. A proteína codificada por esse alelo mutante não possui os últimos 3 segmentos transmembranas do receptor, desta forma impedindo a fusão do receptor com a membrana celular e, conseqüentemente, a exposição da membrana (Samson, 1996; Liu, 1996).

A herança dos padrões do alelo CCR5 Δ 32 é coerente com genética Mendeliana (Liu, 1996; Lucotte, 1997; O' Brien, 1997). Indivíduos homocigotos para o alelo mutante são saudáveis e aparentemente não sofrem de alterações imunológicas (Libert, 1998; Liu, 1996; Zimmerman, 1997). Foi proposto que receptores homólogos de quimiocina, que ligam um conjunto de sobreposição, podem compensar a deficiência de um único receptor de quimiocina, resultando na ausência de um fenótipo observável (Liu, 1996; Premack & Schall 1996).

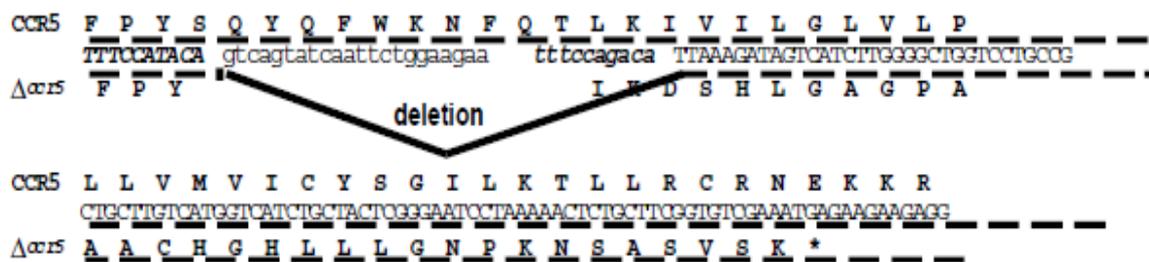


Figura 8- Gene CCR5 parcial e sequência de aminoácidos com eliminação de 32 pb (Adaptado de McNicholl, 1997).

Já em 1986, coortes que estudaram HIV-1 e AIDS, envolvendo indivíduos de alto risco para contrair a infecção, revelaram que algumas pessoas, apesar das repetidas exposições, falharam em contrair o HIV (Burger, 1986; Dean *et al.*, 1996; Detels, 1994; Huang, 1996; Liu, 1996; Michael, 1997; Paxton *et al.*, 1996; Samson, 1996b; Zimmerman, 1997). Estudos

anteriores não foram capazes de fornecer uma explicação adequada para este fenômeno observado (Burger, 1986; Detels, 1994). Uma explicação não apareceu até 1996, quando três grupos trabalhando independentemente, chegaram à mesma conclusão, que uma deleção de 32-pb do receptor CCR5 conferia proteção contra a transmissão (Dean *et al.*, 1996; Liu, 1996; Samson, 1996). Estes estudos relataram a ausência de Δ CCR5 homozigóticos entre os indivíduos infectados, uma significativa elevação da frequência Δ CCR5 homozigóticos entre os indivíduos expostos, não infectados e, *in vitro*, provas de resistência contra a infecção (Dean, 1996; Liu, 1996; Samson, 1996).

A mutação CCR5 Δ 32 em homozigose pode reduzir o risco de infecção pelo HIV, não tendo sido observado qualquer problema de saúde nestes indivíduos, o que sugere que a função normal do receptor CCR5 é dispensável, talvez por ser compensada pela função de outro receptor de quimiocinas com uma distribuição leucocitária semelhante (Benkirane *et al.*, 1997). Confirmando esta hipótese de que o HIV-1 utiliza outros co-receptores além do CCR5, Connor *et al.*, (1996), encontraram que, em pacientes com a doença progredida, o vírus expande seus co-receptores incluindo CCR3, CCR2 e a fusina e que o surgimento de variantes utilizando a fusina como co-receptor está associado ao “*start*” do fenótipo NSI para SI, perda de sensibilidade às quimiocinas e ao decréscimo na contagem de CD⁺. Isto sugere que o HIV-1 evolui durante o curso da infecção para usar uma variedade de co-receptores e que esta adaptação está associada à progressão para a AIDS.

O efeito protetor contra a infecção desta mutação em heterozigose parece ser nulo, porém, alguns estudos realizados com cortes de indivíduos infectados por HIV-1 indicam que o alelo *ccr5* Δ 32 em heterozigotos está associado a uma mais lenta progressão para o estado de SIDA. Estes estudos mostraram que nos primeiros sete anos da infecção pelo HIV-1 há uma diferença significativamente estatística em relação à progressão da SIDA, porém depois de 11 ou mais anos não há diferença que possa ser detectada entre os heterozigotos para o delta 32 em relação aos homozigotos normais. Portanto ficou postulado que, devido a presença de um alelo delta 32, há uma redução no número de co-receptores CCR5, o que leva a uma redução da infecção pelo HIV-1, e que esse efeito de proteção pode ser perdido com o tempo, pois o vírus pode ser capaz de usar outros co-receptores além do CCR5 para se ligar e fundir-se a célula (Bratt, 1998; Dean *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Eugen-Olsen *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1997;

Liu, 1996;; Michael, 1997; Paxton *et al.*, 1996; Rappaport, 1997; Samson, 1996; Zimmerman, 1997; Benkirane *et al.*, 1997).

Segundo Hoffman & Doms (1998), a demora na progressão da infecção pelo HIV-1 presente nos heterozigotos pode ser devido aos baixos níveis de CCR5 na superfície celular, ao aumento da secreção de β -quimiocinas, ou a ambos. E ainda, que é importante descobrir porque as viroses nestes indivíduos não se desenvolvem mais rapidamente para usar receptores alternativos, como o CXCR4.

1.4 USO TERAPÊUTICO DO CCR5

A identificação dos co-receptores do HIV tem proporcionado uma nova oportunidade terapêutica. O CCR5 é um excelente alvo para a terapia uma vez que indivíduos homozigotos para a deleção de 32 pb possuem menor risco de infecção pelo HIV. Antagonistas de CCR5 que especificamente, atacam e bloqueiam sua atividade do receptor natural deve ser seguro. Além disso, os antagonistas do CCR5 podem ser inibidores potentes da replicação do vírus R5 *in vitro*.

Simmons *et al.*, (1997) relataram que uma forma de RANTES no N-terminal (amino-oxipentano-RANTES, AOP-RANTES) inibiu a infecção por cepas de HIV R5. A potência da AOP-RANTES foi devido à sua capacidade de induzir a interiorização do CCR5 e à retenção em endosomes, uma propriedade que, efetivamente, remove CCR5 da superfície celular (Mack *et al.*, 1998). Pequenas moléculas orgânicas (kDa 800-1000) que são baratas para fabricar e podem ser tomadas por via oral são as melhores opções para direcionar co-receptores. Essas pequenas moléculas têm sido usadas com sucesso para receptores-alvo 7TM para o tratamento de diversas doenças, como asma (Kelloway, 1997).

Outros estudos também relatam o sucesso de antagonistas do CCR5 como potentes inibidores de replicação de cepas R5 (Baba *et al.*, 1999; Strizki *et al.*, 2001; Masaki *et al.*, 2007).

Recentemente Hutter *et al.*, (2009) publicaram resultados promissores envolvendo a mutação no alelo *ccr5* e potenciais implicações e perspectivas futuras de tratamento com células-tronco específicas, para indivíduos infectados pelo HIV. Este estudo envolvia um paciente HIV positivo com leucemia mielóide aguda, que após receber transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (alloHSCT) de um antígeno leucocitário humano (HLA), proveniente de um doador homozigoto mutante para o gene CCR5, obteve controle, a longo prazo, do HIV-1 e parou a replicação viral por mais de 27 meses sem terapia.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Caracterização molecular de polimorfismo no gene *ccr5* em indivíduos portadores do *Vírus da imunodeficiência humana-1*.

