



12º FÓRUM DE EXTENSÃO E CULTURA DA UEM
"A Arte, o Esporte e a Saúde na qualidade de vida"
De 04 a 06 de junho de 2014

12º FÓRUM DE EXTENSÃO E CULTURA DA UEM

GENOTIPAGEM DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA (CCR5) EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

Jonas Ricardo Munhoz¹
Patricia Keiko Saito²
Roger Haruki Yamakawa²
Sueli Donizete Borelli³

A doença renal crônica (DRC) é um sério problema de saúde pública e está comumente relacionada com processos inflamatórios que geram o aumento na quantidade de leucócitos, expressão de diversas quimiocinas e seus receptores. O objetivo deste estudo é realizar a genotipagem do receptor de quimiocina (CCR5) nos pacientes acometidos pela Doença Renal Crônica (DRC), provenientes dos centros de diálise de Maringá – PR e região. Dos 43 pacientes 69,8% (30/43) eram do gênero masculino e 30,2% (13/43) do gênero feminino. A análise mostrou um perfil genotípico de 90% (27/30) de amostras do gênero masculino apresentando receptores homocigotos selvagens CCR5/CCR5, e 92,3% (12/13) do gênero feminino para a mesma condição. O gênero masculino representou 10% (3/30), para heterozigose CCR5 Δ 32, e 7,7% (1/13) das amostras de gênero feminino com o mesmo genótipo. O genótipo da deleção (Δ 32/ Δ 32) se mostrou ausente nos pacientes analisados neste estudo. Os receptores de quimiocina exercem importantes funções no delineamento de inúmeras doenças inflamatórias e infecciosas. Esse parâmetro associado a outros marcadores químicos poderá auxiliar na melhor seleção, doador e receptor para um possível transplante, contribuindo para a melhoria da taxa de sobrevivência dos acometidos pela DRC.

Palavras-chave: Insuficiência renal crônica. Receptores de quimiocinas. CCR5.

Área temática: Saúde.

Coordenador (a) do projeto: Sueli Donizete Borelli, sueliborelli@gmail.com, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá – UEM – PR.

¹ Acadêmico de Farmácia, Departamento de Farmácia, UEM

² Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PCS), UEM

³ Professora Doutora, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UEM



Introdução

A Doença renal crônica (DRC) é consideravelmente um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e vem aumentando significativamente em todo o mundo, consistindo-se na perda progressiva e irreversível da função renal, chegando a um estágio crítico para a sobrevivência do paciente (SCHETTINO, 2006). A Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) estimou em 2013 que 100.397 pacientes estão em tratamento dialítico em 658 unidades de diálise no país, sendo 84% pertencentes ao sistema único de saúde (SUS). A DRC contribui para o desenvolvimento do quadro inflamatório, caracterizado por um aumento seletivo de diversos subgrupos de leucócitos, sendo um processo controlado pela expressão de algumas quimiocinas (SIDOTI et al. 2005). As quimiocinas são citocinas que apresentam papel central na fisiologia leucocitária ao controlar o tráfego basal e inflamatório. As duas principais famílias são as CC ou CCR quimiocinas, com resíduos de cisteína adjacentes, e família CXC, em que estes resíduos são separados por um aminoácido. Diferentes processos inflamatórios são caracterizados de formas distintas (ABBAS; LICHTMAN 2003). O tipo de infiltrado inflamatório é controlado, em parte, por um ou mais grupos de citocinas expresso no tecido afetado (CHOLLET-MARTIN et al. 1996; DEAN et al. 1993). O receptor de quimiocinas CCR5, pertence à família CC (β -quimiocinas), apresenta sete domínios transmembrana hidrofóbicos e exerce sua atividade via proteína G. Liga-se as quimiocinas RANTES (CCL5), MIP-1a (CCL3) e MIP-1 β (CCL4), (PANZER et al. 2005) e é codificado pelo *locus* CMBKR5 localizado no cromossomo 3p21 (OLIVEIRA 2006), envolvido na quimiotaxia de leucócitos para os sítios de inflamação (MILLER, YARON, YELLIN 1998) além do recrutamento de macrófagos, monócitos e células T na inflamação sendo normalmente expresso em linfócitos T e células dendríticas, dirigindo a resposta imune preferencialmente para células *T helper* (Th1) (SMYTH, GODFREY 2000; OLIVEIRA, 2006). Uma variação polimórfica do gene do receptor CCR5 foi identificada, a qual consiste na deleção de 32 pares de base, sendo denominado de CCR5 Δ 32 (LIU et al. 2005). Esta variante resulta em uma forma não funcional de receptor, impedindo a sua interação com suas quimiocinas ligantes, além disso, esta associada entre muitas doenças com efeito de proteção (YANG et al. 2005). A deleção do gene CCR5 Δ 32 esta frequentemente relacionada à resistência à infecção pelo HIV (ZUNIGA et al. 2003; LIU et al. 2005), e esta associada a proteção contra algumas doenças como esclerose múltipla (KAIMEN-MACIEL et al. 2007), síndrome de Löfgren (SPAGNOLO et al. 2008), asma, artrite reumatoide (LEE HO et al. 2012), e em contra partida pode haver um aumento do risco de desenvolver Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) (BORCHERS et al. 2009). Análises in vitro de monócitos de portadores CCR5 Δ 32 demonstraram uma reduzida resposta quimiotática aos ligantes do CCR5 (PANZER et al. 2005). As citocinas e quimiocinas estão envolvidas em mediadores relacionados com a produção de células *T helper* (Th1) e (Th2) no transplante renal, principalmente na etapa de indução da resposta inflamatória, as células apresentadoras de antígenos, linfócitos T ativados e células *natural killers* (NK), na



