

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Uma abordagem Imunogenética da Doença Inflamatória Intestinal

Raquel Rinke

Trabalho apresentado como um
dos requisitos para a obtenção
do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas – Ênfase
Molecular, Celular e Funcional.

Orientador: José Artur Bogo Chies

Este trabalho foi inteiramente realizado no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Artur Bogo Chies, meu orientador, pela confiança e oportunidade para a realização deste trabalho junto ao seu grupo de pesquisa.

À Professora Doutora Marion Schiengold, pois foi através dela que tive a oportunidade de conhecer o laboratório de Imunogenética.

À Doutora Martha Brenner, da PUCRS, pela disponibilização do material dos pacientes para a montagem do banco de DNA.

Aos colegas do Laboratório de Imunogenética, pela compreensão e ajuda em todos os momentos necessários.

Aos meus pais, pela confiança, incentivo, força e apoio em todos os momentos, que sempre se dedicaram ao máximo para poder me dar boas condições, tanto de vida quanto de estudo. Pelo amor, carinho, enfim, tudo!

Índice

Lista de Figuras e Tabelas	05
Lista de Abreviaturas	06
Anexos	05
Resumo	07
Introdução	09
Doença Inflamatória Intestinal	10
Marcadores Moleculares	11
Quimiocinas	11
CCR5	12
HLA-G	14
Objetivos	18
Materiais e Métodos	19
Resultados	22
Discussão	23
Conclusão	26
Bibliografia	27

Lista de Figuras

- Figura 1: Representação esquemática de isoformas da proteínas HLA-G ---16
- Figura 2: Figura 2. Genotipagem do CCR5 em gel de agarose 3%----- 33
- Figura 3: Genotipagem do HLA-G em gel de acrilamida 6% -----33

Lista de Tabelas

- Tabela 1: Freqüências alélicas e número de indivíduos por genótipo do CCR5 em pacientes com IBD e controles saudáveis. ----- 34
- Tabela 2: Freqüências alélicas e número de indivíduos por genótipo do HLA-G em pacientes com IBD e controles saudáveis. ----- 34
- Tabela 3: Dados de genotipagem da variante CCR5delta32 agrupados de acordo com gênero e diagnóstico. ----- 35
- Tabela 4: Dados de genotipagem do polimorfismo inserção/deleção 14pb éxon 8 do gene HLA-G agrupados de acordo com gênero e diagnóstico ----- 35
- Tabela 5: Dados de todos os pacientes genotipados neste trabalho -----36

Anexos

- Anexo 1: Publicação na Revista Ciência em Movimento. -----38

Lista de Abreviaturas

3'UTR: Região 3' transcrita e não traduzida

APC: Célula apresentadora de Antígenos (do inglês *Antigen Presenting Cell*)

CCL3: Quimiocina pró-inflamatória 3

CCL5: Quimiocina pró-inflamatória 5

CCR5: Receptor 5 de quimiocinas da família C-C

CD: Doença de Crohn's

CXCR4: Receptor 4 de quimiocinas da família C-X-C

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Conjunto de quatro desoxi-fosfo-ribonucleotídeos necessários para síntese de DNA

Delta32: Deleção de 32pb

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

HLA-G: Antígeno Leucocitário Humano G

IBD: Doença Inflamatória Intestinal (do inglês *Inflammatory Bowel Disease*)

IL: Interleucina

INFs: Interferons

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex*)

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

ul: microlitro

NK: Células Natural Killer

pb: pares de base

TCR: Receptor de células T (do inglês *T cell receptor*)

Th1: Linfócito T auxiliar 1

Th2: Linfócito T auxiliar 2

UC: Colite Ulcerativa

Resumo

A Doença Inflamatória Intestinal (IBD) caracteriza-se por causar alterações na mucosa do trato gastrointestinal. É uma doença multifatorial onde fatores genéticos parecem interferir na predisposição ao desenvolvimento de diferentes sintomas associados. Alguns genes relacionados ao sistema imune já foram indicados como alvos potenciais de terapia nesta doença por possivelmente influenciarem no desenvolvimento da IBD. O gene CCR5 é o principal alvo de nosso projeto, por estar relacionado com resposta imune e interferir na migração de células pró-inflamatórias, direcionando-as para os locais de lesão. Outro sistema que também está sendo estudado é o da molécula de HLA-G que apesar de apresentar distribuição tecido específica e polimorfismo limitado comparado às moléculas de HLA clássicas de classe I, pode ser expressa diferencialmente durante processos de inflamações crônicas, vindo a favorecer respostas do tipo Th2. Até o momento foram recrutados no Hospital São Lucas da PUCRS 84 indivíduos portadores de IBD. Foi extraído DNA genômico desses indivíduos e esse material foi submetido à genotipagem do gene CCR5 - visando a identificação da variante CCR5delta32 - e do gene HLA-G - analisando-se a região 3' UTR referente a um polimorfismo inserção/deleção de 14pb no éxon 8. A frequência alélica (73 indivíduos) da variante CCR5delta32 no grupo com IBD foi comparada com a frequência do alelo em 102 indivíduos Euro-descendentes saudáveis, provenientes da população gaúcha. A frequência alélica (82 indivíduos) da variante HLA-G +14pb foi comparada com uma amostra de 137 indivíduos provenientes de um banco de sangue da cidade de Porto Alegre, através do teste de qui-quadrado. Apesar de existir uma pequena diferença entre a

freqüência da variante CCR5delta32 dos indivíduos com IBD (0,054) e do grupo controle (0,044), esta não foi estatisticamente significativa. Ao analisar as freqüências genóticas das variantes polimórficas do HLA-G, observou-se diferença significativa nos homozigotos para inserção, encontrados em menor freqüência nas amostras de pacientes com IBD ($p=0,033$). Nossos resultados, até o presente momento, não indicam associação direta entre a variante CCR5delta32 do receptor de quimiocinas CCR5 com o desenvolvimento de IBD na população gaúcha. O genótipo +14pb/+14pb de HLA-G parece estar contribuindo no processo de inflamação existente na IBD. É essencial tanto o aumento do número amostral quanto também a classificação dos pacientes de acordo com a forma clínica de IBD apresentada.

Introdução

O sistema imune é o principal mecanismo de defesa do nosso corpo contra agentes externos e, além disso, também desempenha importante função de vigilância em relação à presença de células “estranhas” reconhecidas como “não próprias” no nosso organismo podendo ser tanto células de tecidos enxertados quanto células tumorais.

As células responsáveis pela imunidade são os linfócitos e os fagócitos. Os linfócitos T e B juntamente com as células apresentadoras de antígenos (APC – *antigen presenting cell*) auxiliam na comunicação e transmissão de sinais entre as células.

Os linfócitos T apresentam um papel central no desencadeamento da resposta imune adaptativa. O TRC (*T cell receptor*) é o receptor antigênico do linfócito T, que através da ligação específica do complexo antígeno-MHC (*Major Histocompatibility Complex*) é um dos pontos mais importantes da resposta imune.

Pode-se dividir os linfócitos T em duas subclasses: linfócitos T citotóxico ou CD8+ que reconhecem peptídeos edógenos que são apresentados no contexto do MHC de classe I e os linfócitos T auxiliar (células T CD4+ ou T helper) que reconhecem peptídeos exógenos que são apresentados no contexto do MHC de classe II. Entre as células Th ativadas elas são classificadas da seguinte forma:

Th1 – ativam resposta inflamatória; ativando macrófagos, com produção predominante de citocinas pró-inflamatórias;

Th2 – ativadoras de resposta humoral; estimulam ativação de células B, com produção de citocinas anti-inflamatórias mobilizando eosinófilos, basófilos e mastócitos.

Doença Inflamatória Intestinal

A Colite Ulcerativa (UC) e a Doença de Crohn's (CD) são os subtipos mais comuns da Doença Inflamatória Intestinal (IBD). Caracterizam-se por serem doenças inflamatórias crônicas que causam irritação e inflamação no trato digestivo. A UC manifesta-se basicamente no cólon e no reto enquanto a CD pode afetar todo o trato gastrointestinal (POTOCNIK et al., 2004). Os portadores dessas enfermidades atravessam períodos remissivos e ativos da doença. Nos períodos de inflamação, os principais sintomas são: diarreia, dores abdominais, hemorragia, baixa absorção de nutrientes, falta de apetite, perda de peso e febre. (RECTOR et al., 2001).

A IBD caracteriza-se por ser de herança multifatorial, onde o somatório de fatores genéticos e ambientais pode levar a uma predisposição diferencial à doença (RECTOR et al., 2001; POTOCNIK et al., 2004). A origem étnica do indivíduo é um fator genético que parece interferir na susceptibilidade ao desenvolvimento da IBD, visto que esta doença raramente ocorre em indivíduos de ancestralidade Africana.