1.5.2 Objetivos específicos

- (i) Determinar a frequência do polimorfismo $\Delta 32$ no gene *ccr5* em indivíduos portadores do HIV-1;
- (ii) Determinar a frequência do polimorfismo $\Delta 32$ no gene *ccr5* em uma população controle, que está exposta ao contato com portadores do HIV-1 e/ou com SIDA/AIDS;
- (iii) Investigar a correlação entre polimorfismo $\Delta 32$ no gene *ccr5* e os níveis de contagem de linfócitos T CD4⁺ e de carga viral no grupo de portadores do HIV-1.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

2.1.1 Indivíduos soropositivos para HIV-1

No presente estudo foram avaliados 330 indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV-1 e/ou com SIDA/AIDS, maiores de 18 anos, de ambos os gêneros, residentes no Estado do Pará, atendidos na Unidade de Referência para Doenças Infecciosas e Parasitárias Especiais (URE-DIPE), órgão pertencente à Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Pará, em Belém-PA. As amostras de sangue foram obtidas em um sistema de colheita a vácuo, em tubos de 5 mL contendo EDTA como anticoagulante, para a obtenção de plasma e de massa celular. Todos os indivíduos foram informados sobre o projeto e os que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará onde foi processada a separação do plasma e massa celular por centrifugação a 4000 r.p.m. por 5 minutos e estocada a -20°C até o momento da realização de testes de contagem de linfócitos T CD4^{+} , T CD8^{+} e de carga viral plasmática, como parte integrante da Rede Nacional de Contagem de Células CD4^{+} e da Rede Nacional de Carga Viral Plasmática, do Ministério da Saúde e caracterização do polimorfismo genético.

2.1.2 Indivíduos soronegativos de alto risco para o HIV-1

Foram coletadas 100 amostras de sangue total, de mulheres profissionais do sexo, maiores de 18 anos, na cidade de Belém-PA, para compor o grupo controle de alto risco. No momento da coleta todas foram orientadas acerca dos objetivos do trabalho e, após leitura e explicações das finalidades do mesmo, as que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento e responderam a um questionário epidemiológico comprovando a característica de ser um grupo de alto risco. As amostras de plasma e porção celular foram separadas e congeladas a -20°C no Laboratório de Virologia até o momento de uso.

2.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O HIV-1/2

Os indivíduos que constituíram o grupo controle tiveram suas amostras de plasma testadas para a presença de anticorpos anti-HIV-1/2, através de um ensaio imunoenzimático (*Ortho-Clinical Diagnostic Inc., Rochester, USA*), sendo excluídos deste grupo os indivíduos que apresentaram positividade.

2.3 DETERMINAÇÃO DE CARGA VIRAL PLASMÁTICA DO HIV-1

A determinação de carga viral plasmática foi efetuada seguindo metodologia padrão da Rede Nacional de Carga Viral do Ministério da Saúde que obedece a tecnologia *branched DNA system* (b-DNA) utilizando o kit *Versant® HIV-1 RNA 3.0 Assay bDNA* (*Bayer Corporation, Massachusetts, USA*), através do equipamento de leitura *System 340 bDNA Analyzer* (*Siemens, Deerfield, USA*).

2.4 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺

O nível de linfócitos T CD4⁺ foi determinado por citometria de fluxo (*BD FACScount™*, *Becton & Dickinson*) padrão da Rede Nacional de CD4⁺ do Ministério da Saúde, usando o kit de monitoramento da *FACSCount™ Reagents*, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (*Becton & Dickinson, San Jose, USA*).

2.5 DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *ccr5*

2.5.1 Extração do DNA

Foi utilizado o método de extração de DNA total a partir de células mononucleadas do sangue periférico dos pacientes portadores do HIV-1, de acordo com o protocolo do método Fenol-Clorofórmio. O procedimento ocorreu seguindo-se as etapas: Lise de hemácias (**Solução A:** Cloreto de Amônio [1.0M], EDTA [1.0M], H₂O destilada; **Solução B:** Bicarbonato de Amônio, [1.0M], H₂O destilada); Lise de leucócitos (Tris-HCl [100mM], EDTA [20mM], NaCl [200mM], SDS 0,5 %, H₂O destilada); Precipitação de proteínas (Acetato de Amônio [7,5M], H₂O destilada) e Precipitação e Hidratação do DNA (H₂O destilada livre de DNase e Rnase).

2.5.2 Determinação do polimorfismo CCR5 Δ 32

No presente trabalho foi utilizada a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) para a amplificação do gene *ccr5* a partir do DNA de indivíduos infectados e da população controle. As amplificações foram realizadas no equipamento termo-ciclador da Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk CT. Amostras de DNA foram testadas para a presença da deleção de 32-bp por meio da amplificação da sequência do gene CCR5 usando os seguintes iniciadores: 5'GTCTTCATTACACCTGCAGCTCT-3' (sense) e 5'-CACAGCCCTGTGCCTCTT-3' (antisense).

O resultado do produto da PCR (189 pb para o tipo selvagem CCR5 e 157 pb para o alelo Δ 32) foi visualizado após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque– TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 μ L de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

2.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O cálculo das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo no gene CCR5 Δ 32 observados nos grupos controle e de infectados foi efetuado por meio de contagem direta.

Foi utilizado o Teste Exato de Fisher para verificar se existe diferença entre o perfil genético das populações infectada pelo HIV-1 e controle. O teste T foi empregado para avaliar a relação existente entre o perfil genético de β -quimiocinas CCR5 e os níveis de contagem de linfócitos T CD4⁺ e de carga viral no grupo de portadores do HIV-1. Os testes estatísticos e o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados por meio do programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2008) e os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS

Foi investigado o perfil genético de 330 indivíduos (194 homens e 136 mulheres) portadores do HIV-1 atendidos na URE-DIPE e de 100 profissionais do sexo, com média de idade de 33,5 anos variando de 15 a 71 anos, que compõe a população controle de alto risco deste estudo.

Os padrões de bandas que puderam ser visualizados foram os seguintes: sem alelos *CCR5* mutados - uma única banda com 189 pb (homozigótico selvagem_ *ccr5* / *ccr5*); heterozigótico para a mutação $\Delta 32$ - duas bandas uma com 189 pb e outra com 157 pb (*ccr5* / *ccr5* $\Delta 32$; Figura 9).

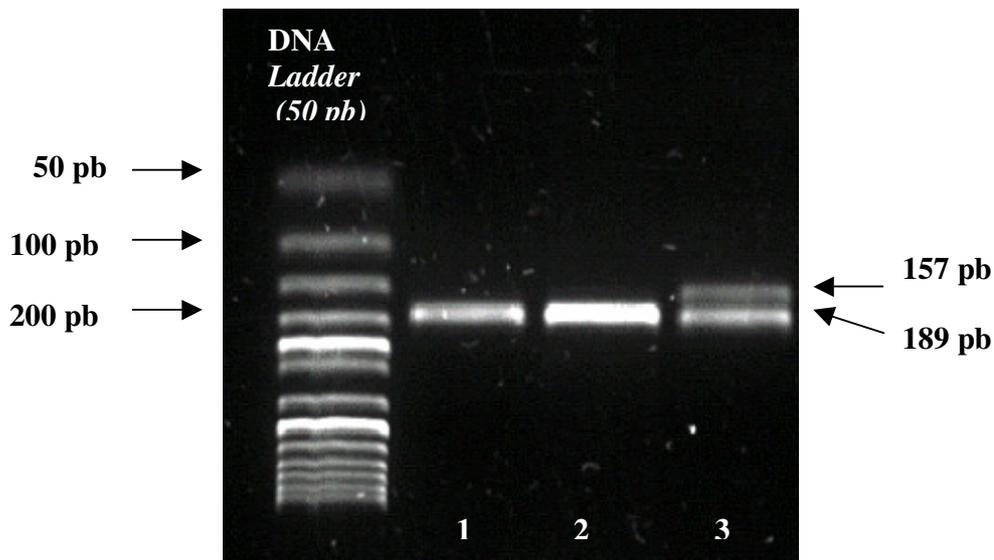


Figura 9- Gel de agarose a 3% com identificação de duas combinações alélicas possíveis para o gene *ccr5* (homozigoto selvagem_ *ccr5* / *ccr5*: 1 e 2; heterozigoto_ *ccr5* / *ccr5* $\Delta 32$: 3).

