

# Polimorfismo do Gene CCR5 nas Doenças Falciformes

Mariana Pezzute Lopes<sup>1</sup>; Marcos A. C. Bezerra<sup>2,3</sup>, Betânia L. T. B. Domingues<sup>3</sup>, Dulcinéia M. de Albuquerque<sup>2</sup>, Fernando F. Costa<sup>2</sup>, Aderson da Silva Araújo<sup>3</sup>, Magnun Nueldo Nunes dos Santos<sup>1</sup>, Maria de Fátima Sonati<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Departamento de Patologia Clínica-FCM-UNICAMP*

<sup>2</sup>*Hemocentro UNICAMP*

<sup>3</sup>*Fundação HEMOPE*

## INTRODUÇÃO

“Doenças Falciformes” (DF) é um termo genérico usado para identificar condições em que a associação da Hemoglobina (Hb) S com outra alteração de Hb, estrutural ou talassêmica, leva a um quadro clínico similar ao da Anemia Falciforme (AF) (homozigose do gene da HbS – SS). A HbS decorre de uma substituição de base (GAG→GTG) no sexto códon do gene da globina β (*HBB*), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica (Glu6Val). A Hb S é resultante de uma alteração genética hereditária originada na África, sendo, portanto, mais frequente onde a proporção de antepassados negros é mais elevada. São exemplos mais comuns de DF a Doença Falciforme SC, a S-β talassemia e a Hemoglobinopatia SD. A fisiopatologia das DF está centralizada na capacidade de polimerização da HbS desoxigenada que, por sua vez, leva à hemólise crônica e à vaso-occlusão.

Os fenômenos vaso-oclusivos têm sido associados ao estado inflamatório crônico com ativação anormal do endotélio que envolve reticulócitos, neutrófilos, monócitos e

plaquetas. Investigações recentes sobre o papel da inflamação na fisiopatologia das DF sugerem que o perfil de citocinas produzidas pode influenciar a morbidade. Recentemente, o gene CCR5, um receptor de quimiocinas envolvido com padrão de citocinas Th1, tem sido relacionado ao estado inflamatório crônico. O gene está localizado no braço curto do cromossomo 3 e possui um alelo variante com uma deleção de 32pb denominado CCR5 $\Delta$ 32. Como a resposta imune Th1 esta associada com inflamação, foi proposto que a presença do alelo CCR5 $\Delta$ 32, não funcional, conferiria maior vantagem aos pacientes com DF por implicar em resposta Th1 menos eficiente.

## **OBJETIVOS**

O objetivo do presente trabalho foi determinar a freqüência do polimorfismo CCR5 $\Delta$ 32 em pacientes com DF visando contribuir para um maior conhecimento de fatores genéticos que possam influenciar na evolução clínica da doença.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

A casuística foi composta por 798 pacientes com DF (632 SS, 92 SC, 73 S- $\beta$  talassemia e um S/Deer Lodge), com idade variando de 3 meses a 70 anos, 50,38% do sexo masculino, e que vêm sendo acompanhados regularmente no Ambulatório do Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, Recife-PE.

A identificação da deleção CCR5 $\Delta$ 32 foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) alelo-específica, adaptada de Chies e Hutz (2003), em amostras de DNA obtidas dos leucócitos do sangue periférico por extração orgânica com fenol-clorofórmio.

Os *primers* utilizados constam da **Tabela I**. As reações de PCR foram padronizadas e realizadas no termociclador *Perkin-Elmer* (Applied Biosystems) em volume final de 30µl, durante 30 ciclos (96°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto) contendo 0,3µl da *Taq* DNA Polimerase 5U/µl; 0,3 µl de dNTP's 10mM; 0,3 µl de cada *primer* 10 µM; 1,8 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM; 3,0 µl do tampão da enzima 10X concentrado; 0,8 µl do DNA e 23,2 µl H<sub>2</sub>O deionizada para completar o volume final. Os produtos amplificados foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio e visualizados sob transiluminação com luz ultravioleta (UV), de acordo com a **Figura 1**. A amplificação do alelo normal gera um produto de 206pb, enquanto que o alelo mutante (CCR5Δ32) gera um produto de 174pb.