12º FÓRUM DE EXTENSÃO E CULTURA DA UEM
"A Arte, o Esporte e a Saúde na qualidade de vida"
De 04 a 06 de junho de 2014

presença de IL-12, IL-18 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) levam ao aumento de produção de células Th1 (CARDONI et al. 2005). Os receptores de quimiocinas incluindo os polimorfismos CCR e suas variáveis se relacionam com uma série de doenças inflamatórias e infecciosas, e a pesquisa insiste em desvendar essas relações para viabilizar soluções terapêuticas para os acometidos. Deste modo, o objetivo deste trabalho é realizar a genotipagem do receptor de quimiocina (CCR5) nos pacientes com Doença Renal Crônica (DRC), provenientes dos centros de diálise de Maringá – PR e região.

Materiais e Métodos

Caracterização e população do estudo:

A casuística foi constituída de 43 amostras de pacientes adultos submetidos a tratamento dialítico em centros de diálise de Maringá – PR e região.

Coleta das amostras:

As amostras foram coletadas nos centros de diálise de Maringá - PR, constituídas de 10ml de sangue periférico, em tubos contendo anticoagulante EDTA, por meio de agulhas e seringas descartáveis. Os tubos contendo as amostras foram armazenados em freezer á -80°C até o momento de uso.

Extração do DNA:

A metodologia da extração de DNA foi realizada através do Kit de extração *Biopur*® (*Biometrix Diagnóstica Ltda.*) seguindo instruções de uso do fabricante.

Genotipagem:

A genotipagem do receptor de quimiocina CCR5 foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase PCR - SSP, utilizando *primers* específicos para oCCR5, sendo *primer sense*: 5 'ACC TCT AGA AAC AAA GAA 3' e *anti-sense*: 5 'GAT GGT CAT GAT GAA AAG CCT CA 3'. Desta forma foram detectados os produtos de 225 pares de bases (pb) para o alelo normal e 193 pb para o alelo queapresenta a deleção de 32 pb.

Discussão de Resultados

Clark (2004) descreve que o gene CCR5 está localizado no braço curto do cromossomo 3p21, e o polimorfismo para os genes CCR5-59029 A/G e CCR5 Δ 32 tem sido relacionados com varias doenças infecciosas, doenças autoimune, doenças alérgicas, doença renal crônica e transplantes de órgãos (Ran Rui et al. 2009). Dentre as 43 amostras de pacientes analisadas neste estudo, constam 69,8% (30/43) amostras do gênero masculino e 30,2% (13/43) do gênero feminino. A análise mostrou um perfil genotípico de 90% (27/30) de amostras do gênero masculino apresentando receptores homozigotos selvagens CCR5/CCR5, e 92,3%



12º FÓRUM DE EXTENSÃO E CULTURA DA UEM
"A Arte, o Esporte e a Saúde na qualidade de vida"
De 04 a 06 de junho de 2014