Na população HIV-1 positiva foi detectado a presença de 13 indivíduos heterozigotos para a mutação $\Delta 32$ (*ccr5* / *ccr5* $\Delta 32$), representando uma frequência de 4%, e não foi evidenciada a presença de homozigotos para a mutação (*ccr5* $\Delta 32$ / *ccr5* $\Delta 32$). Os demais 317 pacientes foram homozigotos para o alelo selvagem. Neste mesmo grupo, a frequência do alelo mutante foi de 0,02 (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuições alélica e genotípica do gene *ccr5* nos grupos investigados

Perfil Genético	HIV-1	Controle	<i>p</i>
Genótipos			
<i>ccr5 / ccr5</i>	317 (0,96)	92 (0,92)	
<i>ccr5 / ccr5Δ32</i>	13 (0,04)	08 (0,08)	
<i>ccr5Δ.32 / ccr5.Δ32</i>	00 (0,00)	00 (0,00)	
Total	330	100	0,187
Alelos			
<i>ccr5</i>	0,98	0,96	
<i>ccr5Δ.32</i>	0,02	0,04	1,000

No grupo controle de alto risco foram detectados 8 indivíduos heterozigotos para a mutação $\Delta 32$ (*ccr5 / ccr5Δ32*), representando uma frequência de 8%, e não foi detectada nenhuma em homozigose para a mutação. A frequência do alelo mutante neste grupo foi de 0,04 (Tabela 1).

As distribuições dos genótipos foram consistentes com as expectativas de Hardy-Weinberg, em ambos os grupos, sendo que não foi observada diferença estatística no perfil genético entre a população infectada e a população controle em estudo, de acordo com o Teste Exato de Fisher (Tabela1).

A relação entre o número médio de linfócitos T CD4⁺ e os genótipos do gene *ccr5* encontrados no grupo HIV-1 positivo, está descrita na Tabela 2. Foi calculada a média aritmética dos níveis de linfócitos de acordo com os genótipos encontrados e observou-se uma média de 372,76 células T CD4⁺/mL ($\log_{10} = 2,57$) de sangue nos 13 indivíduos que apresentaram o genótipo heterozigoto (*ccr5 / ccr5Δ32*) e uma média de 452,52 células T CD4⁺/mL ($\log_{10} = 2,65$) nos 317 indivíduos que apresentaram o genótipo homozigoto selvagem (*ccr5 / ccr5*). A análise estatística entre os dois grupos mostrou que não houve diferenças significantes entre as quantificações e os genótipos (Tabela 2).

Tabela 2- Polimorfismo no gene *ccr5* e quantificação de células T CD4⁺ nos indivíduos HIV positivos.

Grupos	n	Média (TCD4 ⁺ /mL)	Log ₁₀	Teste T	
				t	p
(<i>ccr5</i> / <i>ccr5</i> Δ32)	13	372,76	2,57	0,8681	0,3870
(<i>ccr5</i> / <i>ccr5</i>)	317	452,52	2,65		

A análise da associação entre os valores de carga viral e o polimorfismo também foi efetuada a partir da média aritmética dos valores de carga viral entre os dois genótipos encontrados. Observou-se que os 13 indivíduos que apresentaram o genótipo heterozigoto (*ccr5* / *ccr5*Δ32) obtiveram uma média aritmética de 35.157 cópias/mm³ (log₁₀ = 4,54) e 25.615 cópias/mm³ (log₁₀ = 4,40) nos indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem (*ccr5* / *ccr5*). A análise estatística entre os dois grupos mostrou que não houve diferenças significantes entre as quantificações e os genótipos (Tabela 3).

Tabela 3- Polimorfismo no gene *ccr5* e quantificação da carga viral nos indivíduos HIV positivos.

Grupos	n	Média (cópias RNA/mm ³)	Log ₁₀	Teste T	
				t	p
(<i>ccr5</i> / <i>ccr5</i> Δ32)	13	35.1157	4,54	0,3721	0,7105
(<i>ccr5</i> / <i>ccr5</i>)	317	25.615	4,40		

De acordo com as informações obtidas nos questionários epidemiológicos, dos 13 indivíduos portadores do HIV-1 com a mutação CCR5 Δ32, observou-se que 6 são do gênero feminino e 7 do gênero masculino, 9 relataram fazer terapia anti-retroviral e 4 relataram nunca terem feito terapia ARVe todos estavam infectados a mais de 2 anos tendo feito, recentemente, a contagem de LTCD4⁺ e de carga viral plasmática (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da contagem de LTCD4⁺, de carga viral, tempo de terapia ARV e tempo de infecção dos portadores do HIV-1 que possuem mutação CCR5 Δ32 em heterozigose.

Portadores do HIV-1 com mutação em heterozigose	L.T. CD4⁺ (células/μL)	CARGA VIRAL (cópias/mL)	Tempo de terapia ARV(anos)	Tempo de infectado (anos)
Mulher 01	486	< 50	4,5	6
Mulher 02	766	71	4	4
Mulher 03	365	139	2	3
Mulher 04	341	< 50	2	2,5
Mulher 05	749	< 50	3	3
Mulher 06	127	11.650	Não faz	8
Homem 01	255	178.198	Não faz	3
Homem 02	245	168.449	Não faz	3
Homem 03	374	226	Não faz	20
Homem 04	330	92.418	1 mês	2
Homem 05	554	< 50	9	9
Homem 06	217	< 50	9	10
Homem 07	37	5644	9	10

4. DISCUSSÃO

A entrada do HIV-1 na célula se faz por mecanismo de fusão com a membrana celular, através da interação da glicoproteína de superfície gp120 com o receptor CD4 (Lifson *et al.*, 1986; Bauer *et al.*, 1987; Klatzmann *et al.*, 1984; Lasky *et al.*, 1987).

Entretanto, apenas a interação gp120-CD4 não é suficiente para a entrada do HIV-1 na célula alvo, necessitando, ainda, da interação entre o vírus e moléculas co-receptoras. Um grupo de receptores de quimiocinas, pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G, atua como co-receptores essenciais ao reconhecimento da célula alvo, entre os receptores de quimiocina, CCR5 e CXCR4 são os principais (Luster, 1998; Clapham, 1997).

Uma deleção de 32 pb no gene *ccr5* causa um “*frame-shift*” no aminoácido 185, e provoca uma terminação prematura na transcrição. A proteína codificada por esse alelo mutante não possui os últimos 3 segmentos transmembranas do receptor, desta forma impedindo a fusão do receptor com a membrana celular e a exposição da membrana. Portanto, esta mutação impede que o vírus infecte a célula alvo e confere proteção, quase absoluta, da infecção com os vírus trópicos de macrófago (M-trópico), em indivíduos homocigotos e confere uma progressão mais lenta para AIDS naqueles heterocigotos para a deleção (Samson, 1996; Liu, 1996).