O diagnóstico tradicional da IBD é feito através de critérios clínicos, radiológicos e histológicos. Devido ao avanço das técnicas moleculares é possível associar genes candidatos, que potencialmente estão relacionados a IBD, com fenótipos dos portadores da doença (AHMAD et al., 2004).

Um fator importante no desenvolvimento da IBD parece ser o padrão preferencial de resposta imunológica do indivíduo. Análises da mucosa

intestinal em indivíduos portadores de CD e UC têm demonstrado um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias potencialmente associadas à morbidade da IBD, sugerindo assim, uma resposta inflamatória do tipo Th1. Além do mais, uma resposta imune desregulada e excessiva na mucosa intestinal, contra a flora entérica, parece ser um fator contribuinte para a morbidade associada a essa condição (PODOLSKY, 2002).

Marcadores Moleculares envolvidos com IBD

Atualmente, muitos trabalhos buscam a identificação de genes envolvidos no desenvolvimento da IBD. Isso é feito através da comparação das frequências alélicas de genes candidatos entre indivíduos que manifestam a doença e um grupo controle saudável (AHMAD et al., 2004).

Diversos loci gênicos que possivelmente estão associados à IBD já foram identificados, sendo que desses, apenas sete (IBD1-7) foram os que apresentaram um vínculo de maior significância com a doença. Eles estão localizados nos seguintes cromossomos: 16q (IBD1), 12q (IBD2), 6p (IBD3), 14q (IBD4), 5q (IBD5), 19p (IBD6) e 1p (IBD7). É importante salientar que alguns loci apresentam uma maior susceptibilidade a UC e/ou CD, o que pode indicar etiologias diferentes para as duas manifestações clínicas da IBD (ZHENG et al., 2003).

Quimiocinas

As citocinas quimiotáticas, também denominadas quimiocinas, são responsáveis pela comunicação entre as células no sistema imune exercendo sua atividade sobre neutrófilos, linfócitos e monócitos, e têm um papel importante na inflamação e destruição de tecidos (SZEKANECZ et al., 2003).

As quimiocinas pertencem a uma grande família de proteínas estruturalmente pequenas (8–14 kDa) que diferem de outras citocinas por serem os únicos membros que atuam na superfamília dos receptores de proteína G. Elas são importantes durante a quimioatração e ativação de leucócitos, contribuindo para o *homing* linfocitário tanto em condições fisiológicas quanto no recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação, favorecendo assim, uma resposta inflamatória eficiente. As células alvo, uma vez ativadas através de seus receptores de quimiocinas, migram por quimiotaxia ao longo do gradiente de concentração para o local da inflamação (PROUDFOOT, 2002).

Quimiocinas e receptores de quimiocinas são importantes para a manutenção do sistema imune da mucosa gastrointestinal durante períodos de inflamação. Em doenças gastrointestinais, principalmente na IBD, o envolvimento das quimiocinas e dos receptores que regulam o tráfego leucocitário não estão muito claros ainda.

O receptor CCR5 pertence à subfamília C–C onde os resíduos conservados de cisteína são adjacentes. Entre os ligantes capazes de ativar CCR5 estão o CCL3 (MIP-1 alfa) e CCL5 (RANTES) (SZEKANECZ et al., 1998; ZLOTNIK et al., 2000). O CCR5 é um dos receptores que já foi identificado como mediador do *homing* linfocitário para o intestino durante períodos de inflamação (PROUDFOOT, 2002).

CCR5

O gene *CCR5* está localizado no braço curto do cromossomo 3 na posição 21 e codifica uma proteína G de membrana que atua como receptor de quimiocinas. Essa proteína encontra-se distribuída predominantemente na

superfície de células T CD4+ e em monócitos. Durante o período de inflamação, as células da mucosa intestinal, para sinalizar que está ocorrendo uma inflamação, produzem CCL5, uma beta quimiocina que é reconhecida pelo CCR5, fazendo com que os linfócitos migrem para o local da inflamação gerando uma resposta inflamatória do tipo Th1.

Variantes alélicas do gene *CCR5* podem alterar tanto a taxa de expressão do gene quanto diretamente o produto protéico. O exemplo mais conhecido de alteração no gene que codifica a proteína CCR5 é uma deleção de 32pb que provoca o surgimento de um códon de terminação precoce, o qual interfere na tradução gerando um receptor de membrana não funcional. O alelo responsável por esta situação recebe o nome de CCR5delta32 (vide revisão recente em GALVANI; NOVENBRE; 2005). Os homozigotos para essa mutação não expressam a proteína CCR5 na superfície dos linfócitos e isso faz com que as células T não respondam adequadamente a fatores quimiotáticos.

Os heterozigos para a mutação CCR5delta32 expressam CCR5, porém em menor quantidade que homozigotos para o alelo selvagem. A presença do alelo CCR5delta32 leva a uma menor expressão de proteína quando em heterozigose, situação esta que pode chegar a total ausência deste receptor em indivíduos homozigotos. Com isso, provavelmente sua resposta imunológica encontra-se alterada.

A distribuição geográfica e populacional da mutação CCR5delta32 é bastante característica. Esta variante alélica é encontrada em alta frequência em Caucásios, mas é extremamente rara em Asiáticos. O alelo CCR5delta32 não é encontrado em populações nativas do continente americano, africano ou australiano. Estudos populacionais sugerem que essa variante surgiu

provavelmente na Europa, relativamente recentemente (700 – 5.000 anos), sendo resultante de um único evento mutacional. Esses mesmos estudos sugerem que portadores do alelo CCR5delta32 poderiam ter alguma vantagem, como menor taxa de mortalidade durante períodos de epidemias virais ou bacterianas, como peste negra, varíola, tuberculose levando a uma sobrevivência diferencial destes indivíduos levando tanto à sua manutenção quanto ao aumento relativamente rápido da frequência desse em diferentes grupos populacionais. (revisão em GALVANI; NOVEMBRE; 2005).

O CCR5, juntamente com o CXCR4, é um dos principais co-receptores envolvidos na entrada do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) nas células T CD4+ facilitando a infecção dessas (BERGER et al., 1998).

Evidências epidemiológicas associaram que homozigotos para a mutação CCR5delta32 apresentam um efeito protector contra a infecção do vírus HIV-1 (SAMSON et al., 1996; ZIMMERMAN et al., 1997). Entretanto, já foi identificado que alguns homozigotos para essa mutação foram infectados por HIV-1, o que indica que esse efeito protetor não é absoluto (Biti et al., 1997; Theodorou et al., 1997).

HLA-G

Outra molécula que pode estar envolvida com o desenvolvimento da IBD é a de HLA-G. Pertencente ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) também conhecido como Antígeno Leucocitário Humano (HLA), essa molécula se encontra na superfície de praticamente todas as células do organismo, sendo responsável pela exibição de peptídeos exógenos e endógenos aos linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, respectivamente.

O HLA-G é uma molécula de classe I do complexo principal de histocompatibilidade, porém não clássico (TORRES et al., 2004). É altamente expressa em células do citotrofoblasto e desempenha a importante função de indução de imunotolerância. Durante a gestação, as células Natural Killer (NK), encontradas na decídua materna, reconhecem moléculas de HLA-G presentes na superfície do tecido trofoblástico derivado do embrião determinando uma resposta Th2. A falha nesse reconhecimento gera uma resposta Th1, com ativação das células NK que eliminam o tecido embrionário. Geralmente, as células NK são ativadas por outras células que expressam pouco as moléculas de HLA, como células cancerígenas ou infectadas por algum tipo de vírus. Estudos recentes demonstraram que durante a gestação normal ocorre uma elevação do número de receptores inibidores nas células NK decíduais que reconhecem as moléculas de HLA-G fetal, prevenindo a ativação de tais células. Assim, o reconhecimento das moléculas HLA-G pelas células NK promove uma resposta imune favorável ao sucesso gestacional (TORRES et al., 2004; PAZMANY et al., 1999).

O gene *HLA-G* situado no cromossomo 6 (região 6p21.3) é composto por oito éxons, sete íntrons e uma região 3' transcrita e não traduzida (3'UTR) que faz parte do éxon 8. O transcrito primário sofre processamento alternativo, podendo dar origem a sete isoformas distintas da proteína HLA-G, sendo que quatro dessas isoformas ligam-se à membrana celular (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e três apresentam-se sob a forma solúvel (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7) (CAROSELLA et al., 2001; BAINBRIDGE et al., 2001).