(12/13) do gênero feminino para a mesma condição. Das amostras do gênero masculino, 10% (3/30) foram identificadas sendo heterozigotos CCR5 Δ 32, para 7,7% (1/13) das amostras do gênero feminino com o mesmo genótipo. O genótipo da deleção (Δ 32/ Δ 32) não foi encontrado nos pacientes analisados neste estudo. Segundo Boldt (2009), no Brasil, há uma frequência entre 3,8% a 9,3% em eurodescendentes e de 0,8 a 5,6% em afrodescendentes para o polimorfismo CCR5 Δ 32. Ran-Hui e colaboradores (2009) em estudo realizado com 243 pacientes transplantados na Coréia, também não encontraram a variante homozigótica (Δ 32/ Δ 32) devido a raridade do gene. Gomes (2009) conduziu um estudo parecido que mostra a mesma relação em pacientes com HIV, cuja mutação da deleção de CCR5 Δ 32 em homozigose pode reduzir o risco de infecção pelo HIV, o qual não observou 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. Sheibel (2006) para teve as mesmas conclusões para artrite reumatoide, cuja presença do alelo para a deleção CCR5 Δ 32 em homozigose, causaria uma doença menos destrutiva. Muntinghe e colaboradores (2012) realizaram um estudo envolvendo 603 pacientes em diálise, e a supressão do gene do receptor de quimiocina CCR5 num período de cinco anos, e revelaram que dos 170 pacientes que morreram dentro de cinco anos de seguimento do trabalho, 140 pacientes não eram portadores do polimorfismo CCR5 Δ 32 e 30 pacientes eram portadores do polimorfismo. Seus resultados sugerem que a deficiência do alelo CCR5 Δ 32 em homozigotos aumenta o efeito adverso ocasionado por um estado inflamatório persistente que pode levar a morte pacientes com insuficiência renal crônica (IRC). Os mesmos autores também apresentaram os primeiros dados humanos correlacionando o equilíbrio Th1/Th2, e afirmam uma dependência desse equilíbrio relacionado ao genótipo CCR5 Δ 32 em pacientes com insuficiência renal crônica. As células TCD4+ e TCD8+ estimuladas em pacientes com um ou dois alelos (CCR5 Δ 32) mostram um aumento da base fenotípica para Th2 no perfil de citocinas intracelulares. Devido à complexidade, o presente estudo teve as seguintes limitações: não foi possível obter as etnias das amostras dos pacientes em estudo, é preciso checar nos centros de diálise para obter esses dados, esta meta está prevista para os meses finais de entrega dos resultados. O mesmo será feito para a idade dos pacientes.

Conclusões

Dentre a análise feita, foi possível definir que os receptores com genótipo homozigoto selvagens no gênero masculino (CCR5/CCR5) e para a variante CCR5 Δ 32 foram predominantes. Os receptores de quimiocinas exercem importantes funções no delineamento de inúmeras doenças inflamatórias e infecciosas. Esse parâmetro associado a outros marcadores químicos poderá auxiliar na melhor seleção, doador e receptor para um possível transplante, contribuindo para a



melhoria da taxa de sobrevivência dos acometidos pela DRC. Contudo, pretende-se dar continuidade ao trabalho, tendo em vista a importância de sua aplicabilidade na terapêutica da doença renal crônica.

Referências

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, H.A. **Cytokines Cellular and Molecular Immunology**. V. 5, 2003, p. 243-274.

BORCHERS A.T.; NEGUWA, S.M.; SHOENFELD, Y.; GERSHWIN, M.E. **The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus, Autoimmun, Review: v.9, 2009, p. 277-278.**

BOLDT, A.B.W.; CULPI, L.; TSUNETO, L.T.; SOUZA, I.R.; KUN, J.F.J.; PETZLER M.L. **Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindian and high CCR5 Δ 32 frequency in Euro-Brazilians**. Genetic Molecular Biology, 32:p. 2009, p. 12–14.

CARDONI RL, PRIGOSHIN N, TAMBUTTI ML, FERRARIS JR. **Regulatory cytoquines in the response to the allogeneic renal transplant**. Medicina; 2005, n. 65, p.54-62.

CHOLLET-MARTIN S, JOURDAIN B, GIBERT C, ELBIM C, CHASTRE J, and GOUGEROT-POCIDALO M.A. **Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS**. Journal of Respiratory Care Medical: 1996, p. 594–60.

CLARK, V.J.; DEAN, M. **Haplotype structure and linkage disequilibrium in chemokine and chemokine receptor genes**. Human Genomics, 2004, p. 255–273.

DEAN, D.C.; IADEMARCO, M.F.; ROSEN, G.D. & SHEPPARD, A. M. **The integrin alpha 4 beta 1 and its counter receptor VCAM-1 in development and immune function**. American Review of Respiratory Disease. 1993, p. 43-46.

GOMES, R.E. **Avaliação do polimorfismo no gene CCR5 em portadores do HIV-1**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Pará, Belém (PA), 2009, p. 13 - 19.

KAIMEN-MACIEL D.R.; VISSOCI REICHE E.M.; BRUM SOUZA D.G. **CCR5 Δ 32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis**. International Journal of Molecular Medicine. 2007, p. 337–344.



LEE HO,Y.; BAE, S.C.; SONG, G. **Association between the chemokine receptor CCR5Δ32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis.** Module Rheumatology, Department of Internal Medicine, Korea University Anam Hospital: 2012, p. 136-705.