Esse alelo mutante está presente em elevada frequência na população caucasiana (frequência alélica=0,09). O alelo *ccr5*-delta32 também tem sido encontrado em populações do Oriente Médio e do continente indiano com frequências variando entre 1 a 5%, mas é rara ou ausente nas populações negras da África central e oriental, entre populações asiáticas, da Oceania e em populações nativas das Américas (Martinson *et al.*, 1997; Samson, 1996).

Shailendra (2009) estudando vários grupos étnicos do vale do rio Ganges, na Índia, encontrou uma frequência de 1% de heterocigotos na população.

Um estudo feito no Nordeste brasileiro revelou que nos Estados do Maranhão, do Ceará, da Paraíba, de Alagoas e da Bahia não foi encontrado nenhum indivíduo homocigoto para a mutação (*ccr5* Δ 32/*ccr5* Δ 32) enquanto que, nas populações do Rio Grande do Norte, de Pernambuco e de Sergipe a frequência desse genótipo foi de 0,0059, 0,0052 e 0,0033, respectivamente. Dados da distância genética mostram que a população nordestina do Brasil está mais próxima das populações caucasianas européias, sugerindo uma maior contribuição genética destas na formação da população analisada (Gomes *et al.*, 2008).

Vargas *et al.*, (2006) estudou indivíduos saudáveis de Alegrete, RS, e não detectou homozigotos para a mutação (*ccr5Δ32/ccr5Δ32*). A presença do genótipo heterozigoto (*ccr5/ccr5Δ32*) entre brancos, negros e pardos foi de 14, 8, e 13%, indicando uma frequência do alelo CCR5Δ32 de 6,8, 3,8 e 6,4%, respectivamente. Estes resultados sugerem uma importante contribuição européia parental, mesmo em populações identificadas como negra e parda.

No presente estudo encontrou-se que a frequência do polimorfismo no gene *ccr5* em portadores da infecção pelo HIV-1, é de 4% na forma heterozigota e de 0% na forma homozigota, achado este semelhante ao de Groll & Martinez (2006), feito no Hospital Universitário do Rio Grande com portadores do HIV-1, que observaram uma frequência de 3% de heterozigotos e nenhum caso de homozigose para a mutação.

Diversas pesquisas (Dean, 1996; Liu, 1996; Samson, 1996) relatam a ausência ou frequências muito baixas de mutações *ccr5Δ32* na forma homozigota entre os indivíduos infectados pelo HIV, dado este confirmado pelo presente estudo. Contudo estes relatam, também, uma significativa elevação da frequência *ccr5Δ32* na forma homozigota entre os indivíduos expostos não infectados.

No grupo estudado por Liu *et al.* (1996), no qual indivíduos expostos não infectados foram estudados, 12% foram homozigotos para o alelo *ccr5Δ32*. Num outro estudo, 3,4% foram homozigotos para *ccr5Δ32*, o que foi estatisticamente diferente da frequência encontrada na população normal (Paxton *et al.*, 1996).

Sann-Dias *et al.*, (2008) também demonstrou que a frequência do polimorfismo *ccr5Δ32* na população exposta, não infectada pelo HIV-1, é maior que naquela infectada (5,3% > 2,1%).

Estes resultados diferem do encontrado no presente trabalho, uma vez que nenhum homozigoto mutante foi observado. Possivelmente, um estudo com um maior número amostral de uma população não infectada exposta, poderia confirmar os resultados mencionados anteriormente.

Nesta pesquisa foi encontrada uma frequência de 8% de heterozigotos *ccr5Δ32* no grupo soronegativo exposto. Segundo o que é mais comumente relatado na literatura, o efeito protetor desta mutação, quando em heterozigose, contra a infecção parece ser nulo, e sua presença parece estar associada a uma progressão mais lenta para o estado de portador da AIDS (Samson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Malo *et al.*, 1997 / 8; Michael *et al.*, 1997). Um indivíduo

participante deste estudo pode afirmar tal teoria; infectado há mais de 20 anos pelo HIV-1 e assintomático para AIDS, apresenta níveis de linfócitos T CD4⁺ acima de 350 células/ μ L carga viral relativamente baixa, sem nunca ter feito terapia anti-retroviral e possui o alelo CCR5 com mutação na sua forma heterozigota.

No presente estudo não houve correlação estatisticamente significativa entre a contagem de linfócitos T CD4⁺ e de carga viral com a presença da mutação CCR5 Δ 32 na forma heterozigota. Assim, não foi possível inferir que a presença da mutação em heterozigose no gene *ccr5* em infectados pelo HIV está associada a uma progressão mais lenta para AIDS, quando comparado aos pacientes portadores da forma normal do co-receptor. Corroborando com os achados de Dean *et al.*, (1996), Eugen-Olsen *et al.*, (1997) Huang *et al.*, (1996), Malo *et al.*, (1997 / 1998), Paxton *et al.*, (1998), Quillent *et al.*, (1997) Zimmerman *et al.*, (1997) que, também, não encontraram diferenças significativas na infectibilidade entre o tipo homozigoto selvagem e do genótipo heterozigoto. Este resultado pode ser justificado pelo fato de a grande maioria dos indivíduos estudados fazerem uso de terapia anti-retroviral, desde a descoberta da doença.

5. CONCLUSÕES

1. A frequência da mutação *ccr5*Δ32 em heterozigose foi de 4% na população de portadores do HIV-1 e de 8% na população controle de alto risco;
2. Não foram encontrados indivíduos homozigotos para a mutação *ccr5*Δ32 neste estudo;
3. Não foi observada diferença nas distribuições das frequências alélicas e genótípicas no gene do receptor CCR5 entre as populações em estudo;
4. Não houve correlação significativa entre a contagem de linfócitos T CD4⁺ e de carga viral com o estado de portador da mutação *ccr5*Δ32;
5. Não foi possível inferir que a presença da mutação em heterozigose no gene *ccr5* em infectados pelo HIV está associada a uma progressão mais lenta para AIDS, quando comparado aos pacientes portadores da forma normal do co-receptor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; ANDREW H.L. **Imunologia Celular e Molecular**. Ed. Elsevier. Rio de Janeiro 2005. 479p, 262p.
- ANSARI-LARI, MA; LIU, ML; METZKER, AR; RUT, RA; GIBBS ,A. Extensão da Genetic Variation No CCR5 Gene. **Nature Genetics**. **16**: 221-2.1997.
- AYRES, M.; AYRES, J.R.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BIOESTAT 4.0v: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Manaus, **Sociedade Civil Mamirauá**. 2006.
- AKHTER, S.A.; MILANO C.A.; SHOTWELL K.F.; CHO M.C.; ROCKMAN H.A.; LEFKOWITZ R.J.; KOCH W.J. Transgenic mice with cardiac overexpression of alpha1B-adrenergic receptors. *In vivo* alpha1-adrenergic receptor-mediated regulation of beta-adrenergic signaling. **Journal of Biological Chemistry** **272**: 21253-21259.1997.
- ALKHATIB, G.; LIAO, F.; BERGER, E. A.; FARBER, J. M. & PEDEN, K. W. A new SIV co-receptor, STRL33. **Nature** **388**, 238.1997.
- BABA, M.; NISHIMURA, O.; KANZAKI, N.; OKAMOTO, M.; SAWADA, H.; IIZAWA, Y.; SHIRAISHI, M.; ARAMAKI, Y.; OKONOJI, K.; OGAWA, Y.; MEGURO, K. & FUJINO, M. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** **96**, 5698-5703.1999.
- BAUER, PG, BARTH OM, PEREIRA MS. Endocytosis of the human immunodeficiency virus in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **82**(3): 449-50. 1987.
- BAGGIOLINI, M, DEWALD & MOSER B. IL-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines, **Adv Immuno l** **55**, 97-179. 1994.
- BENKIRANE , M., D.Y. JIN.Mechanism of transdominat inibition of ccr5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. **Journal of Biological Chemistry**.**272**, n. 49,Dec5,p3060-6.1997.
- BENTWICH, Z., KALINKOVICH, A., WEISMAN, Z., GROSSMAN, Z. Immune activation in the context of HIV infection. **Clinical and Experimental Immunology**, **111**: 1-2, 1998.
- BERGER, E.A. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. **AIDS**, **11**: 3-16, 1997.
- BERGER EA, MURPHY PM, FARBER JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease **Annual Review of Immunology** **17**: 657-700, 1999.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - AIDS E DST. Ministério da Saúde. Ano IV, nº 1 - 27ª à 52ª semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2006; 01ª à 26ª semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2007, dezembro 2007.