T citotóxicas no mesmo. Possivelmente, em patologias de caráter inflamatório, como por exemplo, na doença inflamatória intestinal, a deleção de 14pb na região 3'UTR do éxon 8 diminui a estabilidade do mRNA e quando presente, parece diminuir a concentração das isoformas de proteínas HLA-G e isso parece estar associado com um padrão de resposta do tipo Th1 (inflamatória). Já o alelo de inserção de 14pb aumenta a estabilidade do mRNA e parece agir como um fator de proteção da mucosa gastrointestinal dificultando a infiltração de células T no tecido.

A IL-10 favorece a expressão de HLA-G, os IFNs utilizados em tratamentos terapêuticos também afetam a expressão *in vivo* nos níveis de HLA-G e essa molécula também pode ser expressa em tecidos tumorais *in vivo*, porém, geralmente, essa capacidade de expressão é perdida *in vitro* já que são necessários fatores específicos em um dado microambiente para a manutenção da expressão dessa molécula (LeMaoult et al., 2003).

Objetivos

Considerando a distribuição característica da variante CCR5delta32, o alto grau de miscigenação da população Brasileira e o potencial envolvimento deste receptor de quimiocinas em doenças pró-inflamatórias, esse trabalho tem como objetivo:

A caracterização imunogenética de pacientes portadores de UC e CD através da análise de variantes polimórficas de genes candidatos já descritos para IBD e que estão relacionados ao sistema imune a fim de verificar se existe alguma associação entre eles.

As variantes polimórficas que serão analisadas são:

- CCR5 – Análise da variante CCR5delta32
- HLA-G – Análise da região 3'UTR no éxon 8 (polimorfismo inserção/deleção 14pb).

Materiais e Métodos

Amostras

Foi isolado DNA a partir de sangue periférico de 84 pacientes com doença inflamatória intestinal os quais foram diagnosticados no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre (PUCRS). Estes pacientes foram previamente convidados a participar do estudo e, aqueles que se voluntariaram, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Atualmente, estas amostras fazem parte de um Banco de DNA genômico estocado no Laboratório de Imunogenética da UFRGS. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS no dia 22 de agosto de 2005.

Extração do DNA

O DNA foi isolado de células do sangue periférico de acordo com o protocolo descrito por LAHIRI & NURNBERGER (1991). As amostras foram armazenadas a -20°C.

Genotipagem CCR5

A genotipagem do gene *CCR5* foi feita através de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando-se primers específicos previamente descritos por CHIES & HUTZ (2003). A reação de PCR para cada amostra foi preparada para um volume final de 25uL nas seguintes condições: 1uL de DNA (0,2-0,5ug), 2,5uL de tampão de PCR 10X [200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl], 1uL de MgCl₂ 50mM, 1uL de dNTPs 5mM, 1uL de primers na concentração de 10pmol para cada primer e 0,2uL de Taq DNA polimerase 5U/uL. O programa de amplificação utilizado consistiu de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento dos primers, e 72°C por 1

minuto para extensão, precedidos de um ciclo de desnaturação por 3 minutos a 94°C e seguidos de um ciclo de extensão por 10 minutos a 72°C. O PCR produz fragmentos de 137 pb para o alelo selvagem e de 105 pb para o alelo delta32. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 3% sendo coradas com brometo de etídeo para visualização sob luz ultravioleta (Figura 2).

Genotipagem *HLA-G*

A genotipagem do gene *HLA-G* foi realizada através da PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando-se primers específicos (HVIID, 2003). A reação de PCR para cada amostra foi preparada para um volume final de 25uL nas seguintes condições: 1uL de DNA (0,2-0,5ug), 2,5uL de tampão de PCR 10X [200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl], 0,75uL de MgCl₂ 50mM, 2uL de dNTPs 5mM, 1uL de primers na concentração de 10pmol para cada primer e 0,2uL de Taq DNA polimerase 5U/uL. O programa de amplificação utilizado consistiu de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 64°C por 1 minuto para anelamento dos primers, e 72°C por 2 minutos para extensão, precedidos de um ciclo de desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C e seguidos de um ciclo de extensão final por 10 minutos a 72°C. O PCR produz fragmentos de 224 pb para homozigotos inserção (+14pb) e de 210 pb para homozigotos deleção (-14pb). As amostras foram aplicadas em gel de poli-acrilamida 6% sendo coradas com brometo de etídeo para visualização sob luz ultravioleta (Figura 3).

Análise Estatística

As frequências alélicas de ambos os genes foram determinadas por contagem. Para determinar se as amostras populacionais estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e para comparar a frequência dos alelos a

genótipos entre as populações foi utilizado o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

Resultados

Foram genotipadas 73 amostras em relação à variante CCR5delta32 do gene CCR5. Destas, 65 apresentaram homozigose para o alelo selvagem e 08 eram derivadas de indivíduos heterozigotos. Não foram observados indivíduos homozigotos para a variante CCR5delta32 (Tabela 1). A frequência encontrada para o alelo CCR5delta32 foi de 0,054 entre indivíduos com Doença Inflamatória Intestinal. Quando essa foi comparada com a frequência descrita para uma população controle caucasóide do Sul do Brasil (0,044) (CHIES & HUTZ; 2003) não foi encontrada diferença significativa. Tanto o grupo com Doença Inflamatória Intestinal quanto a amostra controle encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para as variantes gênicas do sistema *HLA-G* foram genotipados 84 indivíduos. Destes, 07 apresentaram homozigose para a inserção (+14pb/+14pb), 38 heterozigose (+14pb/-14pb) e 37 homozigose para deleção (-14pb/-14pb) (Tabela 2). O grupo controle utilizado proveio de um banco de sangue da cidade de Porto Alegre com um total de 137 indivíduos e também foram genotipados em nosso laboratório (Tabela 3). Destes, 27 apresentaram homozigose para a inserção (+14pb/+14pb), 57 heterozigose (+14pb/-14pb) e 53 homozigose para deleção (-14pb/-14pb) (Tabela 2). As frequências alélicas e genotípicas dos indivíduos com IBD e o grupo controle foram comparadas através do teste do qui-quadrado. Não houve diferença significativa entre as frequências alélicas ($p=0,081$). Porém, ao analisar as frequências genotípicas das variantes polimórficas do *HLA-G*, observou-se diferença significativa nos homozigotos para inserção, encontrados em menor frequência nas amostras de pacientes com IBD ($p=0,033$). Tanto o grupo com IBD quanto o grupo controle encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Discussão

A susceptibilidade à IBD está relacionada tanto a fatores ambientais como a fatores genéticos. Os receptores de quimiocinas estão envolvidos com o desenvolvimento de resposta imune, direcionando diferentes células para as regiões onde é necessária a estruturação de respostas inflamatórias.

A importância do *CCR5* como gene candidato no desenvolvimento e controle da inflamação em pacientes com IBD foi sugerida em estudos anteriores (RECTOR et al., 2001). Segundo Satsangi et al. (1996) e Hampe et al. (2001), existe associação de uma região do braço curto do cromossomo 3, onde se encontra o gene do *CCR5*, com o desenvolvimento de IBD. No entanto, Annese et al. (1999) e Rioux et al. (2000), em trabalhos desenvolvidos com pacientes IBD originários respectivamente da Itália e Canadá, não relataram qualquer evidência que essa região apresentasse algum tipo de ligação com a doença. A existência de dados conflitantes na literatura pode ser explicada tanto pelo fato desta ser uma doença complexa e multifatorial (envolvendo fatores ambientais e genéticos) quanto pela situação de análise de grupos populacionais com padrões étnicos/genéticos distintos. Levando em conta efeitos ambientais, foi sugerido que o aumento considerável na frequência de IBD nos últimos anos poderia estar relacionado a mudanças nos hábitos alimentares, como por exemplo, o aumento da ingestão de produtos industrializados e com pouca fibra. No entanto, apenas fatores ambientais (e especificamente aqueles relacionados à alimentação) não parecem ser suficientes para explicar este aumento na incidência de IBD em diferentes populações.

Considerando a alteração na taxa de expressão do CCR5, é possível que a resposta inflamatória (tanto em indivíduos heterozigotos quanto em indivíduos homozigotos para o alelo CCR5delta32) fique alterada, potencialmente interferindo tanto em respostas imunes normais quanto em respostas patológicas. Em nossa análise pôde-se observar que, apesar de não existir uma diferença estatisticamente significativa, houve uma tendência de uma maior freqüência do alelo CCR5delta32 nos indivíduos com IBD (0,054) quando comparados aos indivíduos controle (0,044); porém, o CCR5 parece não estar associado com o *homing* linfocitário durante períodos ativos da IBD provavelmente devido a ação de outras quimiocinas que atuam sobre linfócitos Th1 durante a resposta inflamatória. É importante aqui salientar que diversos trabalhos têm associado um receptor CCR5 não funcional com o desenvolvimento de respostas inflamatórias exacerbadas, tanto em modelos animais, como é o caso de camundongos CCR5 nocaute infectados com uma linhagem de vírus influenza (DAWSON et al.; 2000) quanto em doenças humanas, tais como a anemia falciforme (CHIES & HUTZ, 2003) e a artrite idiopática juvenil (SCHEIBEL & VEIT, comunicação pessoal). Ainda, é importante lembrar que, como salientado anteriormente, muitos genes candidatos estão associados a apenas uma das formas clínicas da IBD, seja a Colite Ulcerativa ou a Doença de Crohn's. Dados preliminares desse trabalho serão publicados na Revista Ciência em Movimento do Ipa Metodista na edição de junho de 2006 (anexo 1).