**Tabela I.** Sequências de nucleotídeos dos *primers* usados

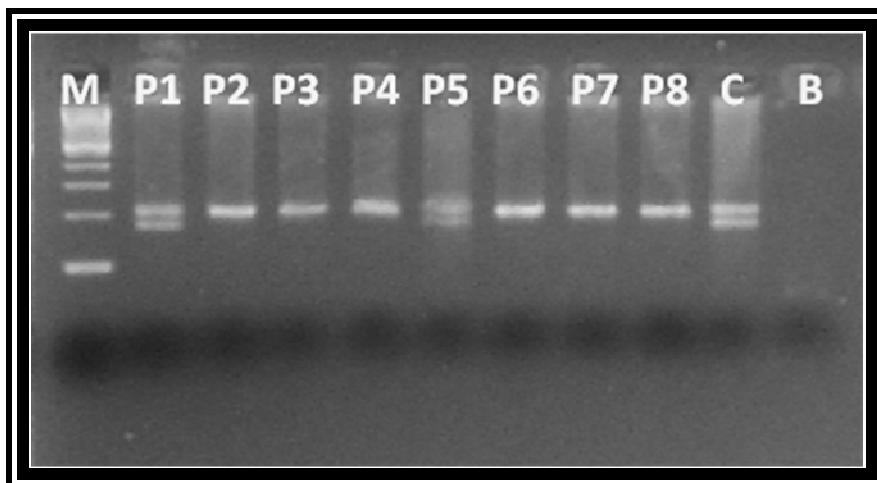
<b>Primer</b>	<b>Sequência de oligonucleotídeos (5'- 3')</b>
<b>CCR5Δ32_F</b>	CTTGGGTGGTGGCTGTGTTT
<b>CCR5Δ32_R</b>	AGTTTTTAGGATTCCCGATAGC

## **RESULTADOS**

Do período de junho de 2009 a agosto de 2010 foram investigados 798 pacientes com DF. Foram encontrados 41 pacientes heterozigotos da deleção CCR5Δ32 (5,14%) e 757 pacientes apresentaram o genótipo normal do CCR5 (94,86%).

Além disso, foi analisada a distribuição da deleção CCR5Δ32 entre dois grupos de pacientes homozigotos da AF (n= 482): um grupo pediátrico composto por 245 pacientes (3

meses a 10 anos de idade) e um de 237 pacientes adultos (18 a 70 anos de idade). Dentre os pacientes adultos foi encontrada a frequência de 4,64% de heterozigotos, enquanto que no grupo pediátrico a frequência foi de 5,71%, ligeiramente superior.



**Figura 1:** PCR dos pacientes. **M:** Marcador de peso molecular (ladder 100pb); **P1 e P5:** Pacientes heterozigotos da deleção CCR5 $\Delta$ 32; **P2-P4 e P6-P8:** Pacientes sem a deleção (alelos normais); **C:** Controle heterozigoto da deleção CCR5 $\Delta$ 32; **B:** Branco da reação.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram os achados de Vargas et al. que, em 2005, estudando 73 pacientes Hb SS do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), encontrou uma frequência de 5% de heterozigose da mutação CCR5 $\Delta$ 32. Embora as frequências obtidas sejam similares, é importante ressaltar três pontos: a maior representatividade do tamanho amostral do nosso trabalho, a diferença geográfica das populações (Recife e Porto Alegre) e os diferentes genótipos da DF estudados.

Em 2003, Chies e Hutz, estudando uma população de 112 indivíduos saudáveis, brasileiros, afro-descendentes, e provenientes das regiões sudeste e sul do país (Porto

Alegre e Rio de Janeiro), encontraram uma frequência de 3% de heterozigotos da deleção CCR5 $\Delta$ 32. De modo semelhante, a casuística do presente trabalho foi também composta por indivíduos afro-descendentes, porém provenientes da região nordeste do Brasil e com diagnóstico de DF. A frequência de heterozigotos entre os pacientes com DF por nós estudados (5,14%) é quase o dobro da frequência obtida por pesquisadores do sul do país, em uma população controle. Sendo assim, a hipótese de que o alelo CCR5 $\Delta$ 32 conferiria maior vantagem aos pacientes com DF, determinando uma maior sobrevida e um número menor de eventos inflamatórios, permanece plausível. A maior frequência do alelo entre indivíduos com DF pode sugerir uma seleção favorável desses pacientes, os quais foram capazes de sobreviver, deixar descendentes e transferir a mutação benéfica à prole.

**Suporte Financeiro:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)