- BURGER, H., B. WEISER, WS ROBINSON, J. LIFSON, E. ENGLEMAN, C. ROUZIOUX, F. BRUN-VEZINET, F. BARRE-SINOUSI, L. MONTAGNIER, JC CHERMANN. Transmission of Lymphadenopathy-Associated Virus/Human T LymphoTropic Virus Type III In Sexual Partners. Seropositivity Does Not Predict Infectivity In All Cases. **American Journal of Medicine. 81:** 5-10.1986.
- BRATT, G., A.-C. LEANDERSSON, J. ALBERT, E. SANDSTRÖM, B. WAHREN. MT-2 Tropism and CCR-5 Genotype Strongly Influence Disease Progression In HIV-1 Infected Individuals. **AIDS. 12:** 729-36.1998.
- BURMEISTER, T. Oncogenic retroviruses in animals and humans. **Reviews in Medical Virology, 11:** 369–380, 2001.
- CAO, Y., QIN, L., ZHANG, L., SAFRIT, J., HO, D.D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. **New England Journal of Medicine, 332:** 201-208, 1985.
- CARL ZIMMER *Evolution: The Triumph of an Idea*, , © 2001, Harper Collins Publishers. < www.evolution.berkeley.edu/.../IA2HIV2.shtml
- CARRINGTON, M.; T. KISSER, B; GERRARD, S.; IVANOV, SJ; O'BRIEN, M.; DEAN. Novel Alleles of the Chemokine-Receptor Gene CCR5. **American Journal of Human Genetics. 61:** 1261-7.1997.
- CARVALHAES FAPL, CARVALHO MIM, GUERREIRO JF. A Mutação delta ccr5 em populações humanas da Amazônia. **Genetics and Molecular Biology 22:**613, 1999.
- CARVALHAES FAPL, HARMONY IG, GUERREIRO JF. Mutações do gene receptor de quimiocina ccr5 em japoneses do Estado do Pará. **Genetics and Molecular Biology 23:**633, 2000.
- CHAN,D. & KIM, P.S. HIV entry and its inhibition. **Cell, 93:** 681-684, 1998.
- CHAISSON, R.E., STERLING, T.R., GALLANT, J.E. General clinical manifestations of Human immunodeficiency virus infection (Including oral, cutaneous, renal, ocular and cardiac diseases). In: **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Douglas, R.G. (eds) Florida, USA: Churchill Livingstone,. 1398-1415. 2000.
- CLAPHAM, P.R. HIV and chemokines: ligands sharing cell-surface receptors. **Trends in Cell Biology, 7:** 264-268, 1997.

- CLAVEL, F., GUYADER, M., GUETARD, D., SALLE, M., MONTANGNIER, L., ALIZON, M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. **Nature**, **324**: 691-695, 1986.
- Chemistry at Wellesley College.** Disponível em <<http://www.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/hiv/t-hiv.GIF>> Acesso em: 20/11/2009.
- COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J.A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., TEMIN, H., TOYOSHIMA, K., VARMUS, H., VOGT, P., WEISS, R.A. What to call the AIDS virus? **Nature**, **321**: 10-10, 1986.
- COFFIN, J.M. *Retroviridae: The Viruses and their Replication*. In: **Fundamental Virology**. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B., Straus, S.E. (eds.) **Lippincott Raven, Philadelphia**, p. 763-843, 1996.
- COMBADIÈRE, C., S. AHUJA, H. TIFFANY, AND P. MURPHY. Cloning and Expression of CC CKR5, a Human Monocyte CC Chemokine Receptor Selective for MIP-1 (alpha), MIP-1 (beta), and RANTES. **Journal of Leukocyte Biology**. **60**: 147-52. 1996.
- CONNOR, RI, WA PAXTON, KE SHERIDAN, RA KOUP. Macrophage and CD4+ T Lymphocytes From Two Multiply Exposed, Uninfected Individuals Resist Infection With Primary Non-Syncytium-Inducing Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1. **Journal of Virology**. **70**: 8758-64. 1996.
- COOPER, D.A., GOLD, J., MACLEAN, P., DONOVAN, B., FINLAYSON, R., BARNES, T.G., MICHELMORE, H.M., BROOKE, P., PENNY, R. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. **Lancet**, **1(8428)**: 537-540, 1985.
- CHRISTIAN HOFFMAN & FIONA MULCAHY disponível em < <http://www.hivmedicine.com/textbook/haart/horizon.htm>. Acesso em: 21/11/2009.
- DEAN, M. CARRINGTON, M; WRINKLER, C.; HUTTLEY, GA.; SMITH, MW.; ALLIKMETS, R.; GOEDERT, JJ.; BUCHBINDER, SP.; VITTINGHOFF, E.; COMPERTS, E.; DONFIELD, S.; VLAHOV, D.; KASLOW, R.; SAAH, A; RINALDO, C.; DETELS, R.; O'BRIEN, S. Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression To AIDS By a Deletion Allele of the CCR5 Structural Gene. **Science**. **273**: 1856-1862. 1996.
- DENG, H, LIU R, ELLMEIER W, CHOE S, UNUTMAZ D, BURKHART M, DI MARZIO P, MARMON S, SUTTON RE, HILL M, DAVIS C, PEIPER S, SCHALLI TJ, LITTMAN DR,

- LANDAU N. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature** **381**: 661-666, 1996.
- DETELS, R., Z. LIU, K. HENESSEY, J. KAN, BR VISSCHER, JMG TAYLOR, DR HOOVER, CR RINALDO, JP PHAIR, AJ SAAH, JV GIORGI. Resistance To HIV-1 Infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**. **7**: 1263-9.1994.
- DORANZ, B. J., RUCKER, J., YI, Y., SMYTH, R. J., SAMSON, M., PEIPER, S. C., PARMENTIER, M., COLLMAN, R. G. & DOMS, R. W. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the *b*-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. **Cell** **85**, 1149-1158.1996.
- DOUEK DC, BRENCHLEY JM, BETTS MR, AMBROZAK DR, HILL BJ, OKAMOTO Y, CASSAZA JP, KURUPPU J, KUNSTMAN K, WOLINSKY S, GROSSMAN Z, DYBUL M, OXENIUS A, PRICE DA, CANNORS M, KOUP RA,. HIV Preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. **Nature**; **417**.95-98.2002.
- DOWDLE WR. Epidemiology of AIDS. **Public Health Rep.** **98**: 308-2. 1983
- DRAGIC, T., LITWIN, V., ALLAWAY, G. P., MARTIN, S. R., HUANG, Y., NAGASHIMA, K. A., CAYANAN, C., MADDON, P. J., KOUP, R. A., MOORE, J. P. & PAXTON, W. A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. **Nature** **381**, 667-673.1996.
- ELLERMAN,C.,O. BANG.. **Zentralbl. Bakteriolog.** 46:595–609, 1908. FAHEY, J.L. Cytokines, plasma immune activation markers, and clinically relevant surrogate markers in human immunodeficiency virus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **5**: 597-603, 1998.
- EUGEN-OLSEN, J., AKN IVERSON, P. GARRED, U. KOPPELHUS, C. PEDERSEN, TL BENFIELD, AM SORENSEN, T. KATZENSTEIN, E. DICKMEISS, J. GERSTOFT, P. SKINHOJ, A. SVEJGAARD, JO NELSON , B. HOFMANN. Heterozygosity For a Deletion In the CKR-5 Gene Leads To Prolonged AIDS-Free Survival and Slower CD4 T-Cell Decline In a Cohort of HIV-Seropositive Individuals. **AIDS**. **11**: 305-10. 1997.
- FAHEY, J.L. Cytokines, plasma immune activation markers, and clinically relevant surrogate markers in human immunodeficiency virus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **5**: 597-603, 1998.
- FAUCI AS. HIV and AIDS: 20 years of Scienc. **Nature Medical**. **9** (7) 839-43.2003.