Segundo ROUSSEAU et al., (2004), a deleção e a inserção de 14pb estão presentes em aproximadamente 58% e 42%, respectivamente, da população

caucasiana. Talvez esse polimorfismo possa ter conseqüências funcionais, estando associado a baixos níveis de transcrito de HLA-G.

Baixas concentrações de HLA-G resultariam em um aumento da resposta de linfócitos T citotóxicos e a indução de um perfil de citocinas do tipo Th1, enquanto altas concentrações suprimiriam a resposta citotóxica e induziria um perfil de citocinas do tipo Th2 (HVIID et al., 2005). Essa hipótese vai ao encontro com os resultados obtidos no nosso trabalho, em que o alelo de inserção encontra-se significativamente diminuído no grupo de pacientes, possivelmente devido ao padrão característico de resposta imune na IBD ser de perfil inflamatório (Th1).

Os dados clínicos de todos os pacientes que foram genotipados para a variante CCR5delta32 e do polimorfismo inserção/deleção 14pb no éxon 8 de HLA-G não estavam disponíveis. Ao agrupar apenas os dados dos indivíduos com IBD que estavam disponíveis de acordo com gênero e diagnóstico (UC e DC) para a variante CCR5delta32 nenhuma diferença relevante foi encontrada (Tabela3). O mesmo foi observado para o polimorfismo inserção/deleção 14pb no éxon 8 HLA-G (Tabela4).

É essencial tanto o aumento do número amostral do presente trabalho quanto também a classificação dos pacientes de acordo com a forma clínica de IBD apresentada, pois como pode ser observada, uma fragmentação do tamanho da amostra entre os diferentes grupos diminui o poder de análise. Outrossim, é importante que dados referentes à idade, sexo, etnia, além de outras características clínicas e físicas dos pacientes sejam obtidos para que possamos adequadamente caracterizar e subgrupar os indivíduos.

Conclusão

Apesar de existir uma pequena diferença da frequência desta variante entre os indivíduos com IBD (0,054) e o grupo controle (0,044), esta não foi estatisticamente significativa. Nossos resultados não indicam, até o presente momento, uma associação direta entre a variante delta32 do receptor de quimiocinas CCR5 e o desenvolvimento de IBD na população gaúcha. O genótipo +14pb/+14pb parece estar interferindo no processo de inflamação existente na IBD apresentando um padrão alterado na resposta T citotóxica.

Referências Bibliográficas

- AHMAD, T.; TAMBOLI, C. P.; JEWELL, D.; COLOMBEL, J-F. Clinical Relevance of Advantages in Genetics and Pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology*, 126: 1533-1549, 2004.
- ANNESE, V.; LATIANO, A.; BOVIO, P.; FORABOSCO, P.; PIEPOLI, A.; LOMBARDI, G.; ANDREOLI, A.; ASTEGIANO, M.; GIONCHETTI, P.; RIEGLER, G.; STURNIOLO, G. C.; CLEMENTI, M.; RAPPAPORT, E.; FORTINA, P.; DEVOTO, M.; GASPARINI, P.; ANDRIULLI, A. Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to the IBD1 locus--a GISC study. *Eur J Hum Genet*, 7: 567-573. 1999.
- BAINBRIDGE, D.; ELLIS, S.; LE BOUTEILLER, P.; SARGENT, I. HLA-G remains a mystery. *Trends Immunol*, 22: 548-552, 2001.
- BERGER, E. A.; DOMS, R. W.; FENYO, E. M.; KORBER, B. T.; LITTMAN, D. R.; MOORE, J. P.; SATTENTAU, Q. J.; SCHUITEMAKER, H.; SODROSKI, J.; WEISS, R. A. HIV-1 phenotype classified by co-receptor usage. *Nature*, 391: 240, 1998.
- BITI, R.; FFRENCH, R.; YOUNG, J.; BENNETTS, B.; STEWART, G.; LIANG, T. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med.*, 3:252-253, 1997.
- CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; ARACTINGI, S.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol.*, 22: 553-555, 2001.
- CHIES, J. A. B.; HUTZ, M. H. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, 36:71-75, 2003.

DAWSON, T. C.; BECK, M. A.; KUZIEL, W. A.; HENDERSON, F.; MAEDA, N.
Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary
inflammatory response to influenza A virus. *American Journal of Pathology*,
156: 1951-1959, 2000.

GALVANI, A. P.; NOVEMBRE, J. The evolutionary history of the CCR5-delta32
HIV-resistance mutation. *Microbes and Infection.*, 7:302-309, 2005.

HAMPE, J.; LYNCH, N. J.; DANIELS, S.; BRIDGER, S.; MACPHERSON, A. J.;
STOKKERS, P.; FORBES, A.; LENNARD-JONES, J. E.; MATHEW, C. G.;
CURRAN, M. E.; SCHREIBER, S. Fine mapping of the chromosome 3p
susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut.*, 48: 191-197, 2001.

HUANG, Y.; PAXTON, W. A.; WOLINSKY, S. M.; NEUMANN, A. U.; ZHANG,
L.; HE, T.; KANG, S.; CERADINI, D.; JIN, Z.; YAZDANBAKHSI, K.;
KUNSTMAN, K.; ERICKSON, D.; DRAGON, E.; LANDAU, N. R.; PHAIR, J.;
HO, D. D.; KOUP, R. A. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1
transmission and disease progression. *Nat Med.*, 2: 1240-1243, 1996.

HVIID, T. V.; CHRISTIANSEN, O. B. Linkage disequilibrium between human
leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G--possible implications for
human reproduction and autoimmune disease. *Hum Immunol.*, 66: 688-699,
2005.

HVIID, T. V.; HYLENIUS, S.; HOEGH, A. M.; KRUSE, C.; CHRISTIANSEN, O.
B. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions.
Tissue Antigens., 60: 122-132, 2002.

HVIID, T. V.; HYLENIUS, S.; RORBYE, C.; NIELSEN, L.G. HLA-G allelic
variants are associated with differences in HLA-G mRNA isoform profile and
HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics.* 55(2):63-79.

- LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.*, 19: 5444, 1991.
- LEMAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; MCCLUSKEY, J.; CAROSELLA, E. D. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens*, 62: 273-284, 2003.
- MELITZA, I. R. Inmunología de la reproducción. Actualización en Medicina. *Clínica y Ciencia*. 1: 6-14, 2002.
- MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int. Immunol.*, 11: 803, 1999.
- MOREAU, P.; MOUILLOT, G.; ROUSSEAU, P.; MARCOU, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 1191-1196, 2003.
- PAZMANY, L.; MANDELBOIM, O.; VALES-GOMEZ, M.; DAVIS, D. M.; BECKER, T. C.; REYBURN, H. T.; SEEBACH, J. D.; HILL, J. A.; STROMINGER, J. L. Human leukocyte antigen-G and its recognition by natural killer cells. *J Reprod Immunol.*, 43: 127-137, 1999.
- PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 347: 417-429, 2002.
- POTOCNIK, U.; FERKOLJ, I.; GLAVAC, D.; DEAN, M. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes Immun.*, 5:530-539, 2004.

PROUDFOOT, A. E. I. Chemokine receptors: Multifaceted therapeutic Targets. *Nat Rev Immunol.*, 2: 106-115, 2002.

RECTOR, A.; VERMEIRE, S.; THOELLEN, I.; KEYAERTS, E.; STRUYF, F.; VLIETINCK, R.; RUTGEERTS, P.; VAN RANST, M. Analysis of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) delta-32 polymorphism in inflammatory bowel disease. *Hum Genet.*, 108: 190-193, 2001.

RIOUX, J. D.; SILVERBERG, M. S.; DALY, M. J.; STEINHART, A. H.; MCLEOD, R. S.; GRIFFITHS, A. M.; GREEN, T.; BRETTIN, T. S.; STONE, V.; BULL, S. B.; BITTON, A.; WILLIAMS, C. N.; GREENBERG, G. R.; COHEN, Z.; LANDER, E. S.; HUDSON, T. J.; SIMINOVITCH, K. A. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet.*, 66: 1863-1870, 2000.