LIU, Z., LIU, Q., HAMED, H., ANTHONY, R.M., FOSTER, A., FINKELMAN, F.D., URBAN, J.F., JR., AND GAUSE, W.C. **IL-2 and autocrine IL-4 drive the in vivo development of antigen-specific Th2 T cells elicited by nematode parasites.** Journal Immunology: v.174. 2005, p. 2242–2249.

MILLER, D. L.; YARON, R. e YELLIN, M. J. **CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression.** Journal of Leukocyte Biology: 1998, 373-379.

MUNTINGHE, F.L.H.; ABDULAHAD, H.W.; HUITEMA, G.M.; DAMMAN,J.; SEELEN, M.A.; LEMS, S.P.M.; HEPKEMA, G.B.; NAVIS, G.; WESTRA, J. **CCR5Δ32 Genotype Leads to a Th2 Type Directed Immune Response in ESRD Patients.** Plos One 7(2): e31257. doi:10.1371. Technical University - Dresden, Germany: 2012, p. 2-7.

OLIVEIRA , K. B. **Análise do polimorfismo genético do receptor de quimiocina CCR5 em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana da região norte do Paraná.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Londrina (PR). 2006, p. 27- 41.

PANZER, U.; STEINMETZ, O. M.; REINKING, R. R.; MEYER, T. N.; FEH, R. **Compartment-specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL10 in a model of renal endothelial microvascular injury.** Journal of the American Society of Nephrology, v 17. 2005, p. 454-464.

RAN HUI, C.; YANG, S.H.; KIM, S.H.; KIM S.M.; PARK H.M.; JONGWON H.A. YON SU KIM, S.Y. **Genetic interactions between the donor and the recipient for susceptibility to acute rejection in kidney transplantation: polymorphisms of CCR5.** Nephrol Dial Transplant 24: 2919–2925 doi: 10.1093/ndt/gfp317. 2009, p. 1-7.

SAXENA A.; PANIGRAHI, A., GUPTA, S.; DINDA A.K.; GULERIA, S.; THAKUR, B.; MITRA, D.K. **Frequency of T Cell Expressing Th1 and Th2 Associated Chemokine Receptor in Patients With Renal Allograft Dysfunction.** Cellular Immunology, Division, Department of T.I.I. India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India: 2012, p. 290- 295.



12º FÓRUM DE EXTENSÃO E CULTURA DA UEM
"A Arte, o Esporte e a Saúde na qualidade de vida"
De 04 a 06 de junho de 2014

SHAIBEL, M.I. **Estudo de associação do alelo $\Delta 32$ do receptor de quimiocina CCR5 com Artrite Idiopática Juvenil.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (RS). 2006, p. 5-10.

SIDOTI, A.D.; ANGELO, R.; RINALDI, C. **Distribution of the mutated $\Delta 32$ allele of the CCR5 gene in a Sicilian population.** International Journal of Immunogenetics: 2005, p. 193–198.

SCHETTINO G. **Paciente Crítico: Diagnóstico e Tratamento.** São Paulo: Hospital Sírio Libanês; 2006.

SCHLONDORFF, D.; NELSON P.J.; LUCKNOW, B.; BANAS, B. **Chemokines and renal disease.** Kidney International supplements: 1997, p. 610–621.

SMYTH, M.J.; GODFREY, D.I. **Cells and tumor immunity: a double-edged sword.** Nature Immunology: 200, p. 459–460.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). **Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia.** Disponível em http://sbn.org.br/pdf/censo_2013_publico_leigo.pdf> Acessado em 13 de maio de 2013.

SPAGNOLO, P.; SATO H.; GRUNEWALD, J.; BRYNEDAL, B.; HILLERT J.; MAÑÁ, J.; WELLS, A.U.; EKLUND, A.; WELSH, K.I.; DU BOIS, R.M. **A common haplotype of the C-C chemokine receptor 2 gene and HLA-DRB1*0301 are independent genetic risk factors for Löfgren's syndrome.** Journal of internal medicine: 2008, p. 433-435.

ZUNIGA, J.A.; VILLARREAL-GARZA, C.; FLORES, E.; BARQUERA, R.; PEREZ-HERNANDEZ, N.; MONTES DE OCA, J.V.; CARDIEL, M.H.; VARGAS-ALARCON, G.; GRANADOS, J. **Biological relevance of the polymorphism in the CCR5 gene in refractory and non-refractory rheumatoid arthritis in Mexicans.** Clinic Experimental Rheumatology: 2003, p. 351–354.

YANG, G.; SCHMIEG, J.; TSUJI, M.; FRANCK, R.W. **The C-glycoside analogue of the immunostimulant alpha-galactosylceramide (KRN7000): synthesis and striking enhancement of activity.** Angew Chem, International Editorial. England: 2004, p. 3818–3822.