- FENG, Y.; BRODER, CC.; KENNEDY, PE.; BERGER, EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-coupled receptor. *Science* 272: 872-877, 1996.
- FRANKEL, A.D. & YOUNG, J.A.T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry*, **67**:1-25,1998.
- FULLER, G.N., JACOBS, J.M., GUILOFF, R.J. Nature and incidence of peripheral nerve syndromes in HIV infection. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **56**: 372-381, 1993.
- GALLO, R.C. Human Retroviruses: a decade of discovery and link with human disease. *Journal of Infectious Diseases*, **164**: 235-243, 1991.
- GALLO, R.C., WONG-STAAAL, F. Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. *Blood*, **60**:545-557, 1982.
- GALLO, R.C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*, **2**: 17, 2005.
- GALVANI, P.A.; NOVEMBRE, J. The evolutionary history of the CCR5-D32 HIV-resistance mutation. *Microbes and Infection* **7** 302–309.2005.
- GARRED, P., LARSEN, F., MADSEN, H.O., KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Molecular Immunology*, **40**: 73-84, 2003.
- GESSAIN, A. Retrovirus humains HTLV-1 et HTLV-2. *EMC-Maladies Infectieuses*, **1**: 203–220, 2004.
- GOMES, AV; MAURICIO-DA-SILVA, L; OLIVEIRA, R; RAPOSO, MG; SILVA, RS. Frequência do alelo ccr5-Δ32 nas populações do nordeste do Brasil: evidência da herança caucasiana, In: **54º Congresso Brasileiro de Genética**. 2008 ISBN 978-85-89109-06-2.
- GOUGEON, M.L. & MONTAGNIER, L. Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **887**: 199-212, 1999.
- GOUREVITCH, MN. The epidemiology of HIV and AIDS . Current trends. *Medical Clinics of North America*. **80** (6): 1223-38, 1996.
- GRAZIOSI, C., SOUDEYNS, H., RIZZARDI, G.P., BART, P.A., CHAPUIS, A., PANTALEO, G. Immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **14**: 135-142, 1998.

- GREENE WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. **New England Journal of Medicine**, **324**(5): 308-17, 1991.
- GROLL, A.V.; MARTINEZ, A.M.B. A Relação do co-receptor CCR5 com a progressão da AIDS. **Âmbito Hospitalar, Brasil**, **03**, p. 39-43,2006.
- GÜRTLER, L.G., HAUSER, P.H., EBERLE, J., BRUNN, A VON, KNAPP, S., ZEKENG, L., TSAGUE, J.M., KAPTUE, L. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. **Journal of Virology**, **68**: 1581-1585, 1994.
- GUINARD, F., COMBADIÈRE, C., TIFFANY, H.L. AND MURPHY, P.M. Gene organization and promotor function for CC chemokine receptor 5 (CCR5). **The Journal of Immunology**, **160**: 985-992. 1998.
- HASELTINE, W.A. & WONG-STAAAL, F. The molecular biology of the AIDS virus. **Scientific American**, **259**: 52-62, 1988.
- HAZENBERG, M.D., COHEN STUART, J.W., OTTO, S.A., BORLEFFS, J.C., BOUCHER, C.A., DE BOER, R.J., MIEDEMA, F., HAMANN, D. T-cell division in HIV- 1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). **Blood**, **95**: 249-255, 2000.
- HAASE AT. Pathogenesis of lentivirus infection. **Nature.**; **322** (6075):130-6.1986.
- Harper Collins Publishers.** Carl Zimmer *Evolution: The Triumph of an Idea*, , © 2001, disponível em: < . evolution.berkeley.edu/.../IA2HIV2.shtml. acesso em : 20/11/2009
- HAHN, B.H., SHAW G.M., DE COCK, K.M., SHARP, P.M. AIDS as zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, **287**: 607-614, 2000.
- HASEGAWA, H.; FUJITA, S. Chemokines and lymphocytes: The role of chemokines and their receptors in the immune system. **Cellular and Molecular Biology**, **47**: 599-607.2001
- HOFFMAN, T.L. & DOMS, R.S. Chemokines and coreceptors in HIV/SIV- host interactions. **AIDS**, **12**. 17-26. 1998.
- HUANG, Y., WA PAXTON, SM WOLINSKY, A. NEUMANN, L. ZHANG, T. HE, S. KANG, D. CERADINI, Z. JIN, K. YAZDANDAKSH, K. KUNSTMAN, D. ERICKSON, E. DRAGON , N. LANDAU, J. PHAIR, D. HO, R. KOUP. The Role of a Mutant CCR5 Allele In HIV-1 Transmission and Disease Progression. **Nature Medicine**. **2**. 1240-3. 1996.
- HUTER, G.M.D; NOWAK, D.M.D.; MOSSNER, M.B.S.; GANEPOLA, S.M.D; MAIG, A.M.D.; ALLERS, K.; SCHNEIDER, T.M.D; HOFMANN, J.; KOHERER, C.M.D.; BLAU, O.M.D.,

- IGOR W. BLAU, M.D., WOLF K. HOFMANN, M.D., THIEL, E.M.D. Long-Term Control of HIV by *CCR5* Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. **New England Journal of Medicine**;360:692-8.2009.
- ICTV. *Retroviridae*. Disponível em :<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>>. Acesso em: 05/10/2009.
- KELLOWAY, J. S. Zafilukast : the first leukotriene-receptor antagonist approved for the treatment of asthma. **Annals of Pharmacotherapy** 31, 1012-1021.1997.
- KORBER, B., MULDOON, M., THEILER, J., GAO, F., GUPTA, R., LAPEDES, A., HAHN, B.H., WOLINSKY, S., BHATTACHARYA, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strain. **Science**, 288: 1789-1796, 2000.
- KWONG PD, WYATT R, ROBINSON J, SWEET RW, SODROSKI J, HENDRICKSON WA Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. **Nature** 393:648-659 .1998
- KRAUSSLICH, H.G., FACHE, M., HEUSER, A.M., KONVALINKA, J., & ZENTGRAF, H. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. **Journal of Virology**, 69: 3407–3419, 1995.
- KURTZBERG J, FRIEDMAN HS, KINNEY TR, CHAFFEE S, STINE K, FALLETTA JM, WEINHOLD KJ. Management of human immunodeficiency virus-associated thrombocytopenia with intravenous gamma globulin. **American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, 9: 299-301, 1987.
- KURITZKES, D.R. HIV pathogenesis and viral markers. HIV/AIDS. **Clinical Management** 2: 1-27, 2000.
- KLATZMANN, D., CHAMPAGNE, E., CJAMARET, S. GRUEST, J., GUETARD, D., HERCEND, T., GLUCKMAN, J.D. & MONTAGNIER, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. **Nature**, 312: 767-768, 1984.
- LASKY, L.A., NAKAMURA, G., SMITH, D.H., FENNIE, C., SHIMASAKI, C., PATZER, E., BERMAN, P., GREGORY, T. & CAPON, D.J. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. **Cell**, 50: 975-985, 1987.
- LEE B, SHARRON M, BLANPAIN C, DORANZ BJ, VAKILI J, SETOH P, BERG E, LIU G, GUY HR, DURELL SR, PARMENTIER M, CHANG CN, PRICE K, TSANG M, DOMS RW Epitope

- mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function. **Journal Biological Chemistry** **274**:9617-26 .1999.
- 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., KUCINSKAS, V., LAVINHA, J., MERCIER, B., OGUR, G., PELTONEN, L., ROSATELLI, C., SCHWARTZ, M., SPINTSYN, V., TIMAR, L., BECKMAN, L., PARMENTIER, M. AND VASSART, G. The $\Delta ccr5$ mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. **Human Molecular Genetics**, **7**:399-406.1998
- LIU, H.F. Genomic diversity and molecular phylogeny of human and simian T-cell lymphotropic viruses. Tese de doutorado. Katholieke, University Leuven,105p. 1996.
- LIU, R.;PAXTON, WA.; CHOE, S.; CERADINI, D.; MARTIN, RS.; HORUK, R.; MACDONALD, EM.; STUHLMANN, H.; KOUP, RA.; LANDAU, NR. Homozygous Defect In HIV-1 Co-Receptor Accounts For Resistance of Some Multiply Exposed Individuals To HIV-1 Infection. **Cell**. **86**: 367-377.1996.
- LIFSON, J., COUNTRE, S., HUANG, E., ENGLEMAN, E. Role of envelope glycoprotein carbohydrate in human immunodeficiency virus (HIV) infectivity and virus-induced cell fusion. **Journal of Experimental Medicine**, **164**: 2101-6.1986.
- LUSTER, AD. Chemokines - Chemotactic Cytokines that Mediate Inflammation. **The New England Journal of Medicine**. **338**: 436-445, 1998
- MACK, M., LUCKOW, B., NELSON, P. J., CIHAK, J., SIMMONS, G., CLAPHAM, P. R., SIGNORET, N., MARSH, M., STANGASSINGER, M., BORLAT, F., WELLS, T. N., SCHLONDORFF, D. & PROUDFOOT, A. E.. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling : a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. **Journal of Experimental Medicine** **187**, 1215±1224.1998.
- MALO, A., F. ROMMEL, J. BOGNER, R. GRUBER, W. SCHRAMM, FD GOEBEL, G. RIEHMÜLLER, R. WANK. Lack of Protection From HIV Infection By the Mutant HIV Coreceptor CCR5 In Intravenously HIV Infected Hemophilia Patients. **Immunobiology**. **198**: 485-8.1997.

- MAYERS, G. KORBER B., BERZOFSKY J.A., SMITH R.F & PVLAKIS G.N., Human retroviruses and AIDS. **Los Alamos National Laboratory**, 3:2-4, 1992.
- MARTINSON, J.J.; CHAPMAN, N.H.; REES, D.C.; LIU, Y.T.; CLEGG, J.B. Global distribution of the CCR5 gene32-basepair deletion. **Nature Genetics** 16:100-103, 1997.
- MASAKI I., LAJOS B., NORIKO O., HIDECHIKA O. Inhibition of HIV-1 infection by synthetic peptides derived CCR5 fragments. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 353, 851–8.2007.
- MCNICHOLL, J., SMITH, D.K., QARI, S.H. HODGE, T. Host genes and HIV: The role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele ($\Delta 32$ CCR5). **Perspectives**, 3: 261-271.1997
- MILLER MD & KRANGEL MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines, **Critical Reviews™ in Immunology** , 46, 12- 17. 1992.
- MOORE JP, DOMS RW. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. **PNAS** 100:10598-602.2003.
- MUMMIDI, S., AHUJA, S.S., MCDANIEL, B.L. AND AHUJA, S.K. 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. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 30662-30671.1997.
- NAVIA, B.A., CHO, E.S., PETITO, C.K. PRICE, R.W. The AIDS dementia complex: II. Neuropathology. **Annals of Neurology**, 19: 525-535, 1986a.
- NAVIA, B.A., JORDAN, B.D., PRICE, R.W. The AIDS dementia complex: I. Clinical features. **Annals of Neurology**, 19: 517-524, 1986b.
- O'BRIEN, S.J. AND DEAN, M. Genes que oponen resistencia al sida. **Investigación y ciencia**, 6-14.1997.
- OSMANOV, S., PATTOU, C., WALKER, N., SCHWARDLÄNDER, B., ESPARZA, J.; WHO-UNAIDS NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 28: 184-190, 2002.
- MULLINS, J.I. AIDS Pathogenesis & HIV Vaccine Development Opportunities and Challenges, **Keystone Symposia CO**. 1999.

- MURPHY, E.L., HANCHARD, B., FIGUEROA, J.P., GIBBS, W.N., LOFTERS, W.S., CAMPBELL, M., GOEDERT, J.J., BLATTNER, W.A. Modelling the risk of adult T cell leukemia/ lymphoma in persons infected with human T lymphotropic virus type I. **International Journal of Cancer**, **43**: 250-253, 1989.
- MURPHY, P.M. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. **Cytokine Growth Rev.**, **7**: 47-64.1996.
- PANGANIBAN, A., FIORE, D. Ordered interstrand and intrastand DNA transfer during reverse transcription. **Science**, **241**: 1064-1069, 1988.
- PANTALEO, G. & FAUCI, A.S. Immunopathogenesis of HIV infection. **Annual Review of Microbiology**, **50**: 825 – 854, 1996.
- PAXTON, A.W., MARTIN, S.R.; TSE, D.; O'BRIEN, T.R.; SKURNICK, J.; VANDEVANTER, N.L.; PADIAN, N.; BRAUN, J.F.; KOTLER, D.P.; WOLINSKY, S.M.; KOUP, R.A. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures. **Nature Medicine** **2**: 412- 417, 1996.
- PETTIT, S.C., MOODY, M.D., WEHBIE, R.S., KAPLAN, A.H., NANTERMET, P.V., KLEIN, C.A., & SWANSTROM, R. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. **Journal of Virology**, **68**: 8017–8027, 1994.
- PHAIR, J., JACOBSON, L., DETELS, R., RINALDO, C., SAAH, A., SCHRAGER, L., MUÑOZ, A. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with human immunodeficiency virus type-1: the Multicenter AIDS Cohort Study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **5**: 490-496, 1992.
- PICARD, L., SIMMONS, G., POWER, C. A., MEYER, A., WEISS, R. A. & CLAPHAM, P. R. Multiple extracellular domains of CCR-5 contribute to human immunodeficiency virus type 1 entry and fusion. **Journal of Virology** **71**, 5003-5011.1997.
- PIOT, P., BARTOS, M., GHYS, P.D., WALKER, N., SCHARTLANDER, B. The Global impact of HIV/AIDS. **Nature**, **410**: 968-973, 2001.
- POIESZ, B.J., RUSCETTI, F. W., GAZDAR, A.F., BUNN, P.A., MINNA, J.D, GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **77 (12)**: 7415-7419, 1980.