ROUSSEAU, P.; MASTERNAK, K.; KRAWCZYK, M.; REITH, W.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. In vivo, RFX5 binds differently to the human leukocyte antigen-E, -F and -G promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner. *Immunology, Oxford*, 111: 53-65, 2004;

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol.*, 64: 1005-1010, 2003.

SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B.J.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.; FARBER, C.M.; SARAGOSTI, S.; LAPOUMEROULIE, C.; COGNAUX, J.; FORCEILLE, C.; MUYLDERMANS, G.; VERHOFSTEDÉ, C.; BURTONBOY, G.; GEORGES, M.; IMAI, T.; RANA, S.; YI, Y.; SMYTH, R.J.; COLLMAN, R.G.; DOMS, R.W.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Resistance to HIV-1

- infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382: 722–725, 1996.
- SATSANGI, J.; PARKES, M.; LOUIS, E.; HASHIMOTO, L.; KATO, N.; WELSH, K.; TERWILLIGER, J. D.; LATHROP, G. M.; BELL, J. I.; JEWELL, D. P. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet.*, 14: 199-202, 1996.
- SZEKANECZ, Z.; KIM, J.; KOCH, A. E. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunol.* 15: 15-21, 2003.
- SZEKANECZ, Z.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; KOCH, A. E. Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.*, 20: 115-132, 1998.
- THEODOROU, I.; MEYER, L.; MAGIEROWSKA, M.; KATLAMA, C.; ROUZIOUX, C. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group. *Lancet.*, 349: 1219-20, 1997.
- TORRES, M. I.; LE DISCORDE, M.; LORITE, P.; RIOS, A.; GASSULL, M. A.; GIL, A.; MALDONADO, J.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol.*, 16: 579-583, 2004.
- TORRES, M.I.; MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; DAUSSET, J.; CAROSELLA E.D. HLA-G Today. *Inmunología*, 20:18-29, 2001.
- UROSEVIC, M.; WILLERS, J.; MUELLER, B.; KEMPF, W.; BURG, G.; DUMMER, R. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 99: 609-617, 2002.

ZHENG, C. Q.; HU, G. Z.; ZENG, Z. S.; LIN, L. J.; GU, G. G. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World Gastroenterol*, 9: 1646-1656, 2003.

ZIMMERMAN, P. A.; BUCKLER-WHITE, A.; ALKHATIB, G.; SPALDING, T.; KUBOFCIK, J.; COMBADIERE, C.; WEISSMAN, D.; COHEN, O.; RUBBERT, A.; LAM, G.; VACCAREZZA, M.; KENNEDY, P. E.; KUMARASWAMI, V.; GIORGI, J. V.; DETELS, R.; HUNTER, J.; CHOPEK, M.; BERGER, E. A.; FAUCI, A. S.; NUTMAN, T. B.; MURPHY, P. M. 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. *Mol Med.*, 3: 23-36, 1997.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.*, 12: 121-127, 2000.

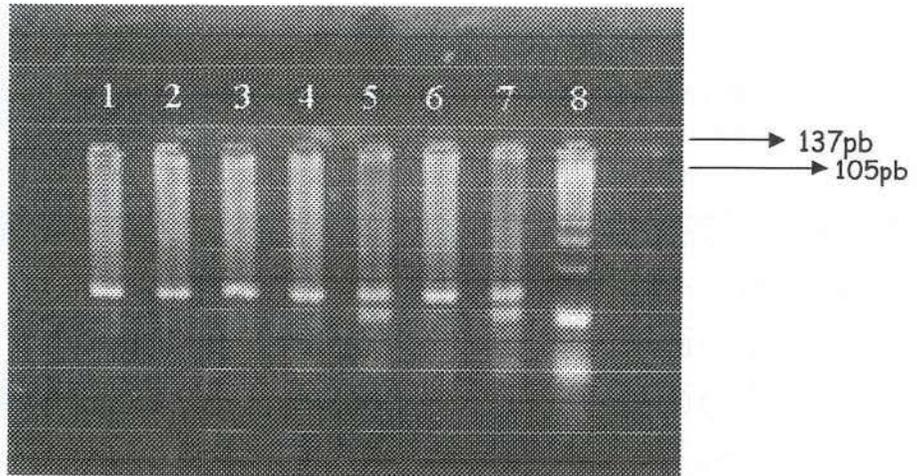


Figura 2. Genotipagem do CCR5 em gel de agarose 3%: Canaletas 1, 2, 3, 4 e 6 indivíduos homocigotos normais (CCR5/CCR5); 5 e 7 indivíduos heterocigotos (CCR5/CCR5delta32); 8 marcador molecular, ladder de 100pb.

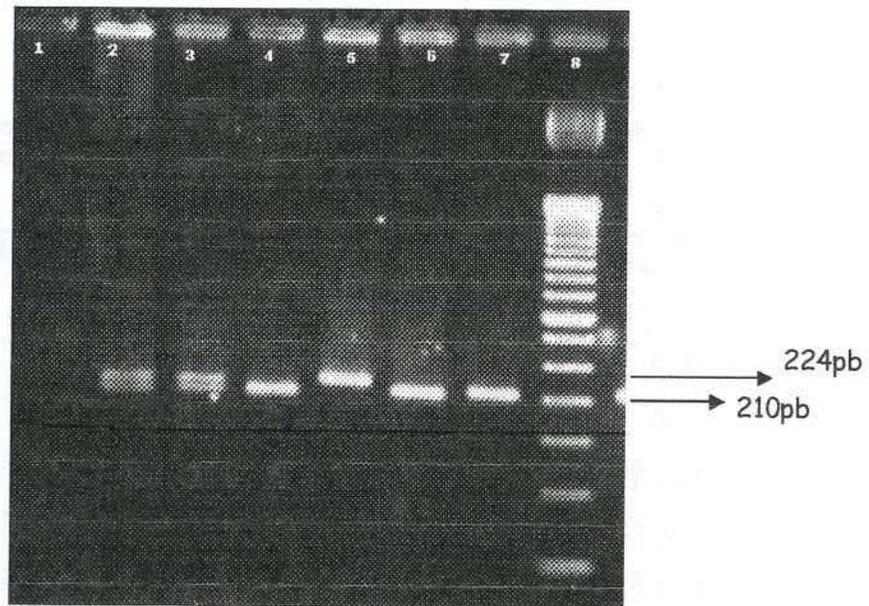


Figura 3. Genotipagem do HLA-G em gel de acrilamida 6%: Canaleta 1 controle negativo; 2 e 3 heterocigotos (+14pb/-14pb); 4, 6 e 7 homocigotos para deleção (-14pb/-14pb); 5 homocigoto para inserção (+14pb/+14pb); 8 marcador molecular, ladder de 100pb.

Tabela 1: Frequências alélicas e número de indivíduos por genótipo do CCR5 em pacientes com IBD e controles saudáveis.

CCR5		Pacientes com IBD (n = 73)	Grupo Controle (n = 102)
Alelo	CCR5	0,945	0,956
(frequência)	CCR5 delta32	0,055	0,044
Genótipo	homozigoto selvagem	65 (89%)	93 (91%)
(n)	heterozigotos	08 (11%)	9 (9%)

Tabela 2: Frequências alélicas e número de indivíduos por genótipo do HLA-G em pacientes com IBD e controles saudáveis.

HLA-G		Pacientes com IBD (n = 82)	Grupo Controle (n = 137)
Alelo	+14pb	0,317	0,405
(frequência)	-14pb	0,683	0,595
Genótipo	Inserção	07 (8,53%)	27 (19,7%)
(n)	Heterozigoto	38 (46,34%)	57 (41,6%)
	Deleção	37 (45,13%)	53 (38,7%)

Tabela 3: Dados de genotipagem da variante CCR5delta32 agrupados de acordo com gênero e diagnóstico [Doença de Crohn's (DC) ou Colite ulcerativa (UC)] dos pacientes que apresentavam dados clínicos disponíveis.

Sexo Masculino (n = 27)	DC (n = 16)	hom CCR5 (n = 14)
		het CCR5/CCR5delta32 (n = 02)
	UC (n = 11)	hom CCR5 (n = 09)
		het CCR5/CCR5delta32 (n = 02)
Sexo Feminino (n = 33)	DC (n = 16)	hom CCR5 (n = 13)
		het CCR5/CCR5delta32 (n = 03)
	UC (n = 17)	hom CCR5 (n = 16)
		het CCR5/CCR5delta32 (n = 01)

Tabela 4: Dados de genotipagem do polimorfismo inserção/deleção 14pb éxon 8 do gene HLA-G agrupados de acordo com gênero e diagnóstico [Doença de Crohn's (DC) ou Colite ulcerativa (UC)] dos pacientes que apresentavam dados clínicos disponíveis.

Sexo Masculino (n = 29)	DC (n = 17)	hom +14pb/+14pb (n = 01)
		het +14pb/-14pb (n = 11)
	UC (n = 11)	hom -14pb/-14pb (n = 06)
		hom +14pb/+14pb (n = 00)
	DC (n = 16)	het +14pb/-14pb (n = 07)
		hom -14pb/-14pb (n = 04)
Sexo Feminino (n = 34)	UC (n = 18)	hom +14pb/+14pb (n = 02)
		het +14pb/-14pb (n = 05)
	DC (n = 16)	hom -14pb/-14pb (n = 09)
		hom +14pb/+14pb (n = 02)
	UC (n = 18)	het +14pb/-14pb (n = 04)
		hom -14pb/-14pb (n = 12)

Figura 5: Dados de todos os pacientes genotipados neste trabalho. (UC: Colite Ulcerativa; DC: Doença de Crohn; F: sexo feminino; M: sexo masculino; *genotipagem não disponível, **informações não disponíveis).

AMOSTRA	CCR5	HLA-G	SEXO	DIAGNÓSTICO
IBD 001	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 002	Homozigoto Normal	Heterozigoto	F	UC
IBD 003	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	DC
IBD 004	Homozigoto Normal	Deleção	M	DC
IBD 005	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	UC
IBD 006	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	DC
IBD 007	Homozigoto Normal	Heterozigoto	F	DC
IBD 008	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 009	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	DC
IBD 010	Homozigoto Normal	Inserção	F	DC
IBD 011	Homozigoto Normal	Deleção	M	DC
IBD 012	CCR5/delta32	Deleção	F	DC
IBD 013	CCR5/delta32	Heterozigoto	M	DC
IBD 014	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 015	Homozigoto Normal	Deleção	M	DC
IBD 016	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	DC
IBD 017	Homozigoto Normal	Deleção	F	DC
IBD 018	Homozigoto Normal	Inserção	F	DC
IBD 019	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 020	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 021	Homozigoto Normal	Inserção	F	UC
IBD 022	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 023	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 024	Homozigoto Normal	Deleção	F	DC
IBD 025	Homozigoto Normal	Deleção	M	UC
IBD 026	Homozigoto Normal	Inserção	F	UC
IBD 027	CCR5/delta32	Heterozigoto	M	DC
IBD 028	Homozigoto Normal	Heterozigoto	F	DC
IBD 029	Homozigoto Normal	Inserção	F	DC
IBD 030	CCR5/delta32	*	M	UC
IBD 031	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	UC
IBD 032	Homozigoto Normal	Deleção	F	DC
IBD 033	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	DC
IBD 034	Homozigoto Normal	Deleção	M	DC
IBD 035	CCR5/delta32	Deleção	F	DC
IBD 036	Homozigoto Normal	Heterozigoto	F	UC
IBD 037	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 038	CCR5/delta32	Heterozigoto	F	DC
IBD 039	Homozigoto Normal	Deleção	F	**
IBD 040	CCR5/delta32	Deleção	M	UC
IBD 041	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 042	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 043	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	UC
IBD 044	Homozigoto Normal	Deleção	F	UC
IBD 045	*	Heterozigoto	M	DC
IBD 046	Homozigoto Normal	Deleção	F	DC
IBD 047	*	*	F	DC
IBD 048	*	Deleção	M	DC

IBD 049	*	Deleção	M	UC
IBD 050	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	UC
IBD 051	Homozigoto Normal	Deleção	M	UC
IBD 052	Homozigoto Normal	Deleção	F	DC
IBD 053	*	Heterozigoto	F	DC
IBD 054	CCR5/delta32	Deleção	F	UC
IBD 055	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	UC
IBD 056	*	Heterozigoto	F	DC
IBD 057	Homozigoto Normal	Inserção	M	DC
IBD 058	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	UC
IBD 059	Homozigoto Normal	Heterozigoto	F	DC
IBD 060	Homozigoto Normal	Deleção	F	DC
IBD 061	Homozigoto Normal	Deleção	M	DC
IBD 062	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	DC
IBD 063	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	DC
IBD 064	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	UC
IBD 065	*	Heterozigoto	F	UC
IBD 066	Homozigoto Normal	Heterozigoto	M	DC
IBD 067	Homozigoto Normal	Heterozigoto	F	UC
IBD 068	Homozigoto Normal	Deleção	F	DC
IBD 069	*	Heterozigoto	**	**
IBD 070	<i>DNA perdido</i>	<i>DNA perdido</i>	<i>DNA perdido</i>	<i>DNA perdido</i>
IBD 071	*	Heterozigoto	**	**
IBD 072	*	Heterozigoto	**	**
IBD 073	Homozigoto Normal	Deleção	**	**
IBD 074	Homozigoto Normal	Heterozigoto	**	**
IBD 075	Homozigoto Normal	Inserção	**	**
IBD 076	Homozigoto Normal	Inserção	**	**
IBD 077	Homozigoto Normal	Deleção	**	**
IBD 078	Homozigoto Normal	Deleção	**	**
IBD 079	*	*	**	**
IBD 080	Homozigoto Normal	Heterozigoto	**	**
IBD 081	Homozigoto Normal	Heterozigoto	**	**
IBD 082	Homozigoto Normal	Heterozigoto	**	**
IBD 083	Homozigoto Normal	Heterozigoto	**	**
IBD 084	Homozigoto Normal	Heterozigoto	**	**
IBD 085	Homozigoto Normal	Deleção	**	**
IBD 086	*	Heterozigoto	**	**

Anexo 1: Publicação na Revista Ciência em Movimento

Doença Inflamatória Intestinal - Uma Abordagem Imunogenética

Inflammatory Bowel Disease - An Immunogenetical Approach

Raquel Rinke ¹, Alessandra Peres ², Marta Brenner Machado ³, José Artur Bogo Chies ⁴

¹ Estudante de Biologia UFRGS, estagiária de Iniciação Científica no Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética; Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² IPA Metodista.

³ Médica Gastroenterologista, Serviço de Gastroenterologia do Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

⁴ PhD em Ciências da Vida - Imunologia, Chefe do Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética; Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Doença Inflamatória Intestinal - Uma Abordagem Imunogenética

Inflammatory Bowel Disease - An Immunogenetical Approach

Raquel Rinke ¹, Alessandra Peres ², Marta Brenner Machado ³, José Artur Bogo Chies ¹

¹ Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ² IPA Metodista, ³ Serviço de Gastroenterologia do Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Endereço para correspondência:

José Artur Bogo Chies

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Genética - Campus do Vale

Av. Bento Gonçalves 9500 Prédio 43 323

Caixa Postal 15053

Porto Alegre RS CEP 91501-970

E-mail: jabchies@terra.com.br

Resumo

A Doença Inflamatória Intestinal (IBD) é caracterizada por causar alterações na mucosa do trato gastrointestinal. É uma doença multifatorial onde fatores genéticos parecem interferir bastante na predisposição e no desenvolvimento de diferentes sintomas associados à doença. Alguns genes relacionados ao sistema imune já foram indicados como alvos potenciais de terapia nesta doença por possivelmente influenciarem o desenvolvimento da IBD. O gene *CCR5* é o principal alvo de nosso projeto, por estar relacionado com resposta imune e interferir na migração de células pró-inflamatórias, direcionando-as para os locais de lesão. Até o momento foram recrutados no Hospital São Lucas da PUCRS 57 indivíduos portadores de IBD. Foi extraído DNA genômico destes indivíduos e este material foi submetido à genotipagem do gene *CCR5*, visando a identificação da variante *CCR5*delta32. A frequência alélica desta variante no grupo com IBD foi comparada com uma amostra de 102 indivíduos Euro-descendentes saudáveis, provenientes da população gaúcha, através do teste de qui-quadrado. Apesar de existir uma pequena diferença da frequência desta variante entre os indivíduos com IBD (0,070) e o grupo controle (0,044), esta não foi estatisticamente significativa. Nossos resultados não indicam, até o presente momento, uma associação direta entre a variante delta32 do receptor de quimiocinas *CCR5* e o desenvolvimento de IBD na população gaúcha.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal, *CCR5*, polimorfismos de DNA

Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is characterized by alterations on the mucosal of gastrointestinal tract. It is a multifactorial disease where genetic factors seems to highly interfere on disease predisposition. Some genes were already indicated as potential targets to therapy as they possibly interfere on IBD development. The *CCR5* gene is the main target on our work, as it is involved on inflammatory immune responses and direct proinflammatory cells to the sites of lesion. Until now, 57 IBD patients recruited from the Hospital São Lucas (PUCRS) were genotyped in order to identify the polymorphic variant *CCR5*delta32. The allelic frequencies were compared to a control group (102 healthy Euro-descendent individuals from the population of Rio Grande do Sul). Although slightly different, the *CCR5*delta32 frequency among IBD patients (0.070) did not statistically differs from the control group (0.044). Our results indicated that the *CCR5*delta32 variant is not directly associated to IBD in our population.

Key words: Inflammatory bowel disease, *CCR5*, polymorphisms

Introdução

A Colite Ulcerativa (UC) e a Doença de Crohn's (CD) são os subtipos mais comuns da Doença Inflamatória Intestinal (IBD). Caracterizam-se por serem doenças inflamatórias crônicas que causam irritação e inflamação no trato digestivo. A UC manifesta-se basicamente no cólon e no reto enquanto a CD pode afetar todo o trato gastrointestinal (POTOCNIK *et al.*, 2004). Os portadores destas enfermidades atravessam períodos remissivos e ativos da doença. Nos períodos de inflamação, os principais sintomas são: diarreia, dores abdominais, hemorragia, baixa absorção de nutrientes, falta de apetite, perda de peso e febre. (RECTOR *et al.*, 2001).

A IBD caracteriza-se por ser de herança multifatorial, onde o somatório de fatores genéticos e ambientais pode levar a uma predisposição diferencial à doença (RECTOR *et al.*, 2001; POTOCNIK *et al.*, 2004). A origem étnica do indivíduo é um fator genético que parece interferir na susceptibilidade ao desenvolvimento da IBD, visto que esta doença raramente ocorre em indivíduos de ancestralidade Africana.

O diagnóstico tradicional da IBD é feito através de critérios clínicos, radiológicos e histológicos. Devido ao avanço das técnicas moleculares é possível associar genes candidatos, que potencialmente estão relacionados a IBD, com o fenótipo dos portadores da doença (AHMAD *et al.*, 2004).

Um fator importante no desenvolvimento da IBD parece ser o padrão preferencial de resposta imunológica do indivíduo. Análises da mucosa intestinal em indivíduos portadores de CD e UC têm demonstrado um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias potencialmente associadas à morbidade da IBD, sugerindo assim, uma resposta inflamatória do tipo Th1.

Além do mais, uma resposta imune desregulada e excessiva na mucosa intestinal contra a flora entérica parece ser um fator contribuinte para a morbidade associada a esta condição (PODOLSKY, 2002).

Marcadores Moleculares envolvidos com IBD

Atualmente, muitos trabalhos buscam a identificação de genes envolvidos no desenvolvimento da IBD. Isso é feito através da comparação das frequências alélicas de genes candidatos entre indivíduos que manifestam a doença e um grupo controle saudável (AHMAD *et al.*, 2004).

Diversos loci gênicos que possivelmente estão envolvidos com IBD já foram identificados, sendo que destes, apenas sete (IBD1-7) foram os que apresentaram um vínculo de maior significância com a doença. Eles estão localizados nos seguintes cromossomos: 16q (IBD1), 12q (IBD2), 6p (IBD3), 14q (IBD4), 5q (IBD5), 19p (IBD6) e 1p (IBD7). É importante salientar que alguns loci apresentam uma maior susceptibilidade a UC e/ou CD, o que pode indicar etiologias diferentes para as duas manifestações clínicas da IBD (ZHENG *et al.*, 2003).

O presente trabalho está relacionado com a caracterização imunogenética de indivíduos portadores de CD e UC através da análise de variantes polimórficas de genes já descritos como candidatos para IBD e que estão relacionados ao sistema imune. Nosso principal alvo de pesquisa, no momento, é o gene *CCR5*. Este gene está localizado no braço curto do cromossomo 3 na posição 21 e codifica uma proteína G de membrana que atua como receptor de quimiocinas. Essa proteína encontra-se distribuída predominantemente na superfície de células T CD4+ (células T auxiliares) e em

monócitos. Durante o período de inflamação, as células da mucosa intestinal, para sinalizar que está ocorrendo uma inflamação, produzem CCL5, uma beta quimiocina que é reconhecida pelo CCR5, fazendo com que os linfócitos migrem para o local da inflamação gerando uma resposta inflamatória do tipo Th1.

Variantes alélicas do gene *CCR5* podem apresentar alteração tanto da taxa de expressão do gene quanto na própria proteína. O exemplo mais conhecido de alteração no gene que codifica a proteína CCR5 é uma deleção de 32pb que provoca o surgimento de um códon de terminação precoce, o qual interfere na tradução gerando um receptor de membrana não funcional. O alelo responsável por esta situação recebe o nome de CCR5delta32 (vide revisão recente em GALVANI; NOVENBRE; 2005). Os homozigotos para essa mutação não expressam a proteína CCR5 na superfície dos linfócitos e isso faz com que as células T não respondam adequadamente a fatores quimiotáticos. Os heterozigotos para a mutação CCR5delta32 expressam CCR5, porém em menor quantidade que homozigotos para o alelo selvagem. Com isso, provavelmente sua resposta imunológica encontra-se alterada.

A distribuição geográfica e populacional da mutação CCR5delta32 é bastante característica. Esta variante alélica é encontrada em alta frequência em Caucásios, mas é extremamente rara em Asiáticos. O alelo CCR5delta32 não é encontrado em populações nativas do continente americano, africano ou australiano. Estudos populacionais sugerem que essa variante surgiu provavelmente na Europa, recentemente (700 – 5.000 anos), sendo resultante de um único evento mutacional. Estes mesmos estudos sugerem que algum fator, possivelmente a peste negra, a varíola ou a tuberculose, tenha exercido

uma alta pressão seletiva a favor deste alelo, levando tanto à sua manutenção quanto ao aumento relativamente rápido de sua frequência em diferentes grupos populacionais (revisão em GALVANI; NOVEMBRE; 2005).

Assim, considerando a distribuição característica da variante CCR5delta32, o alto grau de miscigenação da população Brasileira e o potencial envolvimento deste receptor de quimiocinas em doenças pró-inflamatórias, esse trabalho tem como objetivo a caracterização imunogenética de pacientes portadores de UC e CD através da análise de variantes polimórficas de genes relacionados ao sistema imune. Serão apresentados os dados relativos ao alelo CCR5delta32 comparando-se a frequência do mesmo entre um grupo de indivíduos com Doença Inflamatória Intestinal e uma amostra da população saudável do Rio Grande do Sul.

Desenvolvimento

Amostras e Extração do DNA

Foi isolado DNA a partir de sangue periférico, de acordo com o protocolo descrito por LAHIRI; NURNBERGER (1991), de 57 pacientes com doença inflamatória intestinal os quais foram diagnosticados no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre (PUCRS). Estes pacientes foram previamente convidados a participar do estudo e, aqueles que se voluntariaram, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras foram armazenadas a -20°C e, atualmente, fazem parte de um Banco de DNA genômico estocado no Laboratório de Imunogenética da UFRGS. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS no dia 22 de agosto de 2005.

Genotipagem CCR5

A genotipagem do gene CCR5 foi feita através de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando-se primers específicos previamente descritos por CHIES; HUTZ (2003). A reação de PCR para cada amostra foi preparada para um volume final de 25uL nas seguintes condições: 1uL de DNA (0,2-0,5ug), 2,5uL de tampão de PCR 10X [200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl], 1uL de MgCl₂ 50mM, 1uL de dNTPs 5mM, 1uL de primers na concentração de 10pmol para cada primer e 0,2uL de Taq DNA polimerase 5U/uL. O programa de amplificação utilizado consistiu de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto, precedidos de um ciclo de desnaturação por 3 minutos a 94°C e seguidos de um ciclo de extensão por 10 minutos a 72°C. O PCR produz fragmentos de 137 pb para o alelo selvagem e de 105 pb para o alelo delta-32. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 3% sendo coradas com brometo de etídeo para visualização sob luz ultravioleta (Figura 1).

Análise Estatística

As frequências alélicas foram determinadas por contagem. Para determinar se as amostras populacionais estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e para comparar a frequência dos alelos entre as populações foi utilizado o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

Resultados

Foram genotipadas 57 amostras em relação à variante CCR5delta32 do gene CCR5. Destas, 49 apresentaram homozigose para o alelo selvagem e 08

eram derivadas de indivíduos heterozigotos. Não foram observados indivíduos homozigotos para a variante CCR5delta32 (Tabela 1). A frequência encontrada para o alelo CCR5delta32 foi de 0,070 entre indivíduos com Doença Inflamatória Intestinal. Quando essa foi comparada com a frequência descrita para uma população controle caucasóide do Sul do Brasil (0,044) (CHIES; HUTZ; 2003) não foi encontrada diferença significativa. Tanto o grupo com Doença Inflamatória Intestinal quanto a amostra controle encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Tabela 2 apresenta os dados de genotipagem da variante CCR5delta32 agrupados de acordo com gênero e diagnóstico (Doença de Crohn's ou Colite ulcerativa) dos pacientes.

Discussão

A susceptibilidade à IBD está relacionada tanto a fatores ambientais como a fatores genéticos. Os receptores de quimiocinas estão envolvidos com o desenvolvimento de resposta imune, direcionando diferentes células para as regiões onde é necessária a estruturação de respostas inflamatórias.

A importância do *CCR5* como gene candidato para susceptibilidade no desenvolvimento e controle da inflamação associada a pacientes com IBD foi sugerida em estudos anteriores (RECTOR *et al.*, 2005). Segundo Satsangi *et al.* (1996) e Hampe *et al.* (2001), existe associação de uma região do braço curto do cromossomo 3, onde se encontra o gene *CCR5*, com o desenvolvimento de IBD. No entanto, Annese *et al.* (1999) e Rioux *et al.* (2000), em trabalhos desenvolvidos com pacientes IBD originários respectivamente da Itália e Canadá, não relataram qualquer evidência que essa região

apresentasse algum tipo de ligação com a doença. A existência de dados conflitantes na literatura pode ser explicada tanto pelo fato desta ser uma doença complexa e multifatorial (envolvendo fatores ambientais e genéticos) quanto pela situação de análise de grupos populacionais com padrões étnicos distintos. Levando em conta efeitos ambientais, é possível que o aumento considerável na frequência de IBD nos últimos anos possa estar relacionado a mudanças nos hábitos alimentares, como por exemplo, o aumento da ingestão de produtos industrializados e com pouca fibra. No entanto, apenas fatores ambientais (e especificamente aqueles relacionados à alimentação) não parecem ser suficientes para explicar este aumento na incidência de IBD em diferentes populações.

A presença do alelo CCR5delta32 leva a uma menor expressão de proteína quando em heterozigose, situação esta que pode chegar a total ausência deste receptor em indivíduos homozigotos. Considerando esta alteração na taxa de expressão do CCR5, é possível que a resposta inflamatória (tanto em indivíduos heterozigotos quanto em indivíduos homozigotos para o alelo CCR5delta32) fique alterada, potencialmente interferindo tanto em respostas imunes normais quanto em respostas patológicas. Em nossa análise pôde-se observar que, apesar de não existir uma diferença estatisticamente significativa, houve uma tendência de uma maior frequência do alelo CCR5delta32 nos indivíduos com IBD (0,070) quando comparados aos indivíduos controle (0,044). É importante aqui salientar que diversos trabalhos têm associado um receptor CCR5 não funcional com o desenvolvimento de respostas inflamatórias exacerbadas, tanto em modelos animais, como é o caso de camundongos CCR5 nocaute infectados com uma

linhagem de vírus influenza (DAWSON et al.; 2000) quanto em doenças humanas, tais como a anemia falciforme (CHIES; HUTZ, 2003) e a artrite idiopática juvenil (SCHEIBEL; VEIT, comunicação pessoal). Ainda, é importante lembrar que muitos genes candidatos estão associados a apenas uma das formas clínicas da IBD, seja a Colite Ulcerativa ou a Doença de Crohn's e que, portanto, é essencial tanto o aumento do número amostral do presente trabalho quanto também a classificação dos pacientes de acordo com a forma clínica de IBD apresentada. Os dados apresentados na Tabela 2 reforçam esta afirmação, uma fragmentação do tamanho da amostra entre os diferentes grupos diminui o poder de análise. Outrossim, é importante que dados referentes à idade, sexo, etnia, além de outras características clínicas e físicas dos pacientes sejam obtidos para que possamos adequadamente caracterizar e subgrupar os indivíduos.

Conclusão

Apesar de existir uma pequena diferença da freqüência desta variante entre os indivíduos com IBD (0,070) e o grupo controle (0,044), esta não foi estatisticamente significativa. Nossos resultados não indicam, até o presente momento, uma associação direta entre a variante delta32 do receptor de quimiocinas CCR5 e o desenvolvimento de IBD na população gaúcha.

Referências Bibliográficas

AHMAD, Tariq et al. Clinical Relevance of Advantages in Genetics and Pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology*, n. 126, p.1533-1549, maio 2004.

ANNESE, V et al. Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to the IBD1 locus--a GISC study. *European Journal of Human Genetics*, n. 7, p. 567-573, julho. 1999.

CHIES, José Artur Bogo; HUTZ, Mara Helena. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 36, p. 71-75, Janeiro 2003.

DAWSON, TC et al. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *American Journal of Pathology*, n. 156, p.1951-1959, jun. 2000.

GALVANI, AP; NOVEMBRE, J. The evolutionary history of the CCR5-delta32 HIV-resistance mutation. *Microbes and Infection*, n. 7, p. 302-309, fev. 2005.

HAMPE, J et al. Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut*, n. 48, p.191-197, fev. 2001.

LAHIRI, DK; NURNBERGER, JIJr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, n. 19, p. 5444, out. 1991.

PODOLSKY, DK. Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, n. 347, p. 417-429, agosto 2002.

POTOCNIK, U et al. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes and Immunity*,; n. 5, p. 530-539, nov. 2004.

RECTOR, Annabel et al. Analysis of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) delta-32 polymorphism in inflammatory bowel disease. *Human Genetics*, n.108, p.190-193, mar 2001.

RIOUX, JD et al. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *American Journal of Human Genetics*, n. 66, p.1863-1870, jun. 2000.

SATSANGI, J et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nature Genetics*, n. 14, p.199-202, out. 1996.

ZHENG, CQ et al Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World Journal of Gastroenterology*, n. 9, p. 1646-1656, agosto 2003.

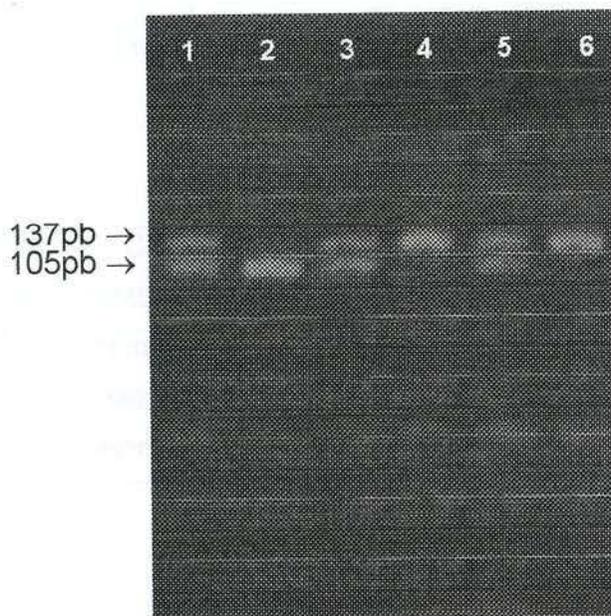


Figura 1. Genotipagem do CCR5 em gel de agarose 3%: Canaletas 1, 2, 3, 4 e 6 indivíduos homocigotos normais (CCR5/CCR5); 5 e 7 indivíduos heterocigotos (CCR5/CCR5delta32); 8 marcador de peso molecular, ladder de 100pb.

Tabela 1: Frequências alélicas e número de indivíduos por genótipo do CCR5 em pacientes com IBD e controles saudáveis.

CCR5		Pacientes com IBD (n = 57)	Grupo Controle (n = 102)
Alelo (frequência)	CCR5	0,930	0,956
	CCR5 delta32	0,070	0,044
Genótipo (n)	homozigoto selvagem	49 (86%)	93 (91%)
	heterozigotos	08 (14%)	9 (9%)

Tabela 2: Dados de genotipagem da variante CCR5delta32 agrupados de acordo com gênero e diagnóstico [Doença de Crohn's (DC) ou Colite ulcerativa (UC)] dos pacientes. O n total da tabela é igual a 56 pois uma paciente do sexo feminino, homozigota para o alelo CCR5 selvagem, apesar de diagnosticada como portadora de IBD, não foi subclassificada.

Sexo Masculino (n = 22)	DC (n = 12)	hom CCR5 (n = 10)
		het CCR5/CCR5delta32 (n = 02)
	UC (n = 10)	hom CCR5 (n = 08)
		het CCR5/CCR5delta32 (n = 02)
Sexo Feminino (n = 34)	DC (n = 19)	hom CCR5 (n = 16)
		het CCR5/CCR5delta32 (n = 03)
	UC (n = 15)	hom CCR5 (n = 14)
		het CCR5/CCR5delta32 (n = 01)