- PREMAK, B.A.; SCHALL, T.J. Chemokine receptores: gateways to inflammation and infection. **Nature Medicine**, **2**: 1174-1178.1996.
- ROUS, P.. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells **Journal of Experimental Medicine**. **13**:397–411,1911.
- RAO VR, OPRIAN DD Activating mutations of rhodopsin and other G protein-coupled receptors. **Annu Rev Biophys Biomol Struct** **25**:287-314 1996.
- RAPORT, CJ, J. GOSLING, VL SCHWEICKART, PW GRAY, IF CHARO. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Human Chemokine Receptor CCR5 For RANTES, MIP-1b, and MIP-1a. **Journal of Biological Chemistry** **271**: 17161-6.1996.
- RIZZUTO CD, WYATT R, HERNANDEZ-RAMOS N, SUN Y, KWONG PD, HENDRICKSON WA, SODROSKI J A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. **Science** **280**:1949-1953.1998.
- SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.;FARBER, C.-M.; SARAGOSTI, S.; LAPOUMEROLIE, C.; COGNAUX, J.; FORCEILLE, C.; MUYLDERMANS,G.; VERHOFSTEDE, C.; BURTONBOY, G.; GEORGES, M.; IMAI, T.; RANA, S.; YI, Y.; SMYTH, R.; COLLMAN, R.; DOMS, R.; VASSART,G.; PARMENTIER, M. Resistance to HIV-1 Infection in Caucasian Individuals Bearing Mutant Alleles of the CCR-5 Chemokine Receptor Gene. **Nature**. **382**: 722-5. 1996.
- SANN-DIAS, D.S.; BOMFIM, T.F.; MACHADO, T.M.B.; BRITES, C.; ACOSTA, A. X.; GALVÃO-CASTRO, B.2.; ABE-SANDES, K. Frequência da mutação CCR5 Δ 32 na população da BAHIA, infectada pelo HIV-1, e a associação com ancestralidade em rápidos, típicos e lentos progressores para AIDS In: **54º Congresso Brasileiro de Genética** ISBN 978-85-89109-06-2.008.
- SHARP, PM, BAILES E, ROBERTSON DL, GAO F, HAHN BH. Origis and Evolution of AIDS Viruses. **Biol ogical Bulletin**.;196: 338- 42 1999.
- SHAIENDRA K.S.Controversial role of smallpox on historical positive selection at the CCR5 chemokine gene (CCR5- Δ 32) **Journal of Infection in Developing Countries**; **3** : 324-326.2009.
- SHEPPARD, H.W., LANG, W., ASCHER, M.S., VITTINGHOFF, E., WINKELSTEIN, W. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. **AIDS**, **7**: 1159-1166. 1993.

- SIMMONS, G., CLAPHAM, P. R., PICARD, L., OFFORD, R. E., ROSENKILDE, M. M., SCHWARTZ, T. W., BUSER, R., WELLS, T. N. C. & PROUDFOOT, A. E. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. **Science** **276**, 276±279.1997.
- SREBEL, K. & BOUR, S. Molecular interactions of HIV with host factors. **AIDS**, **13**: 13-24, 1999.
- 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. Dating the origin of the CCR5-Δ32AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. **Am. Journal Human Genetic**, **62**: 1507-1515.1998.
- STRIZKI, J. M., XU, S., WAGNER, N. E., WOJCIK, L., LIU, J., HOU, Y., ENDRES, M., PALANI, A., SHAPIRO, S., CLADER, J. W., GREENLEE, W. J., TAGAT, J. R., MCCOMBIE, S., COX, K., FAWZI, A. B., CHOU, C. C., PUGLIESE-SIVO, C., DAVIES, L., MORENO, M. E., HO, D. D., TRKOLA, A., STODDART, C. A., MOORE, J. P., REYES, G. R. & BAROUDY, B. M. SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection *in vitro* and *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** **98**, 12718±12723.2001.
- SIMON, F.; MAUCLÈRE, P., ROQUES, P., LOUSSERT-AJAKA, I., MÜLLER-TRUTWIN, M.C., SARAGOSTI, S., GEORGES-COURBOT, M.C., BARRÉ-SINOUSI, F., BRUN-VÉZINET, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature Medicine**, **4**: 1032-1037, 1998.
- SUBBRAMANIAN, R.A. & COHEN, E.A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. **Journal of Virology**, **68**: 6831-6835, 1994.
- TAJIMA, K. & KUROIISHI, T. Estimation or Rate of Incidence of ATL among ATL (HTLV-I) carriers in Kyushu, Japan, **Japanese Journal of Clinical Oncology**, **15**: 423-430, 1985.
- TANGY, F. Molecular Biology of HTLV-I. In: *HTLV, truths and questions*. Zaninovic, V. (editors). Colombia, Cali, **Feriva Editores**, 1996. p. 1-13.

- TURVILLE SG, CAMERON PU, HANDLEYA, LIN G, POHLMANN S, DOMS RW, CUNNINGHAM AL. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. **Nature Immunology**; **3**(10); 975-83.2002.
- UNAIDS/WHO. Aids epidemic update: December 2007. Geneva, 2007.
- UNAIDS/WHO. Aids epidemic update: December 2008. Geneva, 2008.
- VARGAS, A.E; MARRERO, A.R; SALZANO, F.M; BORTOLINI, M.C ; CHIES, J.A.B. Frequency of CCR5 Δ 32 in Brazilian populations **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **39**: 321-32.2006.
- VAISHNAV, Y.N. & WONG-STAAAL, F. The Biochemistry of Aids. **Annual Review of Biochemistry**,**60**: 577-630,1991.
- VOGT, V.M. COFFIN, J.M., HUGHES, S.H. & VARMUS, H.E. Retroviral virions and genomes. In: **Retroviruses**. (eds). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1997. p. 27–70.
- WAINBERG, M.A ; KENDALL, O.; GILMORE, N. Vaccine and antiviral strategies against infections caused by Human Immunodeficiency Virus. **AIDS UPDATE**, **138**: 797-854, 1988.
- WAIN-HOBSON S., SONIGO P., DANOS O., COLE S., ALISON M.. Nucleotide sequence of the AIDS virus, **LAV. Cel**; **40**(1) : 9-17, 1985.
- WANG, Z. X., BERSON, J. F., ZHANG, T. Y., CEN, Y. H., SUN, Y., SHARRON, M., LU, Z. H. & PEIPER, S. C. CXCR4 sequences involved in coreceptor determination of human immunodeficiency virus type-1 tropism. Unmasking of activity with M-tropic Env glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry** **273**, 15007-15015.1998.
- WEISSENHORN, W., DESSEN, A., HARRISON, S. C., SKEHEL, J. J. & WILEY, D. C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. **Nature** **387**, 426-430.1997.
- WEISS, S., KONIG, B., MÜLLER, H.J., SEIDEL, H., GOODY, R.S. Synthetic human tRNA^{Lys} 3 and natural bovine tRNA^{Lys}3 interact with HIV-1 reverse transcriptase and serve as specific primers for retroviral cDNA synthesis. **Gene**, **111**: 183-197, 1992.
- WHITE, D.O., FENNER, F.J., **Medical Virology**. California, Academic Press. 603p. 1994
- WIEGERS, K., RUTTER, G., KOTTLER, H., TESSMER, U., HOHENBERG, H., & KRAUSSLICH, H.G. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. **Journal of Virology**, **72**: 2846–2854, 1998.

- WILLS, J. W., & CRAVEN, R. C. Form, function, and use of retroviral Gag proteins. **AIDS**, **5**: 639–654, 1991.
- WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C. Human T-lymphotropic retroviruses. **Nature**, **317**: 395-403, 1985.
- YANG, J-Y., TOGNI, M., WIDMER, U. Heterozygous defect in HIV-1 coreceptor CCR5 and Chemokine production. **Cytokine**, **11**:1-7.1999.
- ZIMMERMAN, PA, A. BUCKLER-WHITE, G. ALKHATIB, T. SPALDING, J. KUBOFCIK, C. COMBADIERE, D. WEISSMAN, O. COHEN, A. RUBBERT, G. LAM, M. VACCAREZZA, PE KENNEDY, V . KUMARASWAMI, JV GIORGI, R. DETELS, J. HUNTER, M. CHOPEK, EA BERGER, AS FAUCI, TB NUTMAN, PM MURPHY. Inherited Resistance To HIV-1 Conferred By An Inactivating Mutation In CC Chemokine Receptor 5: Studies In Populations With Contrasting Clinical Phenotypes, Defined Racial Background, And Quantified Risk. **Molecular Medicine**. **3**: 23-36.